



**HAL**  
open science

# Réponse du phytoplancton à différentes pressions de sélection continues

Manon Gachelin

► **To cite this version:**

Manon Gachelin. Réponse du phytoplancton à différentes pressions de sélection continues. Ingénierie de l'environnement. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS049 . tel-03182497

**HAL Id: tel-03182497**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03182497>**

Submitted on 26 Mar 2021

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Sorbonne Université**

Ecole doctorale 129

*Laboratoire d'Océanographie de Villefranche UMR7093/ Equipe de recherche PEPS-PISCO*

## **Réponse du phytoplancton à différentes pressions de sélection continues**

Par Manon GACHELIN

Thèse de doctorat en sciences de l'environnement

Dirigée par Olivier BERNARD  
Freddy GUIHENEUF  
Antoine SCIANDRA

Présentée et soutenue publiquement le 11 mai 2020

Devant un jury composé de :

Dr Fayza DABOUSSI, rapporteure  
Pr Benoît SCHOEFS, rapporteur  
Dr Claude AFLALO, examinateur  
Dr Gaël BOUGARAN, examinateur  
Dr Jean-Paul CADORET, examinateur  
Pr Rodolphe LEMEE, examinateur



## Remerciements

A la SAS P.I.V.E.R.T qui a financé mes travaux de recherche.

Aux directeurs du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Antoine et Rodolphe, pour m'avoir accueillie.

A mes directeurs de thèse, Olivier, Antoine et Freddy, pour le temps, les discussions, les encouragements, les conseils et toutes les corrections sur les versions successives de mes articles et de mon manuscrit.

A mes collègues et aux membres de l'Open-Space, Margaux, Anne-Sophie, Sophie, Ophélie, Coco, En particulier, merci à Amélie, la magicienne, et Eric « MacGyver », sans qui les expériences d'évolution en laboratoire auraient été encore plus compliquées à mettre en place et conduire.

A Marc et Patrick, pour leurs aide et conseils avisés concernant les analyses biochimiques.

A Valentin, Arnaud, Maxime et Sabrina, indispensables pour traiter avec moi les quelques centaines d'échantillons produits pendant ma thèse.

Aux membres de l'équipe PBA de l'Ifremer, qui m'ont aidée et encouragée depuis Nantes et qui m'ont régulièrement accueillie au cours de ces 3 années.

Merci également aux membres de l'Observatoire pour tous les bons moments et les coups de main, Laulau, Fabien, Thierry B, Thierry, Didier, Jocelyne, Nathalie, Isa, Jean-Yves et les marins, David et les plongeurs, Laurence, Marta, Alex...

A ma famille et mes amis, toujours présents, pour m'avoir épaulée, encouragée et aussi, parfois, supportée tout au long de cette aventure.

Et à tous ceux que je ne cite pas mais qui ont compté pendant ces 3 années de thèse à mes côtés.



## Table des matières

Remerciements .....	3
Chapitre 1 - Le phytoplancton, une solution durable et responsable pour nourrir les animaux d'aquaculture ? .....	9
1. Les microalgues, le nouveau couteau suisse de l'industrie biosourcée ? .....	10
1.1. Qu'est-ce que les microalgues ? .....	10
1.2. Des métabolismes divers, source de nombreuses molécules d'intérêt pour des applications variées .....	13
2. Les lipides chez les microalgues .....	18
2.1. Présentation des différentes familles de molécules .....	18
2.2. Métabolisme et voies de synthèse .....	21
2.3. Quels paramètres affectent la production et la composition des lipides (AGPI à longues chaînes notamment) dans les microalgues ? .....	25
3. Différentes méthodes de culture des microalgues .....	28
3.1. La culture en batch .....	28
3.2. La culture semi-continue : le fed-batch .....	29
3.3. Les cultures en continu : chémostat et turbidostat .....	30
3.4. Modélisation de la croissance dans un photobioréacteur .....	32
4. Les différentes techniques permettant d'améliorer les microalgues en laboratoire .....	33
4.1. Criblage .....	33
4.2. Mutagenèse UV ou chimique .....	33
4.3. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) .....	34
4.4. Évolution dirigée en laboratoire .....	36
5. De l'intérêt de domestiquer les microalgues .....	36
5.1. Les principes de l'évolution selon Darwin .....	36
5.2. La sexualité chez les microalgues .....	37
5.3. Application à la domestication des microalgues .....	38
6. Quels choix pour mener une expérience d'évolution dirigée en laboratoire ? .....	39
6.1. Intérêt de la méthode d'évolution dirigée pour la production de souches spécifiques .....	39
6.2. Intérêt de la méthode de culture en continu .....	40
6.3. Choix des stress utilisés pour les expériences d'évolution en laboratoire .....	41
7. Objectifs de la thèse .....	42
Liste des figures .....	44
Liste des tableaux .....	44
Chapitre 2 - Matériel et méthodes .....	46

1. Le matériel biologique : <i>Tisochrysis lutea</i> .....	46
2. Les milieux de culture .....	47
3. Les systèmes de culture.....	47
3.1. Les sélectiostats.....	47
3.2. Les multicultivateurs.....	49
4. Les analyses effectuées .....	50
4.1. Les paramètres de croissance.....	50
4.2. Les analyses lipidiques.....	53
4.3. Les analyses CHN .....	53
4.4. Les analyses de génomique .....	53
4.5. Les analyses en cytométrie en flux .....	54
5. Protocoles des expériences d'évolution dirigée .....	55
Chapitre 3 : Tolérance de <i>Tisochrysis lutea</i> au stress oxydatif : une étude préliminaire centrée sur le métabolisme lipidique.....	57
Introduction .....	57
1. Choix des molécules oxydantes.....	58
2. Protocoles .....	59
2.1. Détermination de la toxicité du peroxyde d'hydrogène .....	59
2.2. Impact du peroxyde d'hydrogène à l'inoculation sur la croissance .....	60
3. Détermination du seuil de toxicité du peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	60
4. Impact du peroxyde d'hydrogène sur la croissance initiale d'une culture de <i>Tisochrysis lutea</i> .....	61
4.1. Impact sur la croissance .....	62
4.2. Impact sur la composition lipidique.....	64
Liste des figures et tableaux.....	71
Chapitre 4 : Utiliser le stress thermique et l'évolution dirigée en laboratoire pour améliorer la teneur en lipides polaires de <i>Tisochrysis lutea</i> .....	73
Enhancing PUFA-rich polar lipids in <i>Tisochrysis lutea</i> using dynamic Darwinian selection with thermal stress .....	73
Introduction .....	73
Material and methods.....	74
Microalgal strains .....	74
Cultivation device and protocol.....	75
Lipid extraction and class separation .....	78
Fatty acids analysis.....	78
DNA extraction and sequencing .....	78

Results and discussion.....	81
Overall evolution in the selectiostat.....	81
Phenotype evolution in standardized cultivation conditions .....	81
Genomic analysis.....	86
Conclusions .....	87
Acknowledgments.....	88
Chapitre 5 : Effets conjugués d'un stress thermique et d'un stress lumineux sur les teneurs en lipides polaires riches en acides gras polyinsaturés à longues chaînes chez deux souches de <i>T. lutea</i> .....	89
1. Introduction.....	89
2. Matériel et méthodes.....	91
2.1. Matériel biologique .....	91
2.2. Système de culture et protocole .....	91
2.3. Analyses lipidiques .....	92
3. Résultats et discussion .....	93
3.1. Cultures dans les sélectiostats : température, lumière et oxygène .....	93
3.2. Caractérisation dans des conditions de culture standardisées .....	97
4. Conclusion .....	106
Liste des tableaux et figures .....	108
Chapitre 6 : Conclusions et perspectives .....	110
1. Le stress thermique pour impacter les membranes phospholipidiques.....	110
2. La conjugaison du stress thermique et du stress lumineux .....	112
3. Comment obtenir et maintenir des souches d'intérêt ?.....	113
3.1. « Courir pour rester sur place », mais marcher pour aller loin .....	113
3.2. Isoler les cellules présentant le phénotype d'intérêt.....	114
3.3. La nécessité de « figer » l'évolution.....	115
3.4. Augmenter la diversité génétique de départ ? .....	116
Conclusion.....	117
Chapitre 7 : références bibliographiques .....	120
Annexe 1: Listes des techniques considérées comme ne produisant pas d'organismes génétiquement modifiés .....	138



## Chapitre 1 - Le phytoplancton, une solution durable et responsable pour nourrir les animaux d'aquaculture ?

La population mondiale augmente rapidement : les Nations Unies prédisent une population mondiale de 9 milliards d'êtres humains d'ici 2040 et plus de 10,8 milliards d'individus à la fin du XXI<sup>ème</sup> siècle. En parallèle, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) prévoit une raréfaction des ressources (FAO, 2017). Cette raréfaction est déjà amorcée pour l'eau douce, les terres agricoles ou les ressources naturelles de poissons et de coquillages. Cette conjoncture met la société face à des défis majeurs. L'un d'entre eux est vital : il consiste à trouver de nouvelles sources d'alimentation, et en particulier pour les animaux destinés à l'alimentation humaine.

Certaines espèces de cyanobactéries sont consommées par l'homme depuis plusieurs siècles en Amérique du Sud, en Afrique (*Arthrospira platensis*, civilisations précolombiennes, populations autour du Lac Tchad) et en Chine (*Nostoc* sp.). Au cours des dernières décennies, les microalgues et les cyanobactéries sont devenues familières du grand public pour leurs applications énergétiques et leurs contributions aux biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération (Wijffels et Barbosa, 2010). L'exploration de cette ressource a mis en avant des propriétés très variées selon les espèces, et ne devrait pas être restreinte aux recherches sur la production d'énergie (Kari et al. 2013). *A. platensis* est par exemple extrêmement riche en protéines (>70% de sa masse sèche (MS)) et produit des phycobilines. Ces dernières sont des pigments très précieux en agro-alimentaire (colorants), cosmétique, pharmaceutique et pour toutes les technologies d'immunofluorescence. *Haematococcus pluvialis* accumule de l'astaxanthine, le plus puissant antioxydant naturel (4-5% MS) et *Dunaliella salina* du  $\beta$ -carotène (12-14% MS). Certaines espèces de *Chlorella* et *Nannochloropsis* accumulent, sous certaines conditions de culture, plus de 60% de leur poids sec en lipides. De plus, elles produisent des acides gras très importants pour la santé humaine tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA), arachidonique et  $\gamma$ -linoléinique. Plus généralement, de nombreux composés chez les microalgues et les cyanobactéries ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, immuno-stimulantes, nutraceutiques, etc.

Les microalgues et les cyanobactéries pourraient donc être un futur « couteau suisse » pour l'industrie. D'une part, elles pourraient devenir des « bio-fabriques » pour répondre à des besoins spécifiques en cosmétique, pharmaceutique, médecine ou agroalimentaire. D'autre part, elles pourraient être utilisées quotidiennement dans l'alimentation humaine et animale. L'aquaculture a déjà commencé à relever ce défi. Certaines espèces de microalgues sont aujourd'hui incorporées entières, en routine, dans l'alimentation des juvéniles de crevettes, poissons ou coquillages. Elles sont également utilisées chez les animaux adultes, pour l'affinage des huîtres ou la coloration des salmonidés. Les microalgues sont aussi de plus en plus présentes dans les aliments des animaux de compagnie. En effet, elles ont un effet positif sur leur état général (pelage, couleur, santé). Enfin, l'industrie agro-alimentaire a également investi dans les microalgues. Des extraits sont incorporés dans les recettes pour la production d'aliments « fonctionnels » (biscuits, yaourts, boissons...) enrichis en protéines, en acides gras ou en antioxydants. Ces aliments ont donc un effet bénéfique supplémentaire sur les organismes.

Toutefois, les souches et les espèces actuellement utilisées dans l'industrie n'ont pas été domestiquées. Il s'agit d'espèces sauvages qui ne sont donc pas nécessairement adaptées aux usages

que souhaite en faire l'homme. Pour qu'elles correspondent parfaitement aux besoins spécifiques de chaque type de valorisation, leur domestication est nécessaire pour renforcer certaines caractéristiques souhaitées ou pour en éliminer d'autres. Différentes techniques permettent d'arriver à ce résultat : le criblage des populations, la mutagenèse, l'ingénierie génétique et l'évolution dirigée. Cette dernière technique présente plusieurs avantages (Bonfond et al. 2017). Elle peut s'appliquer à des populations polyclonales naturelles, et maximise ainsi la diversité des traits de caractères présents au sein de la population. Statistiquement, cela permet de favoriser l'émergence de caractéristiques d'intérêt. De plus, l'évolution dirigée ne nécessite pas de connaissances préalables du génome de l'espèce, ce qui est d'autant plus intéressant que moins d'une dizaine de génomes complets de microalgues ont été édités. Par ailleurs, cette technique permet de conserver un bon fitness de la population.

L'évolution dirigée est une technique déjà éprouvée dans plusieurs domaines. Tout d'abord, elle a été énormément utilisée en agriculture pour produire des espèces cultivées. En microbiologie, elle fonctionne en routine sur les levures et les bactéries (Lu et al., 2012 ; Wang et al., 2014) et des résultats prometteurs ont été obtenus avec des microalgues (Bonfond et al., 2017 ; Fu et al., 2013 ; Perrineau et al., 2013) . En particulier, elles semblent tout à fait indiquées pour modifier durablement la composition biochimique des cellules. Parmi ces familles de composés, les acides gras polyinsaturés qui entrent dans la composition des lipides sont une cible d'intérêt majeur. En effet, les organismes du règne animal étant incapables de synthétiser certains acides gras, ou les synthétisant à des coûts métaboliques trop importants, doivent se les procurer via leur alimentation. Les microalgues, qui produisent ces acides gras essentiels, constituent par conséquent une ressource alimentaire d'autant plus prometteuse qu'elles sont capables d'en accumuler de grandes quantités.

Le but de cette étude est donc de mettre en œuvre une technique d'évolution dirigée adaptée à la production de nouvelles souches de microalgues plus riches en acides gras polyinsaturés. Je me suis pour cela attachée à produire des souches plus riches en lipides, notamment les lipides polaires. En effet, ces derniers sont naturellement plus riches en acides gras polyinsaturés que les lipides neutres.

## **1. Les microalgues, le nouveau couteau suisse de l'industrie biosourcée ?**

### **1.1. Qu'est-ce que les microalgues ?**

Les microalgues sont des micro-organismes unicellulaires majoritairement aquatiques d'eaux douces, saumâtres ou salées, qui réalisent la photosynthèse oxygénique. Cela veut dire qu'elles incorporent le carbone inorganique dans leur biomasse, le rendant ainsi disponible pour les maillons trophiques supérieurs. Elles se trouvent dans des écosystèmes et habitats variés, tels que les milieux aquatiques, les sols, les neiges ou en symbiose avec d'autres organismes comme les lichens ou les coraux (zooxanthelles), et sont des producteurs primaires dans les chaînes trophiques.

Les algues microscopiques se divisent en deux types distincts (Lee, 2018), les procaryotes (aussi appelés cyanobactéries d'après leur phylum) et les eucaryotes (elles-mêmes subdivisées en 3 groupes présentés dans le tableau 1), qui possèdent des morphologies cellulaires différentes. Les microalgues procaryotes, les plus anciennes et les plus primitives, sont regroupées sous le phylum « cyanophyta » et ne présentent pas d'organites internes (noyaux, mitochondries, plastides...). Elles sont communément appelées « cyanobactéries ». Les microalgues eucaryotes possèdent différents organites intracellulaires, y compris les chloroplastes dont la complexion membranaire permet leur

classement en 9 phyla (tableau 1). Un grand nombre de ces espèces possèdent une paroi extracellulaire, de nature variable, et des flagelles leur conférant une certaine motilité (Lee, 2018).

Le terme « microalgue » qui désigne des organismes divers, ne correspond donc pas à un cluster phylogénétique unique. Environ 30 000 à 40 000 espèces ont été identifiées et documentées (Andersen, 1992 ; Richmond, 2004 ; <http://algaebase.org>), mais l'estimation actuelle de leur nombre total varie de plusieurs centaines de milliers à quelques millions, selon les auteurs. Ce n'est donc qu'une infime partie de la diversité micro-algale qui est connue aujourd'hui.

D'autres classifications des microalgues sont également trouvées dans la littérature. Une est basée sur leur couleur, et donc sur leur contenu pigmentaire : algue verte, algue rouge, algue brune, algue bleue. Une autre, utilisée en biogéochimie des océans, se base sur la taille (pico-, nano-, microphytoplancton) ou sur des traits fonctionnels : autotrophe, hétérotrophe, organisme calcifiant, silicification.

La majorité des microalgues connues aujourd'hui sont photoautotrophes, car elles utilisent du carbone inorganique (CO<sub>2</sub>, bicarbonate) comme substrat, et la lumière comme source d'énergie. Toutefois, de par leur implantation ubiquiste sur la planète, beaucoup d'espèces possèdent également un métabolisme hétérotrophe qui leur permet d'assimiler du carbone organique en l'absence de lumière. Certaines espèces sont mixotrophes, c'est-à-dire à la fois photoautotrophe et hétérotrophe (Yang et al., 2000 ; Bumbak et al., 2011).

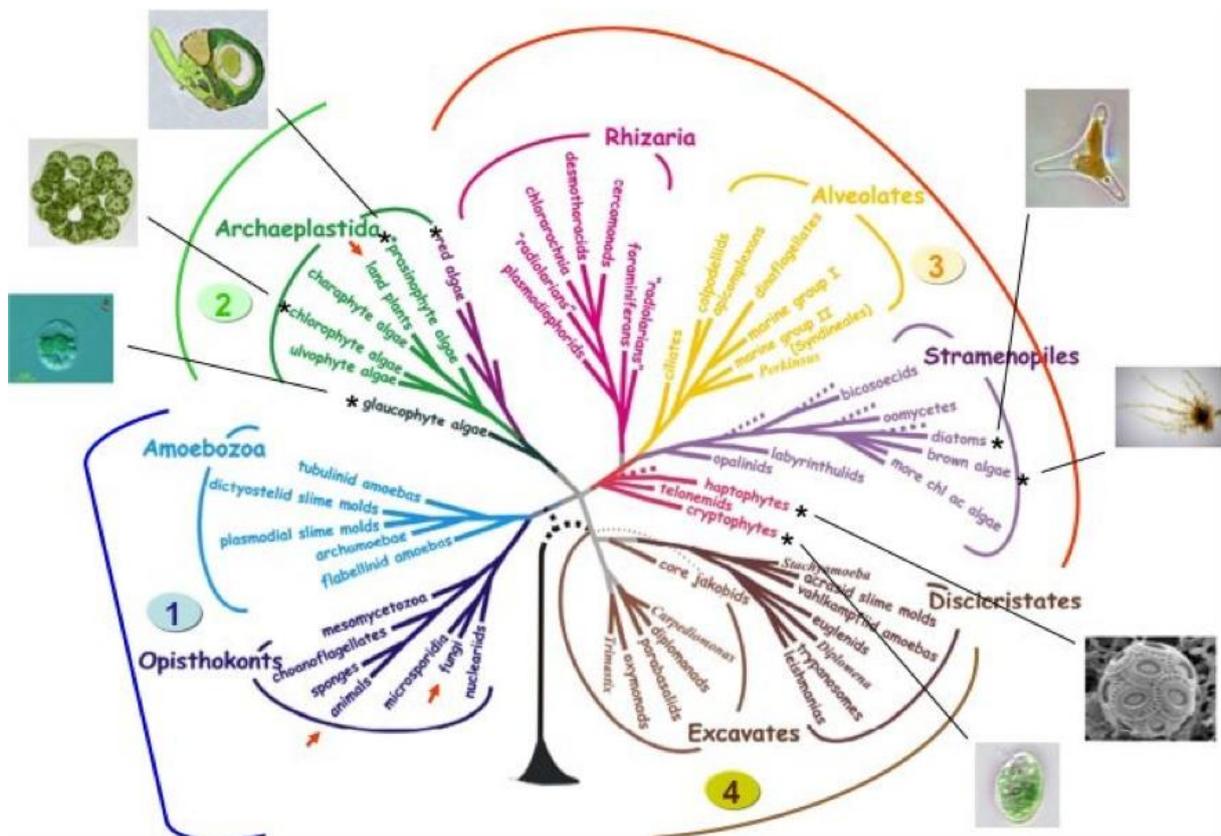


Figure 1 : Arbre phylogénétique simplifié des microalgues (Tirichine & Bowler, 2011). Flèches rouges : plantes, animaux et champignons - astérisques : séquençage complet ou partiel disponible

Tableau 1 : Présentation des 4 groupes de microalgues et leurs taxons différenciant ainsi que les phyla associés (Lee, 2018)

Groupe	Caractéristique	Phyla associés	Caractéristiques du phylum	Nb espèces identifiées (algaebase)
Groupe 1	Procaryotes	Cyanophyta	Chlorophylle a, phycobiliprotéines	4 716
Groupe 2	Eucaryotes dont les chloroplastes sont enveloppés uniquement par la double enveloppe chloroplastique	Glaucochyta	Chloroplaste primitif issu d'une cyanobactérie endosymbiotique modifiée	25
		Rhodophyta	Chlorophylle a, phycobiliprotéines ; réserves = amidon floridéen ; pas de cellules flagellées	7 287
		Chlorophyta	Chlorophylles a et b ; réserves = amidon chloroplastique uniquement	6 688
Groupe 3	Eucaryotes dont les chloroplastes sont sur-enveloppés par une membrane de réticulum endoplasmique chloroplastique	Euglenophyta	Chlorophylles a et b ; cellules uniflagellées qui porte des fibrilles en spirales sur le flagelle, pellicule protéinée en couche sous la membrane plasmique ; réserves = paramylon ; division cellulaire caractéristique	1 483
		Dinophyta	Chlorophylles a et c, noyau mésocaryotique ; cellules majoritairement divisées en un épicone et un hypocone par une « ceinture », flagelles hélicoïdaux transverses	3 544
		Apicomplexa	Flagellés hétérotrophes dont les plastides sont incolores	
Groupe 4	Eucaryotes dont les chloroplastes sont sur-enveloppés par 2 membranes de réticulum endoplasmique chloroplastique	Cryptophyta	Chlorophylles a et c, phycobiliprotéines ; grain d'amidon entre les deux enveloppes chloroplastiques ; nucléomorphe entre les deux membranes du réticulum endoplasmique chloroplastique	220
		Heterokontophyta = Ochrophyta = Chromophyta	Chlorophylles a et c, fucoxanthine, chrysolamine stockée dans des vésicules	4 271
		Prymnesiophyta = Haptophyta	Chlorophylles a et c, fucoxanthine Cellules biflagellées présentant un haptonème	762

## 1.2. Des métabolismes divers, source de nombreuses molécules d'intérêt pour des applications variées

### 1.2.1. Utilisation de la cellule entière

Les microalgues sont consommées depuis plusieurs siècles en Afrique (autour du Lac Tchad), en Chine et en Amérique du Sud (civilisations précolombiennes). L'industrie agro-alimentaire reste le principal secteur qui les utilise aujourd'hui. En effet, 75% de la production totale de microalgues est transformée en produits destinés à l'alimentation (Pulz & Gross, 2004), et 30% du tonnage total est dédié à l'alimentation animale (Spolaore et al., 2006). Très peu d'espèces de microalgues sont actuellement autorisées pour l'alimentation humaine : *Arthrospira platensis* (1984), *Chlorella vulgaris* (2002) et *Odontella aurita* (2004) sont les seules espèces qui peuvent être consommées entières en France. *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Aphanizomenon flos-aquae* et *Nostoc sp* (utilisée en Chine) sont aussi consommées dans le monde (Sathasivam et al., 2019). Les microalgues produites pour l'alimentation humaine sont parfois utilisées entières comme compléments alimentaires, mais elles se présentent plus fréquemment sous forme d'extraits nutraceutiques protéiques, lipidiques, antioxydants, etc.

Pour l'alimentation animale, s'ajoutent *Skeletonema sp*, *Chaetoceros sp*, *Phaeodactylum sp*, *Nitzschia sp*, *Thalassiosira sp*, *Isochrysis sp*, *Pavlova sp*, *Tetraselmis sp* et *Scenedesmus sp* (Sathasivam et al., 2019). Enfin, *Dunaliella sp* et *Haematococcus sp* sont utilisées pour leurs teneurs très importantes en  $\beta$ -carotène et astaxanthine. En alimentation animale, les microalgues sont principalement utilisées entières, seules, souvent fraîches, ou incorporées à un régime existant en tant que complément alimentaire. En effet, elles sont indispensables à plusieurs niveaux en aquaculture. Fraîches, elles servent à alimenter les stades larvaires et juvéniles des mollusques et des crevettes, mais également à produire de la nourriture vivante pour les alevins ou certaines huîtres au moment de l'affinage des adultes. Incorporées au régime alimentaire des salmonidés, elles donnent une couleur rose-orangée caractéristique à leur chair. Chez les animaux, (animaux domestiques, aquariophilie, élevage), les microalgues sont plutôt utilisées comme compléments alimentaires dans les rations quotidiennes (apport de vitamines, minéraux, acides gras essentiels, pigments) en vertu de leurs effets bénéfiques sur l'état général des animaux (Pulz & Gross, 2004 ; Sathasivam et al., 2019): couleurs plus vives, poils plus brillants, meilleur fertilité, meilleure régulation de la prise de poids, effets immunostimulants, etc. Elles sont également indispensables pour les élevages de volailles, auxquelles elles procurent les compléments protéiques nécessaires à la bonne formation des œufs (Sathasivam et al., 2019).

Les microalgues ont également démontré un potentiel très intéressantes pour le traitement biologique des eaux usées urbaines ou industrielles. En effet, elles absorbent non seulement l'azote et le phosphore inorganiques (nitrate, nitrite, ammonium, phosphate, etc.), mais également des polluants comme certains métaux lourds (Kumar et al., 2015). Elles pourraient également être valorisées dans le traitement des fumées et la mitigation du CO<sub>2</sub> atmosphérique, à condition qu'elles soient valorisées ensuite (Mata et al., 2009). La biomasse ainsi obtenue peut servir à la production d'énergie, soit par combustion directe, soit par transformation en biodiesel, bioéthanol, ou biogaz.

### 1.2.2. Les pigments

De très nombreux pigments sont produits par les microalgues, dont la nature dépend à la fois des espèces et des conditions de culture, mais qui peuvent être répartis en trois familles distinctes : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines. Certains sont utilisés comme colorants

alimentaires naturels, dans les aliments ou dans les cosmétiques (rouges à lèvres, fards à paupière, eyeliner, etc.), d'autres possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes ou anticancéreuses qui laissent présager des applications cosmétiques, pharmaceutiques et médicales (Le Goff et al., 2019 ; Heydarizadeh et al., 2013).

Les chlorophylles sont les principaux pigments des microalgues, de par leur rôle dans la photosynthèse oxygénique. Elles absorbent principalement les lumières bleue et rouge. Présentes chez toutes les espèces, elles sont responsables de la couleur verte caractéristique du phylum Chlorophyta par exemple, et sont majoritairement utilisées pour leur pouvoir colorant.

Les caroténoïdes, qui se subdivisent en deux sous-groupes, les carotènes et les xanthophylles, sont des pigments dits « secondaires » de la photosynthèse, puisqu'ils transmettent l'énergie lumineuse qu'ils captent à la chlorophylle et en dissipent les excès pour la prémunir de la photodégradation. Seules quelques molécules de caroténoïde parmi les 400 connues sont utilisées aujourd'hui : le  $\beta$ -carotène (produit par *Dunaliella salina*, jusqu'à 14% de matière sèche), l'astaxanthine (produit par *Haematococcus pluvialis* (Boussiba et al., 1999), et dans une moindre mesure la lutéine, la zéaxanthine, le lycopène et la bixine (Vilchez et al., 2011). Elles sont utilisées pour leur pouvoir colorant (alimentation des salmonidés, coloration des œufs de volailles), mais présentent également un intérêt significatif en cosmétique et nutraceutique. En effet, le  $\beta$ -carotène est aussi connu sous sa dénomination de provitamine A, qui est d'une importance vitale pour la synthèse des composés rétiniens chez l'homme, tandis que l'astaxanthine, considérée actuellement comme l'un des antioxydants naturels les plus puissants (Vilchez et al., 2011), est utilisée dans de nombreuses préparations cosmétiques pour la peau et les cheveux, pour lutter par exemple contre la photo-oxydation de la peau par les UV (Koller et al., 2014). La bixine est également utilisée régulièrement pour la coloration de produits laitiers. Les caroténoïdes entrent enfin dans la composition des autobronzants et les préparations solaires (Koller et al., 2014).

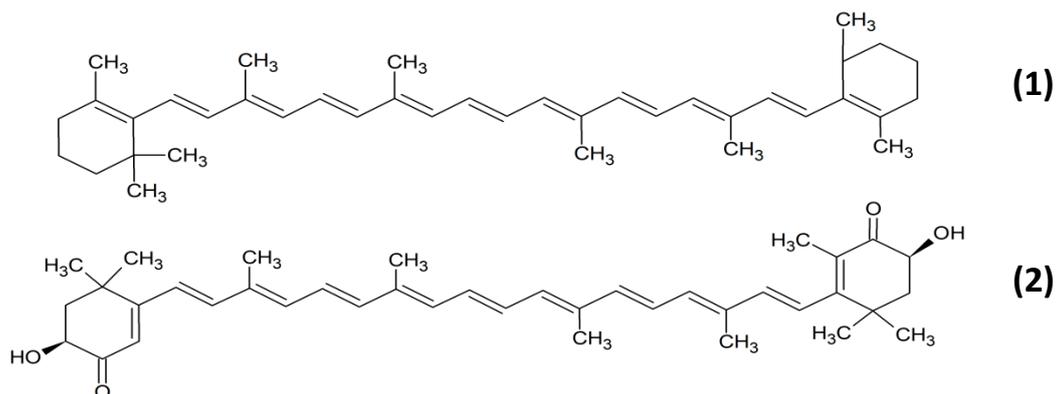


Figure 2 : Molécules de bêta-carotène (1) et d'astaxanthine (2)

Les phycobilines sont produites principalement par les cyanophyta et les rhodophyta. On distingue la phycocyanine (bleue) de la phycoérythrine (rouge). Principalement utilisées comme colorants alimentaires et en cosmétique, elles présentent également un grand intérêt pour l'industrie ainsi que pour les recherches fondamentale et clinique qui utilisent des techniques d'immunofluorescence. En effet, ces molécules sont utilisées comme marqueurs biocompatibles, seuls ou associés à différents anticorps, en cytométrie, microscopie, marquages immunitaires, etc. (Manirafasha et al., 2016).

### 1.2.3. Les vitamines

Bien que de nombreuses microalgues soient auxotrophes vis-à-vis des vitamines, certaines espèces sont capables d'en produire (Sathasivam et al., 2019). Entre autres, *Dunaliella salina*, outre la provitamine A, synthétise la thiamine (vitamine B1), la riboflavine (vitamine B2), la pyridoxine (vitamine B6), la biotine (vitamine B8), les vitamines C et E (tocophérols) (De Jesus Raposo et al., 2013). *Porphyridium cruentum* est riche en tocophérols. *Arthrospira sp*, *Haematococcus sp*, *Chlorella sp* (Bishop & Zubeck, 2012 ; Spolaore et al., 2006) produisent également la niacine (vitamine B3), l'acide pantothénique (vitamine B5), et l'acide folique (vitamine B9).

### 1.2.4. Les protéines et les sucres

Les carraghénanes et l'agar sont principalement produits à partir des macroalgues ; les alginates, certains polymères issus de la cellulose, de l'acide poly-lactique et du bio-polyéthylène sont produits par quelques espèces de microalgues (surtout du phylum Cyanophyta) et pourraient être utilisés dans la production de bioplastique (Khanra et al., 2018). Le  $\beta$ -1,3-glucane a des propriétés immunostimulantes, antioxydantes et joue un rôle dans la régulation du cholestérol sanguin chez l'homme. Quelques polysaccharides soufrés pourraient avoir des propriétés antibactériennes, antiadhésives, potentiellement utilisables dans des traitements anti-infectieux (Koller et al., 2014). De plus, les exopolysaccharides (EPS) sont les composés principaux des matrices extracellulaires sécrétées par les microalgues (Xiao & Zheng, 2016). Leurs compositions sont très variables d'une espèce à l'autre. Il s'agit dans l'immense majorité des cas d'hétéropolysaccharides, qui sont souvent ramifiés. De nombreux groupements fonctionnels comme l'acide glucuronique, l'acide uronique, des oses azotés (N-acétylglucosamine), ou des résidus sulfatés peuvent être associés aux hétéropolysaccharides et participent à leur rôle au sein de la matrice extracellulaire (Xiao & Zheng, 2016). Les EPS sont des composés prometteurs comme surfactant, émulsifiant et anti-adhésif biologiques. L'étude des EPS a également montré leur potentiel en tant qu'agents anti-inflammatoires et antibactériens, anti-tumoraux ou immuno-modulateurs (Xiao & Zheng, 2016). Enfin, la digestion et la fermentation des résidus de biomasse riches en sucres peuvent permettre d'obtenir du bioéthanol.

Certaines espèces comme *Arthrospira sp* (la spiruline) présentent des teneurs protéiques particulièrement élevées. En outre, leur profil en acides aminés est souvent comparable à celui d'autres végétaux (De Jesus Raposo et al., 2013), et constitue une alternative aux compléments alimentaires destinés aux athlètes et aux personnes qui suivent un régime alimentaire non carné. Les extraits protéiques réduiraient également les effets du vieillissement de la peau (Spolaore et al., 2006).

### 1.2.5. Les lipides, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés

Les lipides des microalgues ont été mondialement mis sur le devant de la scène au moment des crises pétrolières qui avaient entraîné une montée très importante des cours du pétrole, poussant les pays à envisager d'autres sources d'énergie et en particulier d'autres types de carburants, comme les biocarburants de deuxième et troisième génération. L'extraction des huiles et leur transestérification alcaline permet d'obtenir du biodiesel, alors que la digestion anaérobie peut produire du biogaz. Toutefois ces technologies, encore trop coûteuses, ne sont actuellement pas rentables économiquement, compte-tenu du cours du pétrole. Les recherches sur les lipides de microalgues s'intéressent également à leur potentiel de substitution aux huiles de poissons utilisées en industries

agro-alimentaire et pharmaceutique en raison de leur richesse en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC, plus de 20 carbones). Les huiles de poisson posent en effet des problèmes inhérents à la variabilité de leur qualité au cours de l'année et au fait que ce ne sont pas des ressources durables, car elles contribuent à la surexploitation des stocks halieutiques. En outre, les poissons ne synthétisent pas ou peu d'AGPI-LC, mais les accumulent dans leurs tissus en ingérant du phyto- et/ou du zooplancton qui en contiennent.

Les espèces de microalgues présentent des teneurs très variables en acides gras (1-50% de leur matière sèche, et jusqu'à 85% en conditions de stress (Santo-Sanchez et al., 2016, voir tableau 3) avec différents profils. Certaines possèdent de grandes quantités d'AGPI, en particulier dans leurs membranes (Santo-Sanchez et al., 2016), ainsi que des acides gras essentiels, principalement les acides eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA) (deux acides gras dits  $\omega$ 3), l'acide arachidonique et l'acide  $\gamma$ -linoléinique (deux acides gras dit  $\omega$ 6). Or, les organismes du règne animal ne disposent pas des enzymes leur permettant de synthétiser *de novo* les AGPI (même s'ils sont capables de transformer partiellement les chaînes carbonées) et doivent donc se procurer certains d'entre eux, appelés acides gras essentiels, dans leur alimentation (De Jesus Raposo 2013).

L'EPA joue un rôle essentiel chez l'homme puisqu'il est le point de départ de la voie de synthèse des eicosanoïdes, nécessaires à différentes fonctions du système immunitaire et cicatriciel, mais également à la prévention d'un certain nombre de maladies coronariennes (régulation de l'hypertension, thromboses, athérosclérose). Adjoint à une thérapie, l'EPA peut également atténuer certains troubles psychologiques (anxiété, dépression, schizophrénie) (Koller et al., 2014).

Le DHA est crucial pour le développement du fœtus, du nourrisson et de l'enfant, tout comme pour la santé de l'adulte : c'est en effet un composant structural majeur de nombreux organes (cerveau, yeux, testicules, systèmes nerveux et cardiovasculaire) (De Jesus Raposo 2013). Il aurait également des effets anticancéreux (Sun et al., 2013).

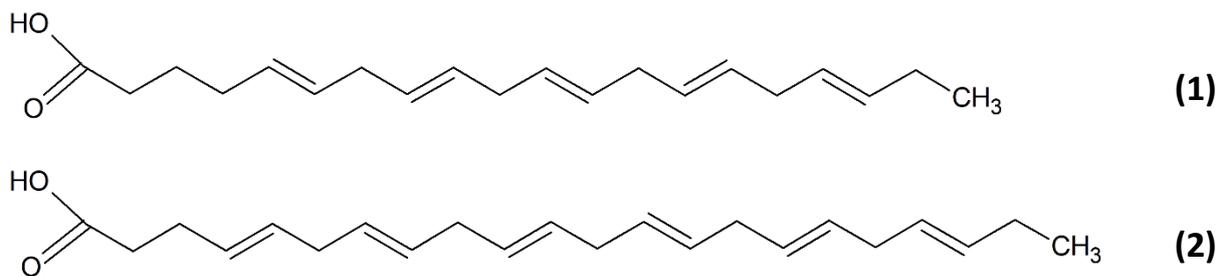


Figure 3 : Acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série des  $\omega$ 3 : l'EPA (1) et le DHA (2)

L'acide arachidonique, principalement incorporé dans les phospholipides membranaires, joue un rôle vasodilatateur et anti-inflammatoire (De Jesus Raposo 2013). Il est également nécessaire au développement des tissus musculaires (Koller et al., 2014).

Enfin, l'acide  $\gamma$ -linoléinique, précurseur des prostaglandines, est couramment utilisé dans le traitement des maladies auto-immunes, du diabète, de l'obésité, de l'hypertension, des allergies cutanées, de certaines arthrites et plus récemment dans les thérapies anti-cancéreuses, de par sa capacité à inhiber la croissance des tumeurs et des métastases (Sathasivam et al., 2019).

Grâce à leurs propriétés variées, les extraits lipidiques de microalgues sont utilisés comme ingrédients sur le marché des produits de beauté, et en particulier dans les soins de la peau et des cheveux : crèmes anti-âge, produits régénérant et émollients (Spolaore et al., 2006), etc. Des extraits

plus complexes sont également capables de stimuler la production de collagène par la peau (diminution des rides, Koller et al. 2016 ; Spolaore et al., 2006) ou la prolifération cellulaire dans l'épiderme (Spolaore et al., 2006). De manière générale, deux espèces occupent plus particulièrement le marché de la cosmétique : *Arthrospira sp* et *Chlorella sp*. Toutefois *Haematococcus sp* et *Dunaliella sp* sont aussi utilisées.

De plus, comme ils sont riches en acides gras polyinsaturés essentiels, ces mêmes extraits lipidiques peuvent avantageusement remplacer les huiles de poisson : dépourvues d'odeur ou de goût prononcés, leur utilisation est facilitée dans diverses préparations. A ce titre, les microalgues sont aussi entre les mains de l'industrie agro-alimentaire, puisqu'elles constituent des ingrédients de plus en plus utilisés pour élaborer des aliments « fonctionnels » (biscuits, pâtes, pain, yaourts, boissons, bonbons, etc.) (Pulz & Gross, 2004).

**Tableau 2 : Espèces de microalgues utilisées en industrie**

<b>Microalgues</b>	<b>Phylum d'appartenance</b>	<b>Utilisation</b> (Hemaiswarya et al., 2011 ; Mobin & Alam, 2017 ; Sigamani et al., 2016)
<i>Chlorella</i>	Chlorophytes	Production de caroténoïdes, de protéines, d'AGPI et de carbohydrates <i>Alimentation humaine et animale ; cosmétique ; pharmaceutique</i>
<i>Tetraselmis</i>		Biomasse entière, production de protéines - <i>Alimentation animale</i>
<i>Dunaliella</i>		Production de bêta-carotène et d'AGPI <i>Extraits et utilisation entière en alimentation animale</i>
<i>Haematococcus</i>		Production de pigments : astaxanthine, caroténoïdes <i>Alimentation humaine et animale</i>
<i>Scenedesmus</i>		Biomasse entière - <i>Alimentation animale</i>
<i>Isochrysis</i>	Prymnesiophytes	Biomasse entière- <i>Alimentation animale</i>
<i>Pavlova</i>		Production d'acides gras - <i>Alimentation animale</i>
<i>Nannochloropsis</i>	Heterokontophytes – Eustigmatochyceae	Production d'AGPI <i>Alimentation animale ; pharmaceutique</i>
<i>Chaetoceros</i>	Heterokontophytes -	<i>Alimentation animale</i>
<i>Thalassiosira</i>	Bacillariophyceae	<i>Alimentation animale</i>
<i>Skeletonema</i>		<i>Alimentation animale</i>
<i>Phaeodactylum</i>		Production de protéines, de lipides et d'acides gras <i>Nutrition ; biocarburants</i>
<i>Nitzschia</i>		<i>Alimentation animale</i>
<i>Odontella</i>		Production d'acides gras <i>Pharmaceutique ; cosmétique</i>
<i>Arthrospira</i>	Cyanophytes	Production de pigments : phycocyanines, production de protéines et d'AGPI <i>Alimentation humaine et animale ; cosmétiques</i>
<i>Porphyridium</i>	Rhodophytes	<i>Pharmaceutique, cosmétique</i>
<i>Schizochytrium</i>	Heterokontophytes -	<i>Alimentation humaine</i>

## 2. Les lipides chez les microalgues

### 2.1. Présentation des différentes familles de molécules

Les microalgues ont des teneurs et des compositions lipidiques très variées selon les espèces considérées.

Tableau 3 : Teneurs lipidiques (% biomasse sèche) de différentes espèces de microalgues

Genre	Teneur lipidique (% biomasse sèche)	Références
<i>Arthrospira</i>	4-9	D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016
<i>Pavlova</i>	5-31	Guihéneuf & Stengel, 2017 Bashir et al., 2019
<i>Chlorella</i>	15-63	Ghosh et al., 2016
<i>Nannochloropsis</i>	20-68	Ghosh et al., 2016
<i>Isochrysis</i>	23-34	Huerlimann et al., 2010
<i>Scenedesmus</i>	16-40	Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017

#### 2.1.1. Structure générale

Les lipides sont des macromolécules hydrophobes de grande taille, solubles dans des solvants organiques. Elles se répartissent en 3 classes selon leur polarité et leur structure : les lipides neutres, qui eux-mêmes se subdivisent en différentes familles (principalement les hydrocarbures, les cires, les stérols, les cholestérols et dérivés, les acides gras libres, et les glycérides (mono-, di- et triglycérides)), les glycéroglycolipides (ou glycolipides) et les glycérophospholipides (ou phospholipides), qui sont des lipides dits polaires.

Les glycérolipides ont la même structure de base : une molécule de glycérol sur laquelle sont greffés deux acides gras (par des liaisons esters) et un groupement polaire dans le cas des phospholipides et des glycolipides, et trois acides gras dans le cas des triglycérides.

Les acides gras (Cuvelier et al., 2004) sont des acides carboxyliques aliphatiques dont la chaîne carbonée comporte classiquement 12 à 24 atomes de carbone, même si de très longues chaînes (jusqu'à 36 carbones) ont été identifiées chez certaines microalgues, le plus souvent en nombre pair de carbone. Dans le monde marin, les acides gras de plus de 20 atomes de carbone et 4 insaturations sont fréquents, contrairement à ceux des règnes animal et végétal. On distingue les acides gras saturés, c'est-à-dire ne comportant pas de double liaison carbone-carbone, et les acides gras insaturés, qui en comportent une (mono-insaturés) ou plusieurs (polyinsaturés) (Fig. 4). Les doubles liaisons C=C ont la particularité de couder la chaîne aliphatique, ce qui peut jouer un rôle biologique important. En effet, les chaînes coudées prennent plus de place dans la membrane que les chaînes non coudées, ce qui fait qu'il y a plus d'espace entre les molécules. Une zone de la membrane riche en lipides contenant des acides gras polyinsaturés est donc plus fluide et plus souple, se déforme davantage et permet aux molécules de diffuser plus facilement à travers la membrane.

Plusieurs nomenclatures sont usitées pour ces molécules : la nomenclature  $\Delta$ , principalement utilisée en chimie, la nomenclature  $\omega$ , principalement utilisée en biologie et qui est celle que j'utiliserai dans ce document, et la nomenclature d'usage (acide palmitique, acide linoléique...).

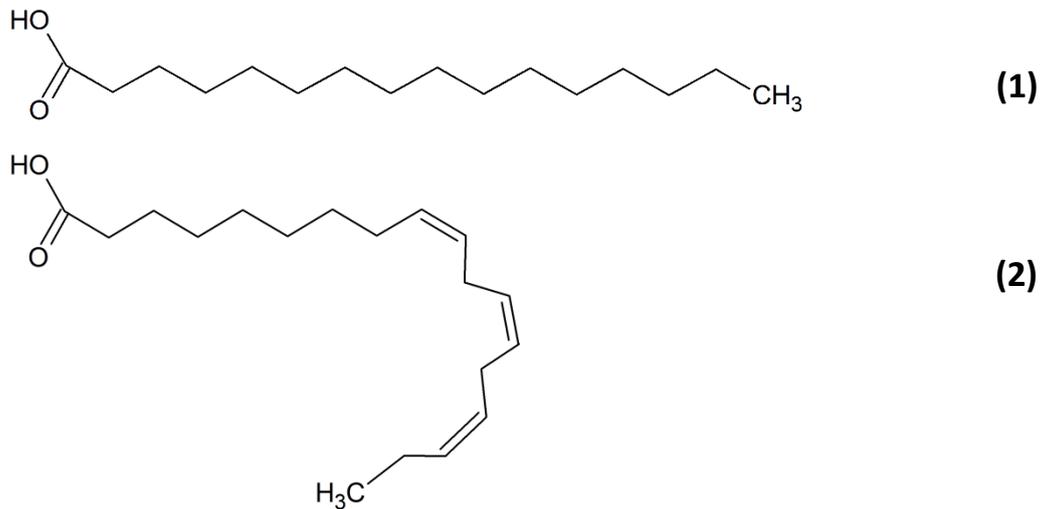
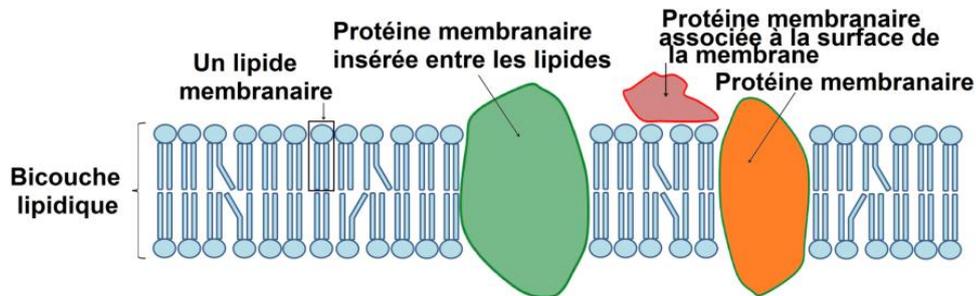


Figure 4 : exemple d'un acide gras saturé (16:0 ou acide palmitique, (1)) et d'un acide gras polyinsaturé (18:3 ω<sub>3</sub> ou acide linoléique, (2))

### 2.1.2. Lipides de structure

Les lipides de structure sont les glycolipides et les phospholipides : comportant un groupement polaire, ils s'assemblent spontanément en bicouches lipidiques et forment ainsi la base de toutes les membranes biologiques dans lesquelles s'insèrent différents composés tels que les protéines membranaires (Fig. 5).



Structure schématique d'une membrane biologique, vue "en coupe" (aspect 2D)

Figure 5 : Schéma structurel d'une membrane biologique

Le groupement polaire des phospholipides est composé d'un groupement phosphate, sur lequel est fixé un alcool : choline, sérine, éthanolamine, inositol principalement (Figure 6). Il dépend de l'espèce étudiée et de la membrane dans laquelle sera inséré le phospholipide. Les phospholipides sont donc très polaires et entrent dans la composition de toutes les membranes plasmiques, c'est-à-dire celles qui isolent la cellule du milieu extérieur, et celles qui sont invaginées dans la cellule.

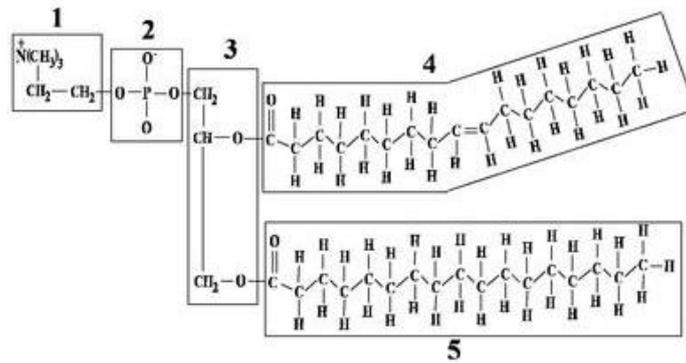


Figure 6 : Schéma structurel d'un phospholipide : alcool fixé au phosphate (1), phosphate (2), glycérol (3), acides gras (4 et 5)

Le groupement polaire des glycolipides est un assemblage de sucres plus ou moins complexes, souvent le galactose chez les microalgues (monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG)). Les membranes des chloroplastes sont principalement constituées de MGDG qui forment des structures particulières hexagonales (Latowski et al., 2002 ; Goss et al., 2005), ainsi que de DGDG et de sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), qui s'assemblent en bicouche et forment donc la base des membranes chloroplastiques. L'enveloppe externe des chloroplastes contient aussi des phospholipides (phosphatidylglycérol et phosphatidylcholine) (Mühlroth et al., 2013).

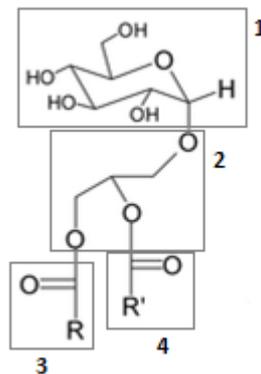


Figure 7 : Structure d'un glycolipide : sucre fixé au glycérol (1), glycérol (2), acides gras (3 et 4)

### 2.1.3. Lipides de réserve

Les lipides de réserve constituent un stockage d'énergie et de carbone extrêmement optimisé : en effet, de par leur nature hydrophobe, ils ne piègent pas d'eau et ont donc des valeurs énergétiques proches de 40 KJ/g, contre moins de 20 KJ/g pour les sucres, par exemple (Zhu et al., 2016).

Les principaux lipides de réserve sont les triglycérides et les cires. Les cires sont des réserves énergétiques de long terme, produites par des organismes soumis à d'importantes variations de leurs ressources alimentaires, tandis que les triglycérides sont des réserves énergétiques de routine, synthétisées par des organismes qui s'alimentent régulièrement. Ils sont métabolisés par  $\beta$ -oxydation, ce qui permet de produire de l'ATP par respiration ainsi que des molécules réductrices utilisables dans d'autres voies métaboliques.

Quelques études (Guschina & Harwood, 2006 ; Garnier et al., 2016 ; Huang et al., 2019) suggèrent que les synthèses des triglycérides et des lipides polaires sont partiellement couplées. Ainsi, les triglycérides peuvent aussi servir d'intermédiaires pour la synthèse de lipides polaires, permettant

des modifications membranaires très rapides lorsque les cellules sont confrontées à des variations brutales de leur environnement. Par ailleurs, les lipides polaires peuvent être partiellement dégradés et réincorporés dans les triglycérides quand les cultures sont en phase stationnaire.

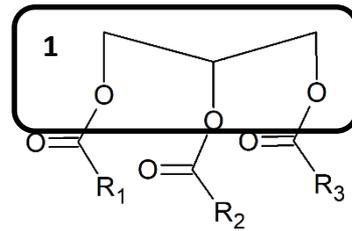


Figure 8 : Structure d'un triglycéride : glycérol (1), acides gras (R1, R2 et R3)

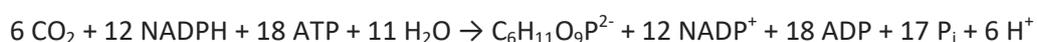
## 2.2. Métabolisme et voies de synthèse

De nombreuses synthèses et travaux chez des microalgues modèles comme *Phaeodactylum tricornutum* (Mühlroth et al., 2013) ou *Chlamydomonas reinhardtii* (Guschina & Harwood, 2006 ; Fan et al., 2011 ; Yang et al., 2018), ainsi que la production de données génomiques, et en particulier l'édition du génome complet de 7 microalgues (Harwood & Guschina, 2009), ont permis de vérifier un certain nombre d'hypothèses sur les principales voies de synthèse des lipides.

Les microalgues sont autotrophes vis-à-vis du carbone, ce qui veut dire qu'elles utilisent du carbone inorganique pour synthétiser leurs molécules. C'est l'association de la chaîne de transport des électrons et du cycle de Calvin, dans les chloroplastes, qui permet la fixation du CO<sub>2</sub>. La chaîne de transport des électrons, installée dans la membrane thylacoïdale, permet en effet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (ATP et NADPH). Cette énergie est ensuite utilisée lors du cycle de Calvin pour former des molécules à 3 ou 6 carbones qui entrent dans les différentes voies métaboliques de la cellule.

Le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons en conditions normales est le suivant : l'absorption des photons par la chlorophylle du photosystème II (PS II) permet l'oxydation de 2 molécules d'eau (photophosphorylation de l'eau). Cela a pour effet de capter 4 électrons et de libérer 4 protons H<sup>+</sup> et une molécule de dioxygène O<sub>2</sub> (Ivanov et al., 2012). Les quatre électrons sont transmis à la plastoquinone, qui les transporte jusqu'au complexe du cytochrome b<sub>6</sub>f. Le cytochrome b<sub>6</sub>f est une pompe à protons, qui transmet les électrons à la plastocyanine tout en transportant des protons à travers la membrane thylacoïdale. La plastocyanine, enfin, transporte les électrons jusqu'au photosystème I (PS I). La chlorophylle du PS I, excitée grâce à l'absorption de photons, permet le transfert des électrons à la ferrédoxine, qui est finalement utilisée par la ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase pour réduire le NADP<sup>+</sup> en NADPH (Guidi et al., 2017). Les protons accumulés au cours du transfert des électrons sont utilisés par l'ATP synthase, pour produire de l'ATP.

Le cycle de Calvin-Benson-Bassham, couramment nommé « cycle de Calvin », utilise l'ATP et le NADPH pour permettre la fixation du CO<sub>2</sub> et la production de glucose selon l'équilibre suivant :



avec P<sub>i</sub> le phosphate inorganique. En pratique, la Rubisco, qui est l'enzyme-clé du cycle de Calvin, catalyse la fixation de trois molécules de CO<sub>2</sub> sur trois molécules de ribulose-1,5-bisphosphate et dissociation des molécules obtenues en six molécules de 3-phosphoglycérate (Michelet et al., 2013).

Certaines molécules de 3-phosphoglycérate permettent la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate, tandis que les autres sont réduites en triose-phosphate et entrent dans différentes voies métaboliques. Parmi elles, la glycolyse permet la production de glucose et de pyruvate.

La synthèse *de novo* des lipides chez les microalgues commence par celle des acides gras dans les chloroplastes, catalysée par de nombreuses enzymes (Mühlroth et al., 2013 ; Guschina & Harwood, 2006 ; Harwood & Guschina, 2009). Le point de départ de la voie de synthèse est l'acétyl-CoA, qui soit provient du pool intracellulaire, soit est produit dans le chloroplaste par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDC) à partir du pyruvate issu du cycle de Calvin. L'acétyl-CoA est ensuite lui-même transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase, homomériques en l'état actuel des connaissances, contrairement aux plantes supérieures) puis en malonyl-ACP par la malonyl-CoA:ACP transacylase (MAT). Le malonyl-ACP entre ensuite dans le premier cycle de synthèse des acides gras. Il y a alors deux possibilités :

- il est condensé avec un acétyl-CoA pour former le 3-kétoacyl-ACP par la 3-ketoacyl-ACP synthase (KAS), qui est lui-même réduit en 3-hydroxyacyl-ACP sous l'action de la 3-ketoacyl-ACP réductase (KAR), puis déshydraté en trans-enoyl-ACP par la 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase (DH) et réduit à nouveau par l'énoyl-ACP réductase (ENR) en butyryl-ACP, qui est le précurseur de toutes les chaînes aliphatiques d'acide gras.
- il est condensé sur un butyryl-ACP ou sur une chaîne aliphatique préexistante, selon le même cycle et sous l'action des mêmes enzymes (formation d'un 3-kétoacyl-ACP, puis réduction en 3-hydroxyacyl-ACP, déshydratation en trans-enoyl-ACP et enfin réduction en acyl-ACP), afin d'allonger de deux unités la longueur de sa chaîne carbonée jusqu'à atteindre, dans la majorité des cas, des chaînes de 16 ou 18 carbones.

Sous l'action de la thioestérase acyl gras-ACP (FAT), les groupes acyles de ces chaînes aliphatiques sont à nouveau remplacés par des groupes coenzyme A. Les produits de ce premier cycle de synthèse sont donc des acides gras saturés. Ils sont stockés dans le chloroplaste ou exportés dans le cytosol ; ils peuvent, dans le cas des chaînes à 18 carbones, être désaturés une première fois avant d'être exportés dans le cytosol. Ils sont ensuite, pour certains, importés dans le réticulum endoplasmique pour permettre la synthèse des acides gras insaturés à longues chaînes grâce à l'action d'enzymes spécifiques : désaturases  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 4$ ,  $\Delta 8$ , élongases. Cet arsenal enzymatique très complet leur permet de synthétiser *de novo* n'importe quel acide gras, ce qui n'est pas le cas, par exemple, chez les mammifères. Les microalgues sont les seuls organismes à posséder certaines enzymes comme la désaturase  $\Delta 4$ .

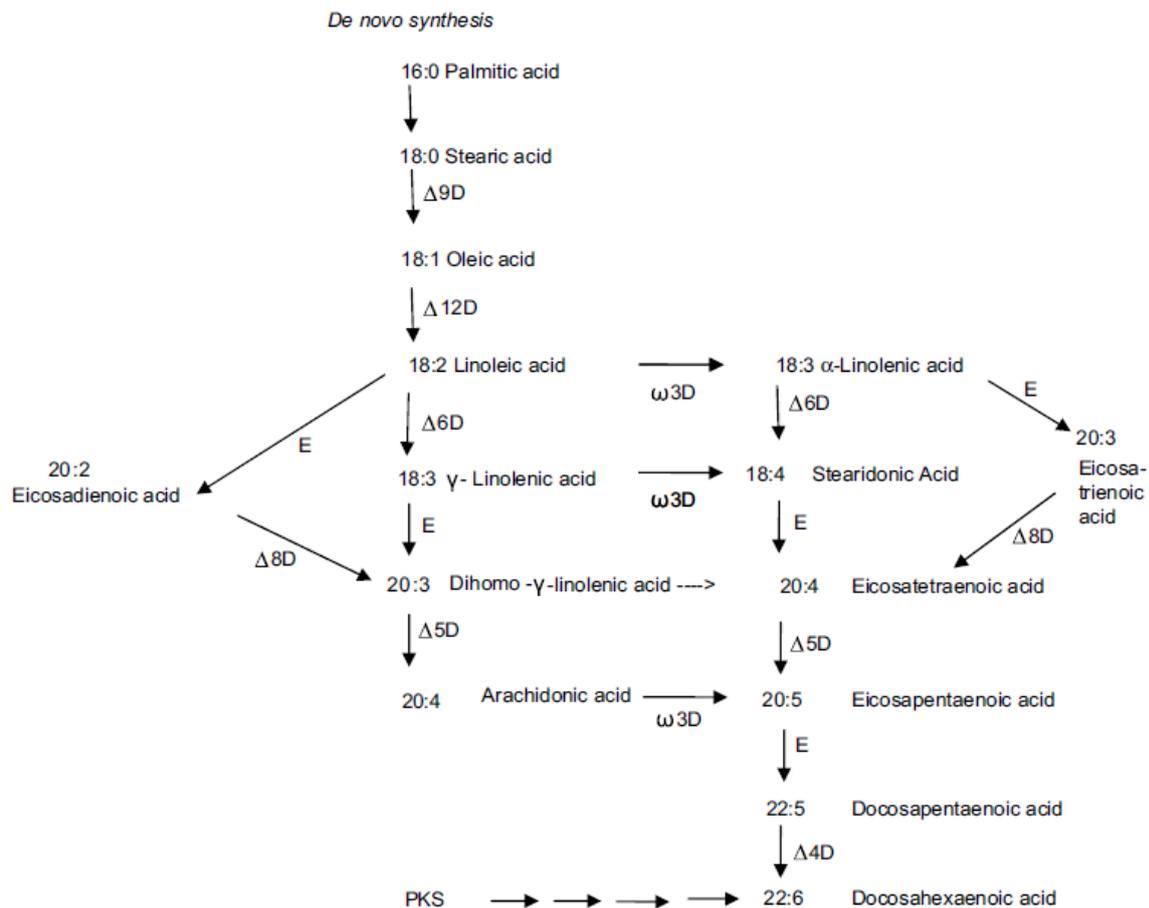


Figure 9 : Schéma-bilan des voies de synthèse des AGPI dans le réticulum endoplasmique; extrait de Harwood & Guschina (2009) – D : désaturases, E : élongases, PKS : polyketide synthase. L'existence de cette dernière voie n'a pas encore été démontrée chez les microalgues.

La synthèse des lipides proprement dite s'effectue dans différents organites selon le type de lipides produits. Dans le cas des glycérolipides, deux voies de synthèse très proches coexistent chez les microalgues : les voies dites « eucaryote » et « procaryote », même si certaines études nuancent ces terminologies pour les galactosylglycérides (Mühlroth et al., 2013). Ces deux voies ont comme point de départ le glycérol-3-phosphate (G3P) et utilisent les mêmes enzymes : la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) (estérification d'un acide gras en position *sn*-3), la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (estérification d'un acide gras en position *sn*-2), la phosphatidate phosphatase (suppression du groupement phosphate en position *sn*-1) et la phosphatidate cytidyltransférase (Coleman & Lee, 2004). Toutefois, elles diffèrent par leur localisation au sein de la cellule et par la longueur des acides gras condensés au glycérol (Mühlroth et al., 2013). En effet, la voie eucaryote est réalisée dans le réticulum endoplasmique (Sato et al., 2003) tandis que la voie procaryote a lieu dans le chloroplaste. De plus, en raison de leurs affinités spécifiques, la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase du cytosol estérifie des acides gras à 18 carbones, alors que celle des chloroplastes estérifie des acides gras à 16 carbones.

Les acides phosphatidiques ou les diacylglycérides (DAG) issus de la voie eucaryote sont importés dans le réticulum endoplasmique (voie de synthèse Kennedy) pour former la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, puis la phosphatidylsérine ou les triglycérides (Gibellini & Smith, 2010).

Les phospholipides et les triglycérides ainsi synthétisés par cette voie métabolique ont donc principalement une structure de type eucaryote.

Les glycolipides (MGDG, DGDG, SQDG) sont synthétisés dans les chloroplastes. Les diacylglycérides peuvent soit provenir de la voie procaryote et donc être déjà présents, soit être importés depuis la voie eucaryote. Il existe donc des glycolipides des deux types, mais la majorité d'entre eux est issue de la voie procaryote (Latowski et al., 2002 ; Goss et al., 2005).

La dégradation des triglycérides par  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes ou les mitochondries permet de produire de l'énergie sous forme d'ATP, et libère des intermédiaires (acétate, acétyl-CoA) qui peuvent ensuite être réintroduits dans différents cycles métaboliques.

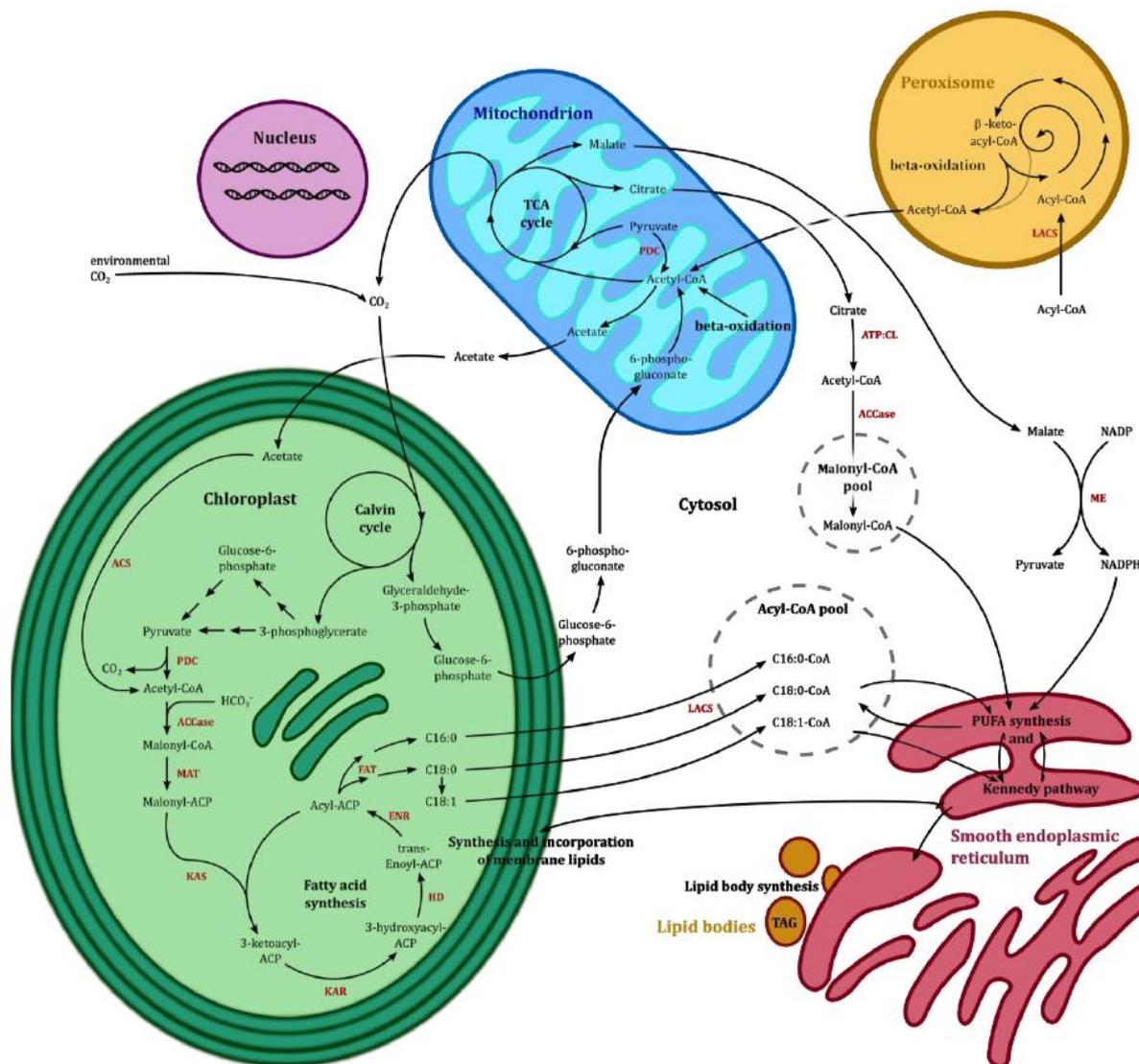


Figure 10 : Schéma-bilan extrait de Mühlroth et al. (2013). Les différents organites représentés sur ce schéma ont tous un rôle dans les voies métaboliques de synthèse et de dégradation des lipides : les chloroplastes sont le lieu de synthèse des acides gras et des glycolipides, le réticulum endoplasmique celui des phospholipides ainsi que des triglycérides, les mitochondries et les peroxysomes permettent la dégradation des lipides pour produire de l'énergie.

### 2.3. Quels paramètres affectent la production et la composition des lipides (AGPI à longues chaînes notamment) dans les microalgues ?

De nombreuses études ont montré que l'état physiologique des cellules impacte significativement la production de lipides et leur composition. De nombreux facteurs sont susceptibles d'affecter le métabolisme lipidique : limitation, voire carence, en azote ou en phosphore, température, pH, salinité, régime lumineux, concentration en dioxyde de carbone dissous, source de carbone, métaux, etc. Toutefois, les réponses physiologiques à ces stress sont variables d'une espèce à l'autre (Rodolfi et al., 2009 ; Zhu et al., 2016 ; Sun et al., 2018).

#### *Limitations et carences en macronutriments : azote et/ou phosphore*

C'est le moyen le plus employé pour provoquer une accumulation de lipides au sein des cellules, cette accumulation étant souvent obtenue grâce à une culture en deux phases (Sun et al., 2018). La première, conduite en milieu non limitant, permet une croissance optimale (montée en biomasse) et l'obtention rapide de cultures très concentrées, puis la deuxième, en milieu limité ou carencé, permet de déclencher l'accumulation de lipides, mais s'accompagne d'un ralentissement significatif ou d'un arrêt de la croissance. Les limitations ou carences nutritives favorisent l'accumulation de lipides neutres, notamment de triglycérides, aux dépens des lipides polaires (Rodolfi et al., 2009 ; Zhu et al., 2016).

**Carence en azote** – C'est la plus étudiée. La plupart des espèces y répondent en augmentant considérablement la production des lipides de réserve (Griffiths & Harrison, 2009 ; Rodolfi et al., 2009) : en effet, la disparition de l'azote inorganique entraîne un arrêt de la synthèse protéique, alors que la photosynthèse perdure encore un temps. Le déséquilibre qui se crée entre les pools d'azote et de carbone intracellulaires entraîne la synthèse d'une grande quantité de molécules énergétiques riches en carbone mais non azotées, comme par exemple les lipides de réserves et certains carbohydrates comme l'amidon. Cela a aussi pour conséquence de modifier le rapport entre lipides de réserve et lipides membranaires. Enfin, il semblerait que la composition en acides gras soit aussi impactée, avec une diminution significative de leur degré d'insaturation (particulièrement les AGPI) (Roleda et al., 2013).

**Carence en phosphore** – Elle entraîne une réponse similaire à celle de la carence en azote, mais qui met plus de temps à se manifester (Rodolfi et al., 2009). Comme pour l'azote, la carence en phosphate inorganique entraîne l'arrêt de la synthèse des protéines, des acides nucléiques, et également des phospholipides. Cela se traduit par une surproduction de molécules de réserve non phosphatées, et par une modification de la composition des membranes plasmiques. En effet, les phospholipides, qui sont leurs constituants principaux, sont progressivement remplacés par des glycolipides (non phosphatés) et des lipides bêtaïnés (Guschina & Harwood, 2006).

#### *Température*

La réponse à la température des microalgues est relativement complexe, car ce paramètre influence la totalité de leurs voies métaboliques (cinétique des enzymes, dégradation des protéines). L'impact des changements de température sur les lipides dépend fortement de l'espèce. Dans certains cas, les lipides totaux augmentent avec une élévation de la température, alors que dans d'autres cas ils diminuent (Renaud et al., 2002 ; Guschina & Harwood, 2006 ; Roleda et al., 2013). En ce qui concerne les acides gras, il semblerait qu'une augmentation provoque un raccourcissement de la longueur des

chaines carbonées et une diminution du degré d'insaturation. Cela peut être mis en relation avec les fonctions biologiques des lipides : en effet, les glycérolipides sont les constituants majeurs des membranes. L'augmentation du nombre d'AGPI au sein des membranes lorsque la température diminue permet de maintenir leur fluidité, et donc de préserver l'intégrité des cellules ainsi que les échanges gazeux et chimiques nécessaires à leur fonctionnement.

### **Salinité**

De nombreuses espèces de microalgues tolèrent mal les variations de salinité, qui entraînent des chocs osmotiques et/ou un stress oxydatif important. Les espèces dites halotolérantes comme *Dunaliella salina* font toutefois exception. Même si les réponses métaboliques varient d'une espèce à l'autre, il semble que de petites variations de la salinité impactent à la fois la teneur en lipides totaux et les rapports en acides gras saturés/acides gras insaturés (Nedbalova et al., 2016 ; Zhu et al., 2016).

### **Régime lumineux**

Les microalgues ont des efficacités photosynthétiques variables, chaque espèce possédant une plage d'intensités optimales. Toutefois, il semble que des intensités lumineuses élevées (dans la plage relative de chaque espèce) provoquent l'accumulation de lipides, tandis que des intensités lumineuses sub-optimales, en plus de limiter leur croissance, réduisent la production de lipides totaux (Zhu et al., 2016).

Les différentes classes lipidiques ne semblent pas être impactées de la même manière par les variations d'intensité lumineuse (Guihéneuf et al., 2009). Les glycolipides, qui entrent dans la constitution des membranes chloroplastiques où se réalise la photosynthèse, seraient davantage impactés que les lipides neutres et les phospholipides. Les acides gras sont également affectés mais les effets diffèrent d'une espèce à l'autre (Gim et al., 2016 ; Guihéneuf et al., 2009).

### **Source de carbone**

La plupart des espèces de microalgues sont autotrophes strictes vis-à-vis du carbone, même si certaines sont capables d'assimiler le carbone à partir de sources organiques (hétérotrophie, mixotrophie). Vouloir utiliser une source de carbone organique pour la production de microalgues limite donc drastiquement le choix des espèces que l'on peut étudier.

Deux stratégies sont possibles quant au choix de la source de carbone : soit utiliser une source uniquement organique (hétérotrophie), soit utiliser un mélange de sources organique et inorganique (mixotrophie). Il y a peu d'études où les microalgues sont cultivées en hétérotrophie stricte, par contre l'impact de la mixotrophie sur la croissance et la composition des cultures est davantage étudiée. Ainsi, *Chlorella vulgaris* (Yeh et al., 2012) et *Isochrysis galbana* (Babuskin et al., 2014 ; Alkhamis & Qin, 2013) se développent mieux en mixotrophie avec du glucose qu'en autotrophie stricte. Elles peuvent également utiliser du glycérol, mais la croissance de *C. vulgaris* est moins bonne qu'avec le glucose ; les résultats pour *I. galbana* sont contradictoires entre l'étude de Babuskin et al. (2012) et celle de Alkhamis & Qin (2013). Par contre, la culture en mixotrophie sur acétate ne modifie pas la croissance de *I. galbana* par rapport à l'autotrophie (Alkhamis & Qin, 2013). *Tetraselmis suecica* atteint une biomasse plus importante en mixotrophie sur glucose qu'en autotrophie stricte (Azma et al., 2011).

La production de lipides chez *I. galbana* semble être fonction du type et de la concentration du carbone organique. Babuskin et al. (2014) et Cheirslip & Torpee (2012) ont en effet constaté que la production lipidique diminue à partir d'une certaine concentration (4g/L de glucose pour Babuskin et al.). De plus, la production de lipides est plus élevée avec en mixotrophie sur glucose qu'en

mixotrophie sur glycérol. La composition en acides gras est également modifiée lorsque les cultures sont cultivées en mixotrophie : Babuskin et al. (2012) ont constaté un enrichissement en acides gras saturés et un appauvrissement en acides gras polyinsaturés. Chez *Tisochrysis lutea*, qui est une espèce très proche de *I. galbana*, les résultats de culture en mixotrophie sont également nuancés, tant pour l'impact sur la croissance des cultures que sur leur composition lipidique. Hu et al. (2018) montrent de plus qu'en mixotrophie, le carbone de source organique n'est que très peu incorporé dans les lipides.

On peut donc constater que la nature de la source de carbone a des effets variables selon les espèces considérées, quand celles-ci sont capables d'utiliser une source de carbone organique.

### **Stress oxydatif**

Le stress oxydatif est provoqué par l'accumulation dans la cellule d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'anion superoxyde  $O_2^-$ , les ions hydroxyles  $HO^-$  et l'oxygène singulet (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017). Cette accumulation est le plus souvent induite par un stress, résultant d'un choc halin (Pancha et al., 2015) ou de la présence de certains métaux, comme le cuivre (Sabatini et al., 2009) par exemple.

En effet, les cellules produisent naturellement de petites quantités de ROS (Marshall et al., 2005a) dans certains organites comme les chloroplastes, les mitochondries ou les peroxysomes (Lesser, 2006 ; Moller, 2001 ; Corpas et al., 2001) :

- Les membranes thylakoïdales contiennent les composés des chaînes photosynthétiques. Or, différentes protéines peuvent coproduire des ROS lors de la photosynthèse. Le centre réactionnel du photosystème II, les sites de réduction du photosystème I et de la photo-oxydation de la protéine D1 produisent ainsi des anions superoxydes  $O_2^-$  et des ions hydroxyles  $HO^-$  (Lesser, 2006).
- La production de ROS dans les mitochondries est due à la respiration cellulaire (Marshall et al., 2005a et 2005b) et au cycle d'oxydation-réduction du NADPH. Ce sont principalement des anions superoxydes  $O_2^-$ , mais qui sont très rapidement transformés en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Lesser, 2006).
- Les peroxysomes permettent de dégrader les acides gras par  $\beta$ -oxydation. La première étape de cette voie de dégradation, qui permet l'oxydation des acides gras insaturés, génère une molécule de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Corpas et al., 2001 ; Lesser, 2006).

Même si les ROS peuvent être des molécules-signal au sein de la cellule (Corpas et al., 2001 ; Lesser, 2006), ils provoquent aussi l'oxydation des lipides insaturés, des protéines et de l'ADN (Lesser, 2006). L'oxydation des lipides est particulièrement problématique pour la cellule, car ils composent les membranes cellulaires et intracellulaires. Leur oxydation modifie donc le degré de saturation, et par conséquent la fluidité des membranes (Lesser, 2006). Cela peut entraîner une modification des flux transmembranaires, et donc affecter les différentes voies métaboliques. En parallèle, il semblerait que la peroxydation des lipides mitochondriaux a des effets sur la production d'ATP, l'activité enzymatique de l'organite et l'initiation des voies d'apoptose (Green & Reed, 1998).

Les cellules possèdent donc plusieurs mécanismes pour dégrader les ROS et ainsi se détoxifier. Différentes enzymes permettent une élimination active des ROS (Lesser, 2006 ; Marshall et al., 2005). La superoxyde dismutase (SOD) permet ainsi de catalyser la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :  $2 O_2^- + 2 H^+ = H_2O_2 + O_2$

Le peroxyde d'hydrogène est dissocié en eau et oxygène par la catalase (CAT) et les peroxydases, la principale étant l'ascorbate peroxydase (APX). D'autres familles de molécules peuvent aussi détoxifier passivement la cellule, comme les molécules antioxydantes. On peut citer les polyphénols, la vitamine C (acide ascorbique), les caroténoïdes, la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et un acide aminé, la proline (Lesser, 2006 ; Marshall et al., 2005). La proline permet en effet de capter les ions  $\text{OH}^-$  qui se forment lorsque que les anions superoxydes s'accumulent. La vitamine C réagit avec le peroxyde d'hydrogène, les anions superoxyde et les ions hydroxyles. Les polyphénols agiraient à plusieurs niveaux : en tant que co-substrat pour les peroxydases, en réduisant la fluidité des membranes intracellulaires (ce qui limite la diffusion des molécules) et en modifiant les cinétiques d'oxydation (Lesser, 2006 ; Marshall et al., 2005).

Toutefois, dans certaines conditions de culture sub-optimales, la cellule n'arrive pas à se détoxifier suffisamment rapidement, les ROS s'accumulent, générant un stress oxydatif. Les cellules plus résistantes au stress oxydatif supportent des quantités de ROS intracellulaires plus élevées. Cela peut signifier que le stress oxydatif se met en place plus tardivement ou qu'il est moins intense lorsque les cellules sont en conditions sub-optimales. Or, Sun et al. (2018) et Ren et al. (2017) ont montré qu'un stress oxydatif modéré permet une meilleure accumulation de lipides et de PUFAs, plus particulièrement de DHA au sein des cellules de *Cryptocodinium cohnii* et *Schizochytrium* sp. En effet, les lipides sont mieux protégés contre l'oxydation et restent donc insaturés.

### 3. Différentes méthodes de culture des microalgues

Il existe quatre méthodes de culture « classique » des microalgues : le batch, le fed-batch, le chimostat et le turbidostat.

#### 3.1. La culture en batch

Ce mode de culture est constitué d'un système semi-fermé dans lequel le milieu de culture est apporté en une seule fois au début de l'expérience, et où les seuls échanges avec l'extérieur du réacteur sont de nature gazeuse (air,  $\text{CO}_2$  entre autres). Les conditions de croissance évoluent donc au cours du temps : au fur et à mesure que la culture croît, la turbidité augmente et les nutriments, consommés, ne font que décroître. L'augmentation de turbidité au sein de la culture conduit à une réduction de la quantité de photons disponibles pour chaque cellule (photo-ombrage). Certains nutriments et notamment les macronutriments (nitrate, phosphate) se raréfient, voire disparaissent du milieu. La diminution des nutriments et de la lumière disponible pour chaque cellule a un effet direct sur leur croissance : cette dernière ralentit progressivement au fur et à mesure de la raréfaction des ressources, lesquelles limitent alors de la croissance. La culture passe ainsi par différents stades physiologiques caractéristiques (fig. 11).

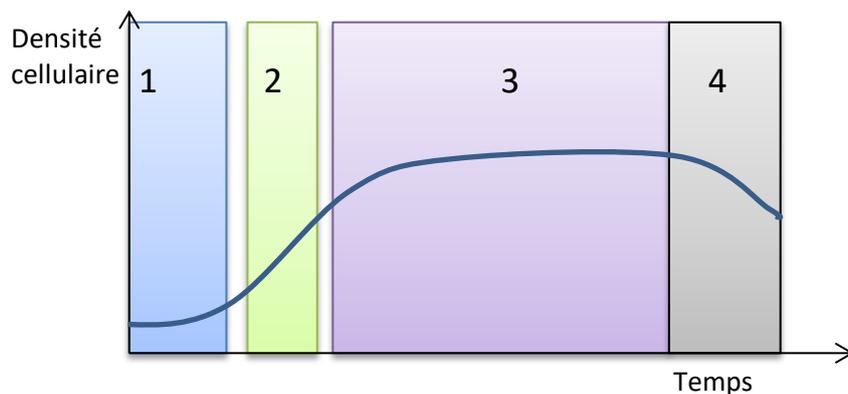


Figure 11 : Courbe de croissance en batch et ses différents stades physiologiques : phase de latence (1), phase de croissance exponentielle (2), phase stationnaire (3) et sénescence (4)

Immédiatement après avoir été inoculées, les microalgues traversent une période d'adaptation aux nouvelles conditions de culture (phase de latence) pendant laquelle il n'y a pas ou peu de croissance. Ensuite, puisque les ressources nutritives et lumineuses ne sont pas limitantes, elles entrent dans une phase de croissance exponentielle, jusqu'à ce que la limitation par l'un ou plusieurs paramètres de culture ralentissent progressivement la croissance. Pendant la phase stationnaire, la croissance apparente est nulle : soit les cellules ne se divisent plus, soit la croissance est compensée par une mortalité équivalente. Enfin, durant la phase de sénescence, la mortalité l'emporte largement sur la division, et l'effectif de la population décroît. Avec ce mode de culture, les cellules sont donc dans un état physiologique qui évolue en permanence, et ne peuvent jamais connaître un état d'équilibre.

### 3.2. La culture semi-continue : le fed-batch

Le mode de culture en fed-batch consiste en une succession de cultures en batch (fig. 12) : une partie de la culture est transférée à intervalles réguliers dans du milieu neuf.

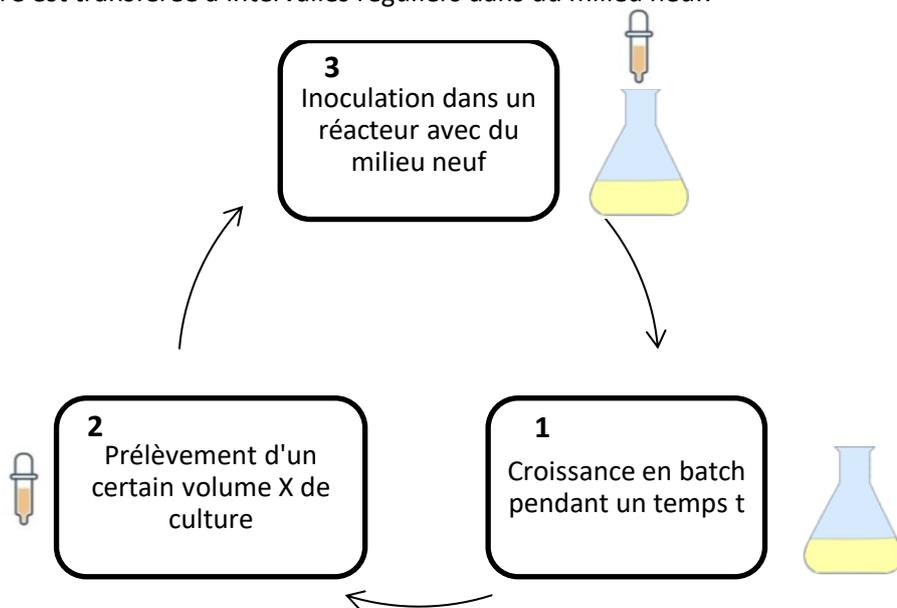


Figure 12 : Méthode de culture en fed-batch. Une population est cultivée en batch (1) pendant un temps t donné, puis un volume X de cette culture est transféré dans un nouveau réacteur (2) contenant du milieu neuf. La nouvelle culture est de nouveau laissée en batch pendant un temps t, puis le cycle recommence avec l'inoculation d'un nouveau réacteur.

Ce mode de culture se situe entre la culture en batch et la culture en continu : plus le renouvellement est fréquent, plus ce mode se rapproche d'une culture continue, tout en étant plus facile à mettre en œuvre. Toutefois, le stress induit par les repiquages successifs ne permet pas d'obtenir un réel état d'équilibre.

### 3.3. Les cultures en continu : chémostat et turbidostat

Le chémostat et le turbidostat sont des modes de culture en continu : il y a en permanence un apport de milieu nutritif dans le réacteur, et donc une évacuation permanente d'une partie de la culture pour maintenir un volume constant (fig. 13). Le principe de ces méthodes est d'atteindre et de maintenir un état d'équilibre stable pour la culture grâce à ce renouvellement. Dans le cas du chémostat, un élément essentiel pour la croissance (e.g. nutriment ou lumière) sera présent en faible quantité par rapport aux autres. Cet élément sera donc le facteur limitant la croissance et c'est lui qui régira l'état d'équilibre. Dans le cas du turbidostat, l'équilibre est forcé par la dilution.

**Chémostat** - La méthode de culture en chémostat a été mise au point simultanément par Monod (1950) et Novick & Szilard (1950) pour étudier les bactéries (Gresham & Hong, 2015). Les premières phases de croissance sont les mêmes que pour une culture en batch ou en fed-batch. Après inoculation, la culture passe par la phase de latence puis entre en phase exponentielle de croissance. A ce stade, tous les nutriments sont présents en excès et ne sont donc pas limitants. Toutefois, et à la différence des deux premières méthodes de culture, la culture est renouvelée en permanence grâce à l'apport de milieu de culture par une pompe. La concentration cellulaire et la concentration des nutriments dans le photobioréacteur varient donc en fonction de plusieurs paramètres. La concentration cellulaire tend à augmenter avec la croissance (division cellulaire), mais à diminuer avec la dilution par le milieu, tandis qu'inversement les concentrations des nutriments diminuent avec la croissance (consommation) mais augmentent avec la dilution.

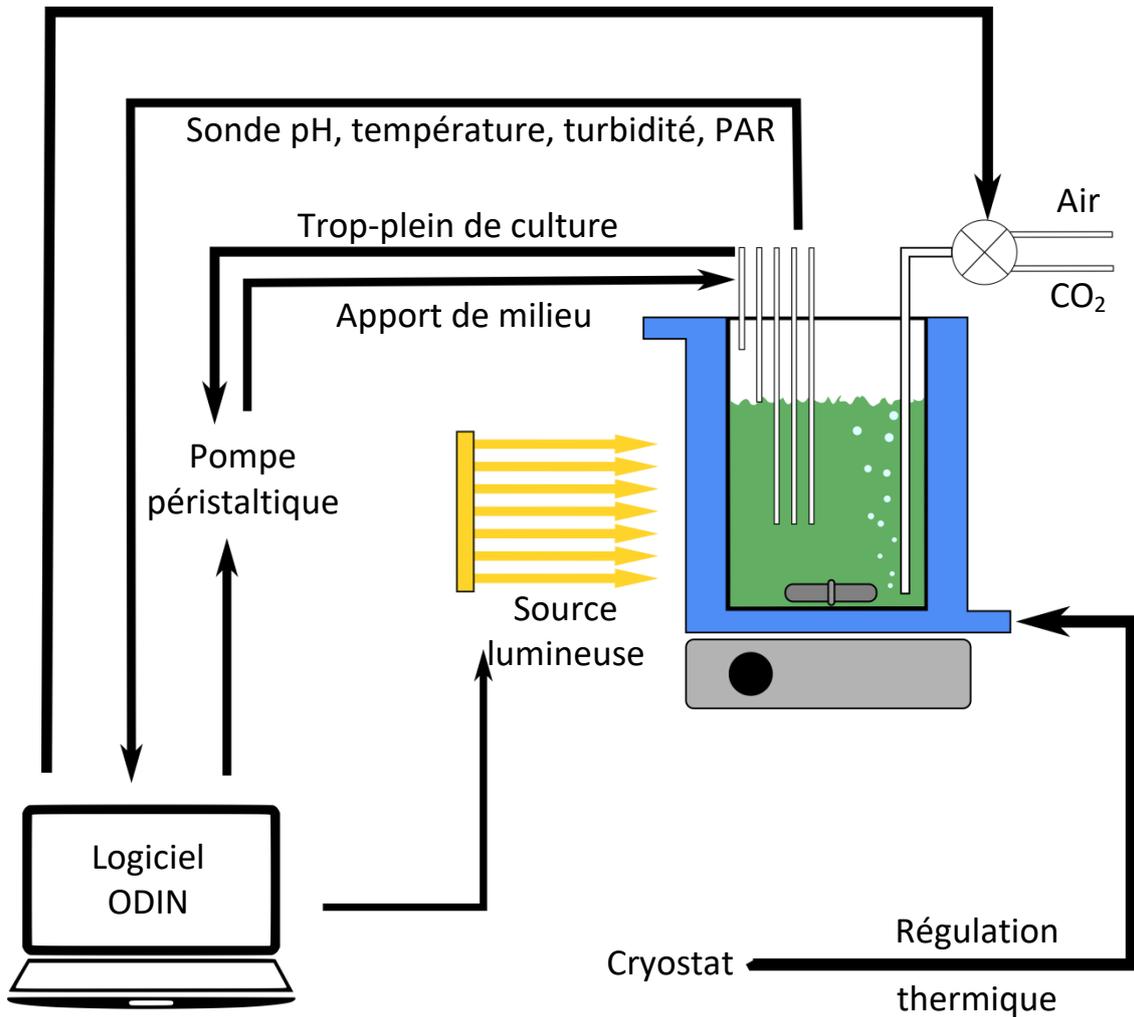


Figure 13 : Méthode de culture en continu. L'enceinte de culture est maintenue à volume constant grâce à l'apport de milieu et l'évacuation d'un volume équivalent de culture par la pompe péristaltique. Des capteurs de PAR, de pH, de température et de turbidité permettent des mesures en ligne et un rétrocontrôle grâce à un logiciel informatique, afin de réguler le pH (micro-injections de CO<sub>2</sub> par exemple) et la vitesse de la pompe dans le cas d'un turbidostat.

**Turbidostat** - La méthode de culture en turbidostat est une variante de la méthode en chémostat. Elle est basée sur un renouvellement continu ou semi-continu de la culture avec un milieu nutritif, aucun élément n'étant limitant (milieu de culture complet). Comme pour le chémostat, le taux de dilution ne doit pas excéder le taux de croissance maximal de l'espèce. Il y a deux manières d'obtenir un équilibre dans un turbidostat.

La première consiste à mettre en place un chémostat dont le facteur limitant n'est pas un nutriment mais le flux de photons (intensité lumineuse). Dans cette configuration, un taux de dilution constant est maintenu avec un milieu de culture complet : l'éclairement devient limitant à cause de l'auto-ombrage résultant de l'accroissement de la densité de la culture. Lorsque la lumière atteint l'intensité pour laquelle le taux de croissance est égal au taux de dilution, la culture est stabilisée. Dans ce mode de réalisation, la culture est photolimitée.

L'autre manière d'obtenir un équilibre consiste à maintenir la densité de la culture à un niveau constant. Ceci est généralement obtenu en asservissant l'apport du milieu de culture à la mesure de la biomasse pour atteindre une valeur de consigne. Il s'agit donc d'un équilibre forcé par une pompe commandée en fonction d'une mesure d'un proxy de la biomasse (la turbidité par exemple). Si l'intensité lumineuse dans le photobioréacteur est optimale pour la croissance (condition obtenue

quand la turbidité de consigne est suffisamment faible pour limiter les effets de l'auto-ombrage), il n'y a aucun facteur qui limite la croissance et la culture est donc maintenue à son taux de croissance maximum.

### 3.4. Modélisation de la croissance dans un photobioréacteur

La dynamique de la culture dans un photobioréacteur peut être modélisée en première approximation en considérant que son taux de croissance  $\mu(s)$  est une fonction de la concentration du nutriment limitant  $s$  ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) dans le photobioréacteur (Gresham & Hong, 2015) :

$$\frac{dx}{dt} = \mu(s) \cdot x - D \cdot x$$

$$\frac{ds}{dt} = D \cdot (S_{in} - s) - \frac{1}{Y} \mu(s) \cdot x$$

Avec  $x$  ( $\text{cell.L}^{-1}$ ) la densité cellulaire,  $S_{in}$  ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) la concentration du nutriment limitant dans le milieu de renouvellement,  $D$  ( $\text{j}^{-1}$ ) le taux de dilution et  $Y$  le facteur de conversion entre  $s$  et  $x$ .

Le modèle de Monod stipule que le taux de croissance est une fonction du substrat limitant suivant l'équation de Michaëlis-Menten :

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S}$$

$\mu_{max}$  ( $\text{j}^{-1}$ ) étant le taux de croissance maximum, et  $K_s$  ( $\mu\text{mol}$ ) la constante de demi-saturation.

Au début de la phase exponentielle de croissance, tous les nutriments y compris celui qui est limitant sont en excès : la croissance est positive ( $dx/dt > 0$ ), c'est-à-dire que le nombre de cellules augmente plus rapidement que la perte due à la dilution. Simultanément, la concentration des nutriments diminue ( $ds/dt < 0$ ) puisque ces derniers sont consommés plus rapidement qu'ils ne sont renouvelés dans le photobioréacteur. La concentration cellulaire atteint ainsi la valeur maximale que peut soutenir le nutriment limitant. Dans cette situation, la concentration cellulaire et la concentration du nutriment limitant se stabilisent et un état d'équilibre se met en place. On a donc :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{ds}{dt} = 0 \text{ et donc } \mu(s)=D$$

A l'équilibre, le taux de croissance de la culture est égal au taux de dilution. Ce dernier ne doit pas excéder le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) de la culture, sous peine de la lessiver. A l'équilibre, on a donc  $\mu = D < \mu_{max}$  et le taux de croissance de la culture est constant.

Le chémostat (pour  $D > 0$ ) permet donc de maintenir une culture dans un état physiologique donné et stable pendant des périodes prolongées. C'est un outil puissant pour étudier les phénomènes de compétition pour une ressource. Il est toutefois techniquement plus délicat et plus complexe à mettre en œuvre que les cultures en batch (Gresham & Hong, 2015).

## 4. Les différentes techniques permettant d'améliorer les microalgues en laboratoire

L'amélioration des microalgues est soumise à une législation stricte puisqu'il s'agit d'organismes vivants. En effet, le Code de l'Environnement définit clairement un organisme comme « toute entité biologique non cellulaire, cellulaire ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique. Cette définition concerne les micro-organismes, y compris les virus, les viroïdes et les cultures de cellules végétales et animales ». (Livre V, Titre III, Articles L531-1, -2, -3, -4 et -5, article D531-2)

### 4.1. Criblage

Le criblage consiste à sélectionner certains individus au sein d'une souche ou d'une espèce. Cette technique, qui permet notamment d'obtenir des lignées monoclonales, peut être employée sur toutes sortes de cultures, que ce soit pour l'isolation de nouvelles espèces à partir d'un inoculum naturel, la création de lignées à partir d'une souche polyclonale, ou la sélection de mutants d'intérêt dans une population en laboratoire.

Parmi les méthodes utilisées couramment, on distingue les dilutions successives, les cultures successives sur gélose et le tri au cytomètre en flux (Ghosh et al., 2016). Les deux premières méthodes ne permettent pas une sélection volontaire préalable : tous les individus déposés dans les puits ou sur la gélose, et qui sont capables d'y croître, se développent. Elles doivent donc être utilisées en association avec des analyses afin d'identifier les caractéristiques de chaque population monoclonale et déterminer *a posteriori* si ces lignées possèdent des caractéristiques intéressantes (Li et al., 2015). *A contrario*, le tri au cytomètre en flux permet d'isoler au sein d'une population de cellules préalablement marquées, en fonction de leurs caractéristiques, celles qui présentent l'intérêt potentiel recherché. Ce potentiel peut ensuite être confirmé et affiné avec des analyses dédiées (Bougaran et al., 2012).

### 4.2. Mutagenèse UV ou chimique

Le but de la mutagenèse est d'augmenter significativement la fréquence des mutations au sein du matériel génétique des cellules. Il est pour cela nécessaire d'utiliser des agents mutagènes qui diffèrent suivant la technique utilisée : irradiation UV, agents chimiques, etc. De cette manière, des centaines, voire des milliers de mutants sont rapidement générés. Toutefois, ils doivent ensuite être caractérisés et triés pour que soient retenus uniquement ceux qui présentent le phénotype d'intérêt (Hlavova et al., 2015). Cette dernière étape, qui est en fait un criblage de la population mutée, peut être extrêmement chronophage et compliquée si le phénotype recherché est complexe ou délicat à identifier.

La mutagenèse peut s'effectuer de manière complètement aléatoire sur la totalité du génome, ou alors cibler certaines zones (mutagenèse dirigée). Cette deuxième option, qui nécessite d'avoir une connaissance préalable du génome de l'espèce, permet de se focaliser sur certains chromosomes ou certains gènes, même s'il est impossible de savoir quelles mutations affecteront ces zones.

### **Mutagenèse par irradiation**

La mutagenèse par irradiation UV est la plus simple à mettre en œuvre : une lampe de stérilisation UV et un poste de sécurité microbiologique, ou à défaut une hotte à flux laminaire, suffisent (Hlavova et al., 2015). Cette technique a prouvé son efficacité pour produire des souches de microalgues accumulant davantage de lipides (Bougaran et al., 2012 ; Liu et al., 2015 ; Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017). L'irradiation par rayons Gamma ou ionisés fonctionne sur le même principe, mais est moins répandue parce que nécessitant davantage de matériel spécialisé.

### **Mutagenèse chimique**

Les agents mutagènes (éthyl méthane sulfonate (EMS), méthylnitronitrosoguanidine (MNNG) par exemple) sont bien caractérisés et leur efficacité a été démontrée sur les microalgues (Hlavova et al., 2015 ; Anandarajah et al., 2015).

## **4.3. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM)**

D'après le Code de l'Environnement (Livre V, Titre III, Articles L531-1), un organisme génétiquement modifié est un « organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelle ». Certaines techniques sont toutefois exclues de cette définition (Article D531-2, voir l'annexe 1).

Il s'agit donc d'organismes dont on a choisi très précisément la ou les mutations qui vont affecter leur génome. Il faut pour cela faire appel à des techniques d'ingénierie génétique, telles que par exemple CRISPR, la recombinaison homologue, le RNA-silencing, l'électroporation (ou électroperméabilisation), l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* ou l'introduction d'ADN exogène à la cellule (promoteurs, gènes, marqueurs, etc.) (Ghosh et al., 2016). Aujourd'hui, il est possible de produire des souches OGM à partir d'environ 20 espèces de microalgues et de cyanobactéries (Spicer & Molnar, 2018). Les événements-clé dans l'utilisation des techniques d'ingénierie génétique sur des microalgues accumulant des lipides ont été synthétisés par Jagadevan et al. (2018) (Fig. 14).

Les organismes OGM, en plus d'être mal perçus par le grand public, sont soumis à une législation contraignante. Ils ne peuvent être « *cultivés, commercialisés ou utilisés que dans le respect de l'environnement et de la santé publique, des structures agricoles, des écosystèmes locaux et des filières de production et commerciales qualifiées " sans organismes génétiquement modifiés " , et en toute transparence.[...] Les décisions d'autorisation concernant les organismes génétiquement modifiés ne peuvent intervenir qu'après une évaluation préalable indépendante et transparente des risques pour l'environnement et la santé publique. Cette évaluation est assurée par une expertise collective menée selon des principes de compétence, pluralité, transparence et impartialité.* » (Code de l'Environnement, Livre V, Titre III, Articles L531-2-1). Il s'agit donc d'autorisations au cas par cas, soumises à de longues procédures de test et d'études.

De plus, des considérations éthiques doivent être prises en compte avec ce type d'organisme : l'ingénierie génétique dont ils sont l'objet peut modifier radicalement leur adaptation, les rendant potentiellement invasifs, toxiques ou capables d'évoluer de manière accélérée s'ils se retrouvent dans un écosystème naturel (Ghosh et al., 2016).

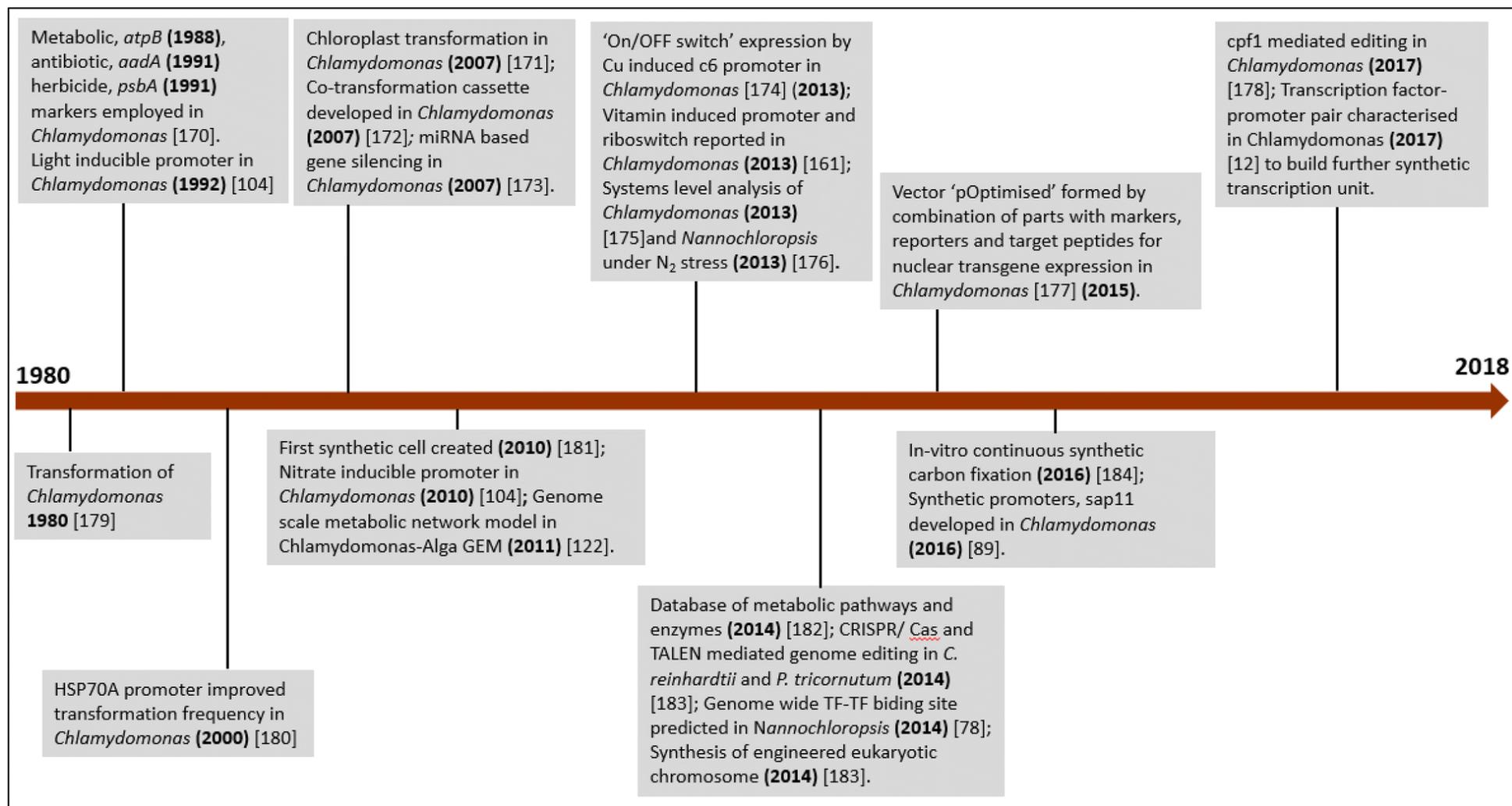


Figure 14 : Synthèse des évènements-clé dans l'utilisation des techniques d'ingénierie génétique sur les microalgues accumulant des lipides. Extrait de Jagadevan et al. (2018).

#### 4.4. Évolution dirigée en laboratoire

L'évolution dirigée en laboratoire est utilisée quotidiennement sur les bactéries et les levures (Dragosits & Mattanovich, 2013 ; Wang et al., 2014) mais assez peu sur les microalgues. Les quelques études publiées à ce sujet (Bonfond et al., 2017 ; Fu et al., 2013 Li et al., 2015) font toutefois état de résultats prometteurs pour augmenter la tolérance des microalgues à certaines conditions de stress (concentration en CO<sub>2</sub> ou salinité élevée) ou pour augmenter la production de composés d'intérêt (caroténoïdes, lipides). Cette méthode fait l'objet d'une description détaillée dans la suite de ce chapitre (6 - Quels choix pour mener une expérience d'évolution dirigée en laboratoire ?).

### 5. De l'intérêt de domestiquer les microalgues

#### 5.1. Les principes de l'évolution selon Darwin

L'expression « théorie de l'évolution » a été proposée pour la première fois par le botaniste français Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829). Toutefois, c'est l'ouvrage de Charles Darwin *L'origine des espèces*, publié en 1859, qui est considéré comme le texte fondateur de la théorie de l'évolution moderne. Cet essai introduit et formalise (comme son contemporain Alfred Russel Wallace) l'idée, novatrice et choquante pour l'époque, que la sélection naturelle est à l'origine de l'évolution des espèces.

Charles Darwin s'est basé uniquement sur des observations accumulées par lui-même et par d'autres naturalistes, tant sur des espèces domestiques que sur des espèces sauvages. Ses conclusions ne dérivent pas d'expériences réalisées dans le but d'étayer ses arguments ; la science de la génétique et la notion de mutation n'existaient pas encore.

Ses travaux commencent par une étude de la domestication des espèces. Il constate en effet que les individus d'une même espèce domestique possèdent des caractéristiques qui varient légèrement. De plus, ces caractéristiques, qui sont héritées par les descendants, sont parfaitement adaptées à l'usage que l'homme souhaite faire de ces espèces. Charles Darwin en conclut que ce sont les hommes qui, en sélectionnant des individus qui présentaient des caractéristiques qu'ils jugeaient intéressantes, ont permis l'apparition des espèces domestiques, et ce, en les faisant se reproduire afin que leurs descendants conservent, voire amplifient, ces caractéristiques. De même, c'est ce processus de sélection/accumulation (de domestication) qui fait que les espèces domestiques sont parfaitement adaptées à leur usage d'aujourd'hui. Charles Darwin prétend également que l'apparition de nouvelles caractéristiques est accidentelle et aléatoire, et que pour augmenter statistiquement les chances de voir apparaître une variation ou une caractéristique intéressante au sein d'une population, il faut en augmenter le nombre d'individus.

Cette étude a ensuite été étendue aux écosystèmes naturels, où les individus d'une même espèce présentent aussi des différences. Toutefois, la sélection de certains individus ne s'effectue pas par l'effet d'une action consciente ou inconsciente du milieu ou des individus qui y vivent (contrairement aux théories téléologiques et lamarckistes). Ce sont les modifications des conditions de vie des individus qui engendrent une pression de sélection naturelle, et qui dictent la sélection d'individus possédant les caractéristiques les plus adaptées à leur milieu. Ainsi, la morphologie du cou des girafes n'est pas le fruit d'une volonté consciente de vouloir l'allonger pour atteindre les hautes branches des arbres. Au sein de la population des girafes, certaines possédaient à la naissance et par

hasard un cou plus long que celui de leurs congénères, et avaient donc un meilleur accès à la nourriture (pression de sélection) puisqu'elles étaient capables de brouter des zones que les autres ne pouvaient atteindre. L'avantage conféré leur ont permis de se nourrir et donc de se reproduire relativement plus efficacement, de sorte que cette caractéristique s'est davantage transmise à leurs descendants, conduisant à l'allongement progressif du cou de l'espèce entière.

Charles Darwin énonce donc finalement les principes suivants :

- i. Il naît toujours plus d'individus que le milieu ne peut en nourrir.
- ii. Les ressources ne s'accroissent pas aussi rapidement que les individus et deviennent donc rares.
- iii. Cela entraîne une compétition entre les individus pour ces ressources, et seuls les plus adaptés aux conditions de leurs milieux (aptitude à se procurer une ressource partagée) survivent : c'est la sélection naturelle. Ce principe avait déjà été énoncé par T.R. Malthus dans son *Essai sur le principe de population* (1798), ouvrage sur les dynamiques de populations en Grande Bretagne.
- iv. Les modifications avantageuses sont conservées et s'accumulent chez les descendants, les individus qui en sont dépourvus sont progressivement éliminés, et ce processus conduit à la transformation des espèces au cours du temps.

Les travaux de Gregor Mendel (Lois de Mendel, 1865) et d'August Weismann, qui donnent naissance à la génétique et à la notion d'hérédité au début du 20<sup>ème</sup> siècle, permettent d'expliquer, de corriger (infirmer de « l'hypothèse de la pangenèse ») et d'affiner la théorie de l'évolution par la sélection naturelle développée par Charles Darwin. La Théorie Synthétique de l'Évolution (TSE) proposée entre autres par Theodosius Dobzhansky et Ernst Mayr dans les années 1940, qui associe la théorie de Charles Darwin et la génétique mendélienne, est aujourd'hui acceptée par l'immense majorité de la communauté scientifique.

## 5.2. La sexualité chez les microalgues

Les conditions de reproduction sexuée d'un grand nombre de familles de microalgues sont très mal connues. On sait par exemple que la taille est un critère essentiel chez les diatomées, qui se divisent par mitose (ce qui cause leur rapetissement) jusqu'à ce qu'une taille-seuil minimale soit atteinte. Les cellules peuvent alors déclencher une reproduction sexuée si les conditions environnementales sont satisfaisantes (Gastineau et al., 2014). Pourtant, les cellules qui parviennent à cette taille-limite ne basculent pas systématiquement sur un mode de reproduction sexuée ; il y a donc d'autres paramètres déclencheurs. La proximité de partenaires potentiels et un excellent état physiologique de la cellule semble être un autre prérequis pour enclencher la reproduction sexuée (Gastineau et al., 2014). Chez les Dinoflagellés, la bascule vers une reproduction sexuée semble corrélée à des conditions environnementales défavorables (carences en nutriments, température, lumière). Cela serait une stratégie de survie : le brassage génétique induit par la reproduction sexuée pourrait générer des individus mieux adaptés aux conditions environnementales difficiles (Spector, 1984 ; Gastineau et al., 2014). Toutefois, la reproduction sexuée est également observée en phase de croissance ou de sénescence des blooms, donc la concentration cellulaire pourrait aussi être un facteur déclencheur. Chez les Haptophytes enfin, la reproduction sexuée a été montrée sur un très petit nombre d'espèces seulement et ses facteurs déclencheurs sont inconnus (Jordan & Chamberlain, 1996). Quelques études pointent le rôle potentiel de facteurs environnementaux

comme la température, la disponibilité des vitamines ou celle des métaux traces (Gastineau et al., 2014). On sait donc difficilement, aujourd'hui, provoquer volontairement la reproduction sexuée chez les microalgues, pour forcer un brassage génétique entre des individus d'intérêt.

### 5.3. Application à la domestication des microalgues

L'évolution en laboratoire se base sur la théorie de l'évolution darwinienne et exploite à la fois la capacité des microalgues à s'adapter rapidement aux variations de leur environnement, et la rapidité de leur cycle de vie qui se traduit par des temps de génération très courts. Cela permet d'obtenir plusieurs centaines de générations en un laps de temps réduit (quelques mois). Or, en l'absence d'agents mutagènes, l'apparition des mutations permettant l'évolution des espèces se produit principalement lors de la division cellulaire à travers des « erreurs de copies » de l'ADN entre la cellule mère et les cellules filles. Le temps de génération court des microalgues permet donc d'accumuler rapidement les mutations et d'effectuer en quelques mois ou quelques années le travail de domestication qui a été effectué en plusieurs siècles sur les plantes agricoles terrestres.

Toutefois, c'est beaucoup plus compliqué d'appliquer les protocoles de domestication sur les microalgues comparativement aux plantes terrestres. En effet, les critères de sélection sont beaucoup moins faciles à observer, et les conditions de reproduction sexuée très mal connues. Les microalgues sont des organismes unicellulaires microscopiques, donc l'observation de leurs caractéristiques morphologiques ou phénotypiques nécessite un équipement particulier et parfois onéreux. L'isolement des individus d'intérêt n'est pas non plus simple ; il faut passer par un cytomètre trieur, ou par des méthodes d'isolation comme la culture sur gélose ou les dilutions en cascade, qui nécessitent ensuite une vérification du caractère d'intérêt. De plus, les microalgues ont une croissance beaucoup plus rapide que les plantes supérieures et un métabolisme très plastique. Cela leur permet de s'adapter à une grande variété d'écosystèmes ou de conditions de culture, mais elles sont en retour impactées très rapidement par les fluctuations des paramètres environnementaux. Cela influence à court voire très court terme leur vitesse de croissance et leur composition. Enfin, les conditions de déclenchement de la reproduction sexuée sont très mal connues pour un grand nombre d'espèces de microalgues. Il est donc *a priori* plus délicat de mettre en œuvre un protocole de sélection variétale chez les microalgues que chez les plantes supérieures. Par contre, on peut exploiter la vitesse de croissance élevée et le fait que les microalgues sont unicellulaires. En effet, les mutations qui se produisent spontanément lors du dédoublement de l'ADN pour la mitose sont systématiquement transmises à la descendance (quand elles ne sont pas létales), contrairement aux mammifères, où les mutations transmises aux descendants sont uniquement celles qui touchent les gamètes. De plus, grâce à leur temps de génération de quelques dizaines d'heures, il suffit de quelques mois ou années pour avoir plusieurs centaines de générations successives. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le taux de mutation total spontané a été estimé à  $3.2 \times 10^{-10}$ /position/génération ( $2,1 \times 10^{-10}$ /nucléotide/génération sans les insertions et délétions), ce qui est proche de *S. cerevisiae* ( $3,3 \times 10^{-10}$ ) et inférieur à *A. thaliana* ( $6,5 \times 10^{-9}$ ). Cela équivaut à 1 mutation toutes les 26 générations (Ness et al., 2012). Il faut donc bien plusieurs centaines de générations pour accumuler quelques dizaines de mutations.

Il convient ici de faire une distinction entre acclimatation et adaptation d'une population. L'acclimatation est la capacité d'un organisme à réguler son métabolisme à un instant donné pour s'assurer une survie et un développement optimal en fonction des différents paramètres

environnementaux auxquels il est soumis. C'est donc un phénomène entièrement réversible et non héréditaire. L'adaptation, au contraire, résulte d'un processus évolutif qui met en jeu des phénomènes héréditaires de modification du matériel génétique de l'organisme (mutations, allèles spécifiques, etc.) qui sont considérés comme irréversibles (il faudrait qu'une mutation exactement inverse se produise au même endroit) et qui ont un impact sur le génotype et le phénotype de l'organisme. Elle est indissociable d'une étape de sélection des caractères, qui peut être faite par l'homme ou consécutive à un avantage sélectif que confère ce caractère.

Le principe de l'évolution dirigée en laboratoire est le suivant : une population est mise en culture puis soumise à un stress suffisamment intense pour en provoquer l'élimination d'une partie des cellules. Les organismes qui ont survécu à ce stress sont remis en culture, puis y sont soumises à nouveau avec une intensité égale ou supérieure, ce qui provoque à nouveau la disparition d'une partie de la population. La répétition de ce cycle un grand nombre de fois permet de sélectionner petit à petit les individus qui résistent le mieux au stress imposé, et donc de faire émerger une nouvelle population résistante. Ce processus peut également s'accompagner de mutations génétiques. Dans le cas d'une culture en continu, le taux de dilution permet d'accélérer l'émergence de la nouvelle population en éliminant progressivement du bioréacteur les cellules dont le taux de croissance est inférieur au taux de dilution. Cela permet aussi d'imposer un stress moins intense à la culture, puisqu'au lieu de tuer une partie de la population à chaque stress, il suffit d'en ralentir ou d'en bloquer le développement. Fu et al. (2013) ont ainsi cherché à augmenter la synthèse des caroténoïdes chez *Dunaliella salina*, par des stress lumineux (combinaison de lumière rouge et bleue). Ils avaient précédemment utilisé l'évolution en laboratoire sur *Chlorella vulgaris* (Fu et al., 2012), afin d'optimiser sa croissance sous lumière rouge. Bonnefond et al. (2017) ont soumis *Tisochrysis lutea* à un stress thermique (oscillations entre une température haute et une température basse) pour sélectionner une souche plus riche en lipides. Perrineau et al. (2013) ont augmenté la tolérance de *Chlamydomonas reinhardtii* au stress halin, de manière à obtenir une souche capable de croître à de hautes salinités.

## 6. Quels choix pour mener une expérience d'évolution dirigée en laboratoire ?

### 6.1. Intérêt de la méthode d'évolution dirigée pour la production de souches spécifiques

L'évolution dirigée en laboratoire (ALE) permet d'obtenir une population de microorganismes capables de croître dans les conditions spécifiques du stress imposé. Cela a souvent pour conséquence d'améliorer certaines de leurs aptitudes, contrairement aux techniques d'ingénieries génétiques. De plus, les microorganismes obtenues par ALE peuvent cumuler un grand nombre de mutations en parallèle, et à différents endroits du génome, susceptibles de modifier le phénotype d'intérêt. Dans tous les cas, le phénotype modifié présente un avantage quand les cellules sont confrontées à la pression de sélection. Elles s'opposent en cela à celles obtenues par mutagenèse, où il est aussi possible de cumuler des mutations, dont certaines peuvent être délétères pour la croissance.

La première expérience d'évolution en laboratoire documentée sur des microorganismes a été réalisée par Henry Dallinger à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle (Zimmer, 2011 ; Hass, 2000). Ce scientifique a modifié considérablement la niche thermique d'une population de flagellés, en augmentant très

progressivement la température de leur culture. La population initiale croissaient à 60°F au début de l'expérience et dépérissaient à partir de 73°F. A la fin de son expérience, la population croissait à 158°F, mais n'était plus capable de se développer à 60°F. Cela fait donc plus d'un siècle que cette méthode de production de microorganismes est connue.

Sous sa forme moderne, une des premières expériences d'évolution en laboratoire a été commencée en 1988 par Richard Lenski sur *Escherichia coli* (Zimmer, 2011). Une lignée monoclonale cultivée en 12 réplicats, était alimentée quotidiennement avec un milieu d'abord enrichi, puis carencé, en glucose. Toutes les 500 générations, des aliquots ont été prélevés et cryoconservés afin de bloquer l'évolution des réplicats. Cette expérience était encore en cours en 2011 : les cellules étaient environ 2 fois plus grosses que celles de départ et croissaient 75% plus rapidement (Zimmer, 2011). Cette expérience a également permis de démontrer que la notion de « réplicats biologiques » est à considérer avec circonspection dans les expériences d'évolution en laboratoire. En effet, quand les 12 réplicats de l'expérience de R. Lenski ont changé de substrats carbonés (maltose à la place du glucose), certains se développaient très bien contrairement à d'autres. Quand bien même il s'agissait de la même lignée au départ et que les 12 réplicats avaient été soumis exactement au même stress, et malgré un phénotype évolué similaire par rapport au glucose, une partie des mutations accumulées par chacun des réplicats était différente (Zimmer, 2011).

De nombreuses études sont conduites aujourd'hui sur les levures et les bactéries, les organismes les plus étudiés étant *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* (Dragosits & Mattanovich, 2013). Ces différents travaux peuvent être répartis en 3 catégories :

- Provoquer la surproduction d'un composé : caroténoïdes (Reyes et al., 2014), métabolites secondaires (Matsusako et al., 2017), etc...
- Améliorer l'utilisation d'une ressource (Radek et al., 2017) ;
- Améliorer la tolérance à un facteur de stress : température (Oide et al., 2015), antibiotique (Charusanti et al., 2012), coproduit métabolique (Matsusako et al., 2017), etc...

Assez peu d'études ont par contre été réalisées sur les microalgues. Elles sont toutefois prometteuses. Ainsi, Bonnefond et al. (2017) ont montré que l'évolution dirigée en laboratoire est efficace pour augmenter la production de lipides, Fu et al. (2013) celle de caroténoïdes, ou simplement la croissance (Fu et al., 2012). Elle permet également d'améliorer la tolérance des cultures à des salinités (Perrineau et al., 2013) ou des concentrations de CO<sub>2</sub> élevées (Li et al., 2015), ou d'augmenter leur capacité à dégrader les phénols (Wang et al., 2016).

## 6.2. Intérêt de la méthode de culture en continu

Pour mettre en place une expérience de sélection ou d'évolution dirigée au laboratoire selon le modèle darwinien, il est préférable d'utiliser un système de culture en continu (Gresham & Hong, 2015). La méthode de culture en batch est techniquement plus aisée, mais l'environnement de culture varie énormément de sorte que les cellules passent par différents états physiologiques. En effet, alors que les nutriments diminuent, divers produits métaboliques relargués par les cellules s'accumulent dans le milieu, le pH varie s'il n'est pas contrôlé, les concentrations des gaz dissous (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) également. Face à ces variations, les cellules s'adaptent en modifiant leur métabolisme, et il est donc souvent très compliqué de déterminer quel paramètre est réellement à l'origine de la sélection dans la culture (Gresham & Hong, 2015). De plus, les cultures en batch étant fermées, les individus les moins adaptés ne sont pas éliminés par le trop-plein, contrairement aux cultures continues.

Bien que la culture en fed-batch soit plus simple à mettre en œuvre que le chémostat ou le turbidostat, elle peut nécessiter un stress plus intense pour que soit éliminée une grande partie des cellules à chaque remise en culture et que les individus d'intérêt soient sélectionnés rapidement. En effet, il n'y a pas dilution en continu et donc pas de lessivage de la culture. Le stress appliqué doit donc être léthal pour une partie de la population cultivée, et ne peut pas se contenter d'en ralentir ou d'en bloquer la croissance. Toutefois, Il ne faut pas non plus imposer une sélection trop importante, surtout sur les premiers cycles de sélection, sous peine de ralentir considérablement le processus d'évolution en empêchant le développement d'une partie des individus potentiellement intéressants (Sun et al., 2018).

Le chémostat et le turbidostat sont donc les plus indiqués pour mettre en place un protocole d'évolution dirigée en laboratoire. En effet, les conditions de culture sont constantes au cours de l'expérience, mis à part le paramètre de stress que l'on peut faire évoluer quand nécessaire (Gresham & Hong, 2015). Toutefois, de par son principe même, le chémostat impose que le stress soit une ressource (nutriments, lumière), ce qui n'est pas toujours le plus intéressant dans une expérience d'évolution dirigée. Le turbidostat, au contraire, ne contraint en aucune manière le choix du stress et donc de la pression de sélection qui est appliqué à la culture. En effet, c'est la concentration cellulaire de la culture qui régule l'apport en milieu nutritif. Il est donc possible d'utiliser des stress environnementaux, comme par exemple des variations de température ou de salinité. Les individus qui seront conservés dans le photobioréacteur seront ceux qui garderont le meilleur taux de croissance (ils sont moins affectés par le stress), les autres seront progressivement éliminés par lessivage.

C'est ce dernier mode de culture qui a été choisi tout au long de ma thèse pour réaliser les expériences d'évolution.

### **6.3. Choix des stress utilisés pour les expériences d'évolution en laboratoire**

La production de lipides par les microalgues est influencée par de nombreux facteurs physiologiques et environnementaux. En laboratoire, ces conditions correspondent aux paramètres de culture : intensité d'éclairement, concentration en nutriments, température, salinité, source de carbone, pH entre autres. Tous ces paramètres, quand ils s'éloignent de la plage optimale de l'espèce, sont une source de stress, et donc potentiellement de pression de sélection dans le cadre d'une expérience d'évolution en laboratoire. Toutefois, tous ces paramètres n'impactent pas forcément la production de lipide des cellules. De plus, ils ne sont pas toujours faciles à réguler ou à modifier au cours d'une expérience, ce qui les rend inadéquats en tant que pression de sélection.

Les limitations ou les carences nutritives mentionnées précédemment (azote, phosphore) impactent surtout les lipides de réserve et non les lipides polaires ; les réponses d'acclimatation des cellules ont été très étudiées. La salinité est un paramètre de culture avec un impact sur les lipides très variable selon les espèces. C'est un paramètre qui peut être difficile à réguler dans une culture, à cause du phénomène d'évaporation qui la fait augmenter artificiellement. Ce problème se pose toutefois moins sur une culture en continue, puisque l'apport continu de milieu de culture permet de tamponner les éventuelles variations.

Le passage sur une source de carbone organique n'était pas intéressant dans le cadre de ma thèse à cause de la microalgue cultivée. En effet, *Tisochrysis lutea* est capable de croître en hétérotrophie (ce

qui est loin d'être systématique chez les microalgues), mais cela inhibe sa croissance et sa production de lipides (Hu et al., 2018 ; Alkhamis & Qin, 2013). Les effets de la culture en mixotrophie sur la production de lipides de *T. lutea* ne sont pas concluants aujourd'hui, différents travaux trouvant des résultats contradictoires (stimulation ou inhibition de la production de lipides ou d'AGPI, Hu et al., 2018 ; Alkhamis & Qin, 2013 ; Babuskin et al., 2014).

La température est un stress qui a fait ses preuves pour modifier la composition lipidiques des microalgues. Bonnefond et al. (2017) l'ont appliquée dans un protocole d'évolution en laboratoire sur une souche de *Tisochrysis lutea*, qui a conduit à augmenter sa niche thermique ainsi que son taux de croissance maximum. De plus, c'est un paramètre de culture qui se régule très facilement à l'aide d'un cryostat externe, et qui permet des variations rapides, et donc la mise en place d'un stress dynamique.

La lumière est plus naturellement envisagée pour modifier la composition pigmentaire des microalgues, plutôt que la composition lipidique. Toutefois, il a été montré que des intensités lumineuses élevées favorisent une augmentation des lipides totaux chez les microalgues (Zhu et al., 2016). De plus, les chaînes photosynthétiques sont insérées dans les membranes thylakoïdales, qui sont constituées de glycolipides. Huang et al. (2018) ont montré que les membranes thylakoïdales peuvent subir d'importantes modifications de composition pour réguler le métabolisme photosynthétique. Enfin, de hautes intensités lumineuses provoquent la production de ROS en coproduit de la photosynthèse. Cela pourrait permettre de générer un stress oxydatif. C'est un paramètre qui permet d'instaurer un stress dynamique.

Enfin, le stress oxydatif semble prometteur mais plus délicat à mettre en place. On peut ajouter un oxydant dans le milieu de culture, mais dans ce cas le même problème de l'effet de dilution que pour la carence ou la salinité se posera. De plus, il faudra être certain que la molécule provoquant le stress oxydatif pénétrera dans les cellules. Une autre possibilité est de provoquer directement une accumulation intracellulaire de ROS, en jouant sur les paramètres de culture, notamment l'intensité lumineuse.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai choisi de travailler avec la température, pour ses effets démontrés sur les membranes, et la lumière, pour impacter plus sélectivement les glycolipides et déclencher un stress oxydatif au sein des cellules.

## 7. Objectifs de la thèse

Au cours de ma thèse, je me suis focalisé sur les lipides polaires de *Tisochrysis lutea*. En effet, l'intérêt des lipides de microalgues réside dans la production d'acides gras essentiels et d'acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne, que les organismes du règne animal ne peuvent pas ou difficilement produire (chapitre1, paragraphe 1.2.5). *Tisochrysis lutea* a ainsi été choisie pour sa capacité à synthétiser de grandes quantités d'acide docosahexaénoïque (DHA, ou acide gras 22:6 $\omega$ 3). Toutefois, les AGPI sont principalement incorporés dans les lipides de structure, plutôt que dans les lipides de réserve (Shen et al., 2016). De plus, *T. lutea* est une espèce connue pour synthétiser de grandes quantités d'alkénones, et peu de triglycérides (Marlowe et al., 1984 ; Bendif et al., 2013 ; Endo et al., 2018). Il était donc logique de se concentrer sur l'analyse des lipides polaires.

Le premier objectif de ma thèse, est d'utiliser l'évolution dirigée en laboratoire pour produire des souches de microalgues avec un profil d'acides gras enrichi en AGPI dans les lipides polaires.

Le second objectif, est d'observer le comportement d'un consortium de souches pendant une expérience d'évolution dirigée en laboratoire. En particulier, il s'agira de regarder si le consortium se comporte de manière comparable à une expérience d'évolution sur une seule souche (taux de croissance, résilience au stress...), et de suivre à quelle vitesse certaines souches sont éliminées.

Enfin, j'ai souhaité étudier l'effet conjoint de deux stress, la température et la lumière, sur les lipides polaires. Ces deux stress associés peuvent de plus conduire à l'émergence d'un stress oxydatif. En effet, de hautes intensités lumineuses provoquent la production de ROS dans la cellule (coproduits de la photosynthèse), tandis que des températures de culture basses limitent l'efficacité des enzymes du métabolisme, dont celles en charge de la détoxification des cellules.

Le manuscrit détaille par la suite (chapitre 2) les différents équipements et protocoles utilisés pendant ma thèse. Il s'attache ensuite à présenter et expliquer les résultats de deux expériences d'évolution dirigée en laboratoire, menées sur *Tisochrysis lutea*. La première expérience a été conduite sur un consortium de 12 souches, avec l'implémentation d'un stress thermique (chapitre 4). Dans la seconde expérience, j'ai implémenté simultanément un stress thermique et un stress lumineux (chapitre 5), afin d'induire un potentiel stress oxydatif, en parallèle sur deux souches, la souche sauvage RCC3691, et la population TLS13 obtenue à la fin de la première expérience d'évolution.

## Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique simplifié des microalgues (Tirichine & Bowler, 2011). Flèches rouges : plantes, animaux et champignons - astérisques : séquençage complet ou partiel disponible .....	11
Figure 2 : Molécules de bêta-carotène (1) et d'astaxanthine (2).....	14
Figure 3 : Acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série des $\omega$ 3 : l'EPA (1) et le DHA (2) .....	16
Figure 4 : exemple d'un acide gras saturé (16:0 ou acide palmitique, (1)) et d'un acide gras polyinsaturé (18:3 $\omega$ 3 ou acide linoléique, (2)) .....	19
Figure 5 : Schéma structurel d'une membrane biologique.....	19
Figure 6 : Schéma structurel d'un phospholipide : alcool fixé au phosphate (1), phosphate (2), glycérol (3), acides gras (4 et 5) .....	20
Figure 7 : Structure d'un glycolipide : sucre fixé au glycérol (1), glycérol (2), acides gras (3 et 4) .....	20
Figure 8 : Structure d'un triglycéride : glycérol (1), acides gras (R1, R2 et R3) .....	21
Figure 9 : Schéma-bilan des voies de synthèse des AGPI dans le réticulum endoplasmique; extrait de Harwood & Guschina (2009) – D : désaturases, E : élongases, PKS : polyketide synthase. L'existence de cette dernière voie n'a pas encore été démontrée chez les microalgues. ....	23
Figure 10 : Schéma-bilan extrait de Mühlroth et al. (2013). Les différents organites représentés sur ce schéma ont tous un rôle dans les voies métaboliques de synthèse et de dégradation des lipides : les chloroplastes sont le lieu de synthèse des acides gras et des glycolipides, le réticulum endoplasmique celui des phospholipides ainsi que des triglycérides, les mitochondries et les peroxysomes permettre la dégradation des lipides pour produire de l'énergie.....	24
Figure 11 : Courbe de croissance en batch et ses différents stades physiologiques : phase de latence (1), phase de croissance exponentielle (2), phase stationnaire (3) et sénescence (4).....	29
Figure 12 : Méthode de culture en fed-batch. Une population est cultivée en batch (1) pendant un temps t donné, puis un volume X de cette culture est transféré dans un nouveau réacteur (2) contenant du milieu neuf. La nouvelle culture est de nouveau laissée en batch pendant un temps t, puis le cycle recommence avec l'inoculation d'un nouveau réacteur. ....	29
Figure 13 : Méthode de culture en continu. L'enceinte de culture est maintenue à volume constant grâce à l'apport de milieu et l'évacuation d'un volume équivalent de culture par la pompe péristaltique. Des capteurs de PAR, de pH, de température et de turbidité permettent des mesures en ligne et un rétrocontrôle grâce à un logiciel informatique, afin de réguler le pH (micro-injections de CO <sub>2</sub> par exemple) et la vitesse de la pompe dans le cas d'un turbidostat. ....	31
Figure 14 : Synthèse des évènements-clé dans l'utilisation des techniques d'ingénierie génétique sur les microalgues accumulant des lipides. Extrait de Jagadevan et al., 2018. ....	35

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation des 4 groupes de microalgues et leurs taxons différenciants ainsi que les phyla associés (Lee, 2018).....	12
Tableau 2 : Espèces de microalgues utilisées en industrie .....	17
Tableau 3 : Teneurs lipidiques (% biomasse sèche) de différentes espèces de microalgues.....	18



## Chapitre 2 - Matériel et méthodes

### 1. Le matériel biologique : *Tisochrysis lutea*

*Tisochrysis lutea* est une espèce polyclonale appartenant à la famille des Isochrysidacées, qui regroupe des organismes non calcifiants au sein des Prymnesiophytes (Bendif et al., 2013).

Ce sont des cellules biflagellées majoritairement mobiles, sauf en phase stationnaire où elles peuvent perdre leurs flagelles et virer vers une couleur orangée assez marquée, voire brun-doré. Sphériques ou ovoïdes avec un diamètre variant de 3,5 à 6 µm, les cellules sont couvertes d'un réseau dense d'écaillés fines d'environ 100 nm, sauf aux niveaux de l'haptonème et de la dépression apicale d'insertion des flagelles, où elles sont beaucoup plus petites (environ 10 nm). Lorsque les cellules sont à un stade de carence avancé, elles peuvent sécréter un mucilage de polysaccharides marqué positivement au bleu de toluidine (Bendif et al., 2013). *Tisochrysis lutea* est extrêmement proche d'*Isochrysis galbana* d'un point de vue morphologique et ultra-structurel, toutefois les analyses biochimiques et génomiques montrent des différences significatives, notamment si l'on considère les lipides (stérols, alkénones (Patterson et al., 1994 ; Huang, et al., 2019), et l'absence d'EPA chez *T. lutea* comparativement à *I. galbana* (Liu & Lin, 2001).

Dans le cadre de mes travaux, 12 souches de *T. lutea* ont été utilisées. Toutes ces souches appartiennent à l'espèce *T. lutea*, comme cela a été confirmé par une analyse 18S au laboratoire PBA de l'IFREMER de Nantes.

Tableau 4 : Liste des différentes souches de *T. lutea* utilisées pendant mes travaux de thèse et leur origine

Souche de <i>T. lutea</i>	Origine
CCAP 927/14	Tahiti, French Polynesia ; isolée par Haines en 1977
CCMP 463	Little Water Cay, Turks and Caicos Islands, British West Indies, Caribbean Sea, isolée par Glazer, 1984
RCC 179	
RCC 1344	Côte atlantique espagnole, isolée par Probert
RCC 3691	Tahiti
RCC 3692	Tahiti
RCC 3693	Tahiti
RCC 3699	Mer du Nord
NIVA 4-91	
IFMG	Kategate
Argenton 1998	Argenton
S5	Sous-population de la souche CCAP 927/14, isolée par le laboratoire PBA, IFREMER de Nantes
TL-S13	Souche obtenue pendant ma thèse, à la fin d'une expérience d'évolution en laboratoire sous un stress thermique

La souche S5 a été isolée par le laboratoire PBA à partir de la souche CCAP 927/14 en ne retenant 1% de la population dont le marquage au Nile Red mesuré par un cytomètre trieur (Facs aria III) était le plus faible à l'aide. Ce cycle de sélection cytométrique a été répété 5 fois au total.

## 2. Les milieux de culture

Deux milieux de cultures ont été utilisés suivant les expériences : le milieu F/2 (Guillard, 1975) et le milieu Conway-Walne (Walne, 1974). Ces milieux ont été préparés avec de l'eau de mer naturelle, prélevée à l'entrée de la rade de Villefranche-sur-Mer, filtrée sur 1 µm et vieillie pendant au moins 3 semaines avant utilisation.

Pour la préparation des milieux, l'eau de mer vieillie est filtrée sur 0,2 µm dans des bidons Nalgène de 10 ou 20 L, et la salinité, mesurée avec un réfractomètre à main (Zuzi-série 300), est réajustée à 35 g/L par addition d'eau ultra-pure fraîchement prélevée sur un appareil Synergy (Merck-Millipore). Les bidons sont ensuite autoclavés pendant 30 min à 121°C. Dans la deuxième expérience d'évolution (chapitre 5), comme il n'était plus possible d'autoclaver l'eau de mer, la préparation a été modifiée : la salinité de l'eau de mer vieillie était mesurée et la quantité requise d'eau ultra-pure ajoutée dans le bidon. Ce dernier était ensuite autoclavé vide, avec juste l'eau milliQ, puis l'eau de mer vieillie filtrée sur 0,2 µm et passée aux UV avant addition dans le bidon stérilisé. Les nutriments et vitamines du milieu correspondant (F/2 ou Conway-Walne), sont ajoutés stérilement avec des filtres hydrophiles de 0.22 µm de diamètre de pores. Le milieu ainsi préparé est *in fine* filtré sur un filtre capsule Sartobran 300 (0.45 µm de diamètre de pores, Sartorius Stedim Biotech) avant d'être ajouté aux photobioréacteurs.

## 3. Les systèmes de culture

### 3.1. Les sélectiostats

#### *Description du système*

Les systèmes de culture appelés « sélectiostat » ont été conçus par le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (fig. 1). Il s'agit de photobioréacteurs plans en acier inoxydable et plexiglas, d'un volume utile maximal de 1,9 L. L'épaisseur de culture est de 6 cm. La géométrie plane permet des mesures fiables et simples du PAR et de la turbidité. La source lumineuse est une lumière blanche, fournie par un panneau de LEDs (Nichia NVSL219BT 2700°K) placé derrière le sélectiostat. Une régulation thermique indépendante est assurée par un cryostat à circulation (Lauda Proline RP845). Les sélectiostats possèdent une double enveloppe située dans leur structure métallique, qui permet de réduire au maximum l'inertie thermique de la culture. Un système de rideau de bulles d'air (filtré sur 0.2 µm) le long des parois transparentes permet de limiter l'installation d'un biofilm.

Le sélectiostat est instrumenté avec différents capteurs :

- un capteur plan du PAR (Photosynthetically Active Radiation) placé derrière la culture, face à la source lumineuse (Skye PAR Quantum Sensor) ;
- un capteur de turbidité, qui mesure l'atténuation d'un faisceau lumineux à 750 nm à travers l'épaisseur de la culture. Une turbidité de 0 équivaut donc à un milieu parfaitement transparent, pour lequel le faisceau lumineux n'est pas atténué, et une turbidité de 100 à un milieu opaque.
- Une sonde de pH et température (Mettler Toledo InPro 4800/750).
- Une sonde à oxygène dissous (PreSens, OXY-4 SMA 4-channel fiber optic oxygen transmitter).

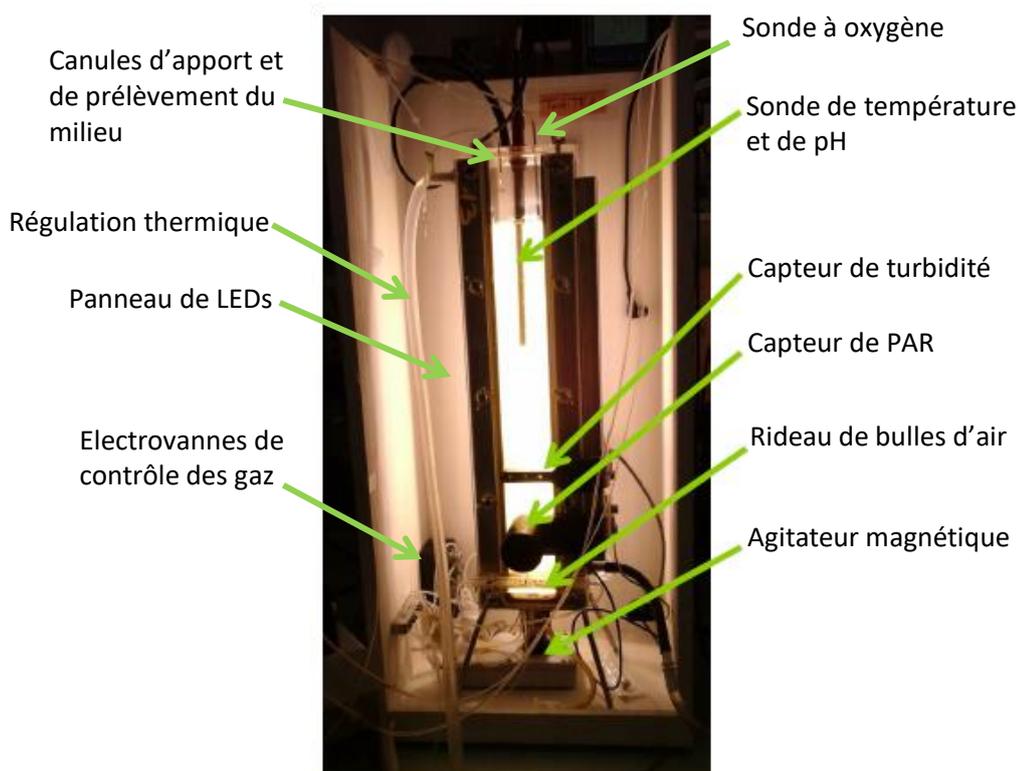


Figure 15 : Photographie légendée d'un sélectiostat et de son instrumentation.

Tous les instruments de mesure, exceptée la sonde à oxygène, sont connectés à une interface numérique, le logiciel Odin (fig. 2), qui permet d'enregistrer les mesures en ligne, avec une acquisition toutes les 2 minutes pour le PAR, la turbidité, le pH, la température et l'oxygène dissous. Ce logiciel contrôle également l'intensité lumineuse, la vitesse de la pompe péristaltique (Gilson Minipuls 3) qui alimente les cultures en continu, et le rideau de bulles d'air.

Cette interface commune permet également d'exercer des rétrocontrôles sur la culture (fig. 2). Le premier permet d'assujettir la vitesse de la pompe de dilution à la mesure de turbidité. Quand celle-ci dépasse une valeur de consigne, la vitesse de la pompe est augmentée, ce qui a pour effet de diluer la culture. La régulation de la turbidité (et donc de la concentration cellulaire) est donc très précise. Le second permet d'assujettir l'injection de CO<sub>2</sub> à la mesure du pH, et de maintenir ce dernier proche d'une valeur de consigne. Enfin, les rideaux de bulles sont stoppés 5 secondes avant les mesures de turbidité et de PAR, afin qu'elles ne soient pas perturbées.

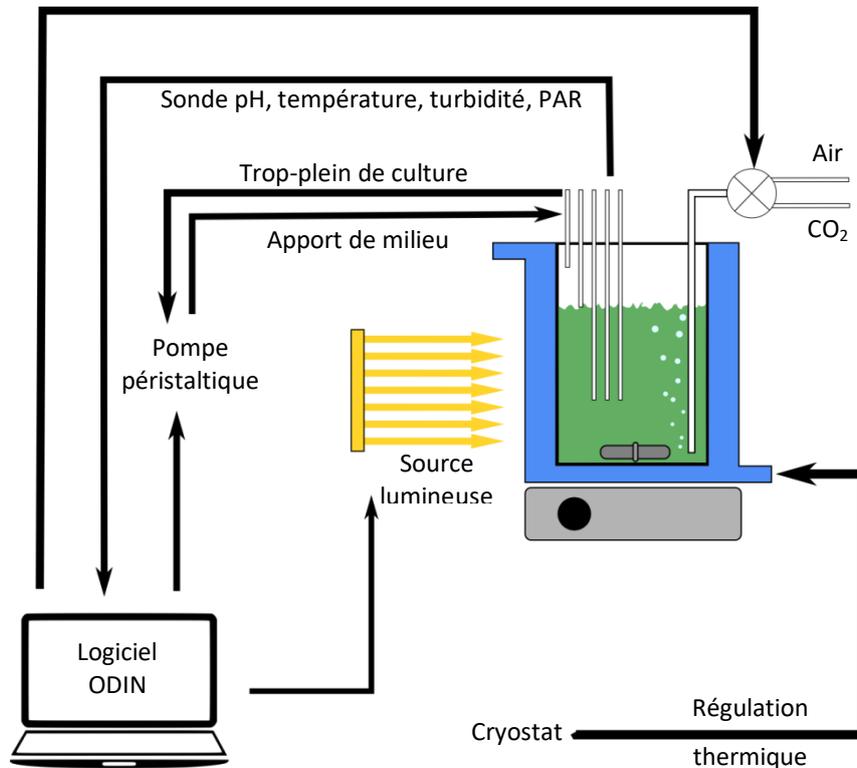


Figure 16 : Représentation simplifiée du système de culture en continu pour les expériences d'évolution en laboratoire.

### Intérêt du système

Ces sélectiostats ont été spécialement conçus pour d'une part maintenir des cultures de microalgues en continu pendant plusieurs mois, et d'autre part assurer une maîtrise fiable des mesures en ligne et du contrôle des conditions de culture, notamment de la température et de la lumière, les 2 facteurs choisis dans cette étude pour exercer une pression de sélection. Le corps en inox du sélectiostat permet de réduire l'inertie thermique du système, et la géométrie plane a été choisie pour simplifier le champ radiatif et faciliter les mesures optiques. Les mesures en ligne à haute fréquence permettent de suivre en temps réel l'état de la culture, et de vérifier que ses paramètres, notamment le pH, la température, et la turbidité sont conformes aux consignes entrées dans le logiciel ODIN qui pilote le système. Ce dernier enregistre également la vitesse de la pompe de dilution en continu, et donc le débit d'entrée du milieu de renouvellement. La relation entre la vitesse de la pompe et le débit est régulièrement vérifiée par pesée. Les mesures à haute fréquence du taux de dilution (débit/volume de la culture) et de la turbidité permettent de calculer le taux de croissance quasiment en continu. Il est donc important que ces deux mesures soient acquises avec le maximum de précision. Toutes les 8 semaines, les sélectiostats sont vidés, nettoyés, stérilisés, et redémarrés avec la culture récupérée. A cette occasion, et afin d'assurer la stabilité du dispositif, les différents capteurs sont vérifiés et, si nécessaire, calibrés à nouveau.

### 3.2. Les multicultivateurs

Les multicultivateurs (Multi-Cultivator MC 1000-OD, Photon Systems Instruments) permettent des études comparatives de cultures dans des conditions identiques, que l'on peut facilement standardiser. En effet, chaque système dispose de 8 flacons de culture cylindriques, de 85 mL de volume utile chacun (fig. 3). La régulation thermique, assurée un bain thermostaté, est commune à toutes les cultures, alors que l'intensité lumineuse des LED (lumière blanche) peut être réglée

indépendamment. Chaque culture est équipée d'un bullage d'air filtré sur 0.22  $\mu\text{m}$ , qui assure, outre un apport de  $\text{CO}_2$ , l'homogénéisation, et d'un capteur de densité optique (DO) à 720 nm. Le pH n'est par contre pas régulé.

Les mesures de température et de densité optique sont enregistrées avec des fréquences respectives de 2 et 10 minutes, ce qui permet un suivi quasi continu de ces 2 paramètres.

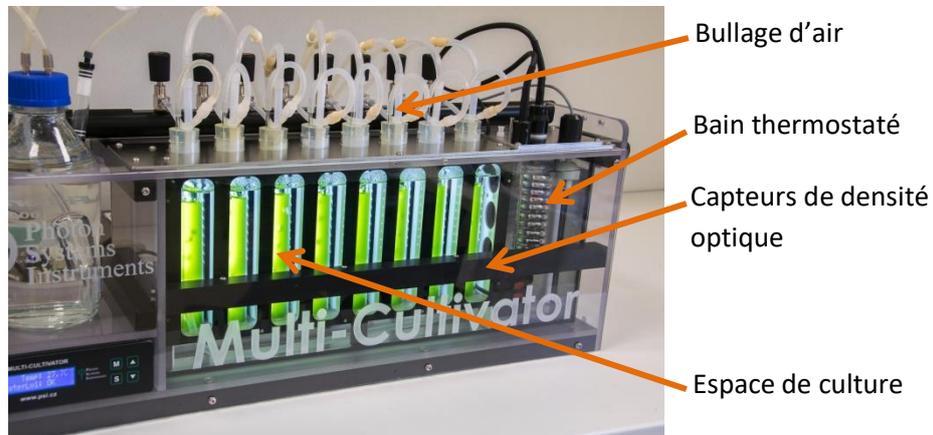


Figure 17 : Système de culture Multi-Cultivator MC1000-OD

### *Intérêt d'une culture comparative en conditions identiques*

Pendant une expérience d'évolution en laboratoire, les cultures dans les sélectiostats sont soumises à des stress de différentes intensités. Elles sont donc constamment en train de s'acclimater, parallèlement au processus d'évolution que l'on essaye d'instaurer. Pour déterminer si les variations phénotypiques observées sur les cultures sont dues à l'acclimatation ou à l'évolution, il est nécessaire de pouvoir dissocier ces 2 influences. Pour cela, nous avons régulièrement réalisé au cours du processus de sélection, en conditions standardisées et non stressantes, des cultures en multicultivateur que l'on a inoculées avec des microalgues prélevées dans les sélectiostats. Cela permet de « réinitialiser » la culture et d'effacer au moins partiellement son historique récent de stress. On suppose ainsi que les analyses biochimiques faites sur ces cultures mettent en évidence des caractéristiques uniquement imputables à l'évolution des microalgues, et non à leur acclimatation aux conditions de stress. Il est donc nécessaire de choisir des conditions de culture standardisées et inchangées tout au long de l'expérience. En effet, le phénomène d'acclimatation d'une population à ses conditions de culture ne peut pas être évité. Si l'acclimatation aux conditions de stress du sélectiostat est effacée, elle est en fait remplacée par l'acclimatation aux conditions standardisées. Malgré tout, quand ces dernières restent identiques, on peut considérer que l'acclimatation des cultures est toujours la même, et donc que les modifications mises en évidence d'un cycle de sélection à l'autre (voir plus pas) sont bien dues à l'évolution de la culture.

## 4. Les analyses effectuées

### 4.1. Les paramètres de croissance

#### *Les comptages*

La concentration et la taille des cellules ont été estimées soit avec le compteur optique HIAC, qui mesure la surface projetée des particules, soit avec le compteur Multisizer 3 Beckman Coulter, qui mesure leur volume.

### L'état physiologique des cultures

L'état physiologique des cultures a été suivi avec deux méthodes : un double marquage viabilité/mortalité en cytométrie en flux, et une mesure du rendement quantique maximum (MQY) avec un fluorimètre AquaPen (Photon System Instruments). Le protocole de cytométrie en flux est détaillé dans une sous-partie dédiée de ce chapitre. Pour les mesures du MQY, 15 mL de culture sont prélevés et mis à l'obscurité pendant 30 minutes. Les mesures de fluorescence variable sont réalisées à l'obscurité, en triplicat, avec le paramétrage suivant : concentration cellulaire inférieure à 5 millions de cellules/mL ; longueur d'onde de mesure : 455 nm ; lumière actinique de 400  $\mu\text{mol}$  de photons/ $\text{m}^2/\text{s}$ . L'intensité du pulse lumineux, réglé à 30%, a été choisie conformément à des tests effectués sur une culture en phase de croissance exponentielle ; celle qui maximise le MQY est retenue. Pour une culture de *T. lutea* non stressée et en phase exponentielle de croissance, le MQY est de 0,7.

Tableau 5 : valeurs de MQY mesurées sur une culture de *T. lutea* en phase de croissance exponentielle, pour différentes intensités du pulse lumineux.

Intensité du pulse lumineux	MQY
10%	0,69
20%	0,66
30%	0,70
40%	0,69
50%	0,67
70%	0,65
100%	0,63

### Calcul du taux de croissance dans les sélectiostats

La figure 4 montre qu'il existe une relation linéaire entre la mesure de turbidité (D.O.) et la densité cellulaire mesurée avec le Coulter Counter. La même linéarité a été observée pour les mesures effectuées dans les multicultivateurs.

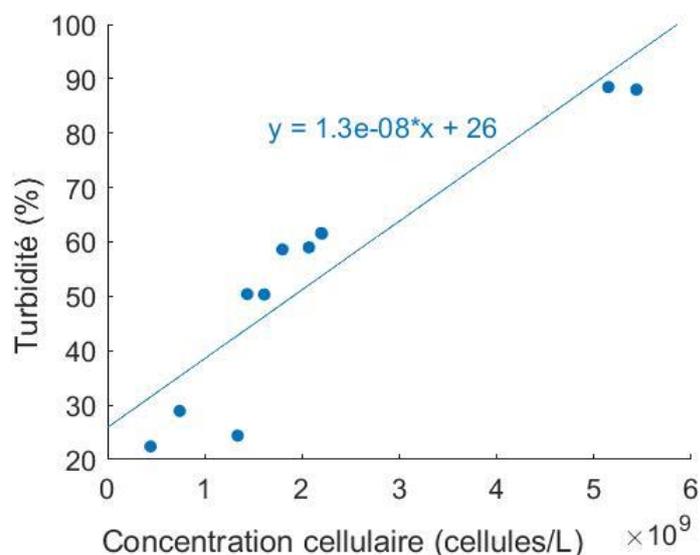


Figure 18 : Exemple de relation entre la turbidité et le dénombrement cellulaire obtenu à l'aide du compteur de particules Multisizer 3 Beckman Coulter.

Les sélectiostats permettent d'utiliser le mode de culture continu « turbidostat », grâce auquel la turbidité (et donc la concentration cellulaire) est maintenue constante par l'ajout contrôlé de milieu nutritif neuf. Le niveau de turbidité de consigne a été choisi suffisamment bas pour que ni le flux de photons ni les nutriments ne soient limitants pour la croissance.

Dans une culture continue, la densité cellulaire (ou la turbidité) varie suivant les termes de l'équation suivante (voir chapitre 1) :

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x - D \cdot x$$

Avec  $x$  ( $\text{cell.L}^{-1}$ ) la densité cellulaire,  $\mu$  ( $\text{j}^{-1}$ ) le taux de croissance net, et  $D$  ( $\text{j}^{-1}$ ) le taux de dilution qui est égal au débit divisé par le volume de la culture.

On peut donc calculer à tout instant le taux de croissance  $\mu$  à partir des variations de la turbidité et des mesures en ligne du taux de dilution :

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} + D$$

Un cas particulier qui simplifie cette équation est celui où la culture est à l'équilibre, c'est-à-dire quand la concentration cellulaire ne varie plus,  $\frac{dx}{dt} = 0$ , et donc  $\mu = D$ .

#### Calcul du taux de croissance maximal dans les multicultivateurs

Les données brutes de D.O. à 720nm sont tout d'abord nettoyées grâce à un script qui supprime les lignes vides et les valeurs aberrantes, et leur logarithme népérien (LN) est tracé en fonction du temps. La partie linéaire de cette courbe, correspondant à la phase de croissance exponentielle, est identifiée (les valeurs pour lesquelles la DO est supérieure à 0,3 sont supprimées - linéarité de la réponse du capteur). La pente de la régression linéaire calculée sur les points de cette partie de la courbe donne une estimation du taux de croissance maximum (Figure 5).

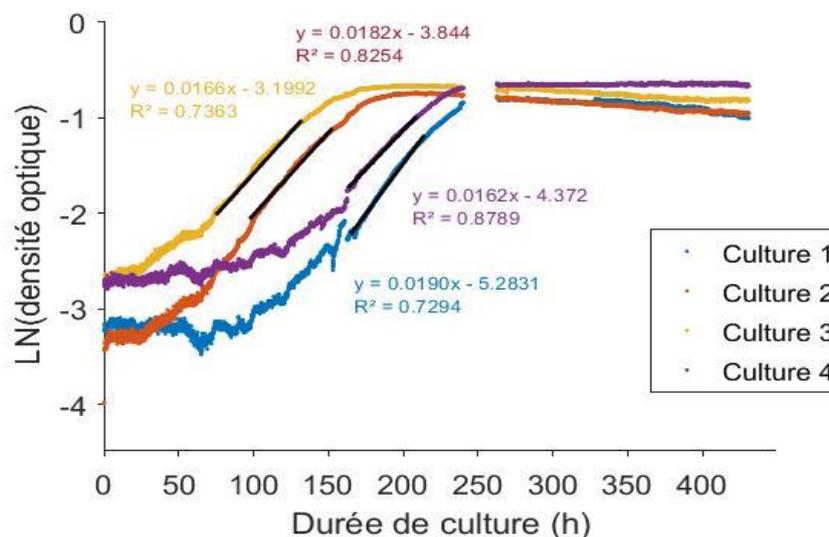


Figure 19 : Calcul du taux de croissance à partir du logarithme népérien de la densité optique, pour 4 cultures dans le multicultivateur au cours de l'expérience d'étude de l'impact du peroxyde d'hydrogène sur la dynamique de croissance des cultures (chapitre 3).

## 4.2. Les analyses lipidiques

Ce protocole a été utilisé pour la préparation de tous les échantillons en vue de l'analyse du profil lipidique.

### *Extractions lipidiques et séparation de classes*

Les cellules sont récoltées par centrifugation (2000g, 10°C, 15 min) et les culots sont stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des lipides. Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode de Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959), puis séchés sous vide et pesés dans les vials préalablement tarés avant d'être stockés à -80°C sous azote.

Les classes lipidiques (lipides neutres (LN), glycolipides (GL) et phospholipides (PL)) ont été obtenus par extraction solide-liquide sur les colonnes de gel de silice (Interchim, colonnes SI-S-500/6) préalablement conditionnées, en passant 6 volumes de colonne de chloroforme (LN), 4 volumes d'acétone (GL) 6 volumes de méthanol et 2 volumes de méthanol-10% ammoniacque (PL). Chaque fraction a ensuite été séchée sous vide, pesée dans les vials préalablement tarés et stockée à -80°C sous azote.

### *Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse*

Pour la détermination des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG), chaque échantillon de lipide est méthylé selon la méthode décrite par Morrison et Smith (Morrison & Smith, 1964) en utilisant du trifluorure de bore à 7% dans du méthanol, et le toluène comme solvant d'extraction pour les méthylesters d'acides gras (FAME). Chaque échantillon est lavé 3 fois pour permettre une récupération maximale des FAME, qui sont ensuite analysés sur un GC XL Autolab (Perkin-Elmer) équipé d'un détecteur à ionisation de flammes (FID) et d'une colonne capillaire en quartz polaire (colonne famewax, Restek, 30 m de long & 0.32 mm de diamètre interne). Les injecteurs et détecteurs sont réglés à 225°C, et de l'hélium à 7 psig en tête de colonne est utilisé comme gaz vecteur. Un étalon interne commercial de C19:0 dans du chloroforme est ajouté aux échantillons pour les quantifications. Tous les échantillons sont injectés avec un split de 1/25 et à une concentration théorique de FAME comprise entre 10 et 40 mg/mL selon les échantillons. La variabilité de la méthode est de 3% pour les principaux composés, <9% pour les composés intermédiaires et 25% pour les composés minoritaires (<0.5% des acides gras totaux).

Les analyses ont été conduites en mode isotherme à 182°C pendant 120 minutes (chapitres 3 et 4), ou en gradient de température dans le cas de la deuxième expérience d'évolution en laboratoire (chapitre 5), avec le couple de stress lumière-température.

## 4.3. Les analyses CHN

Des échantillons de 1 à 2 mL ont été filtrés en duplicats sur des filtres en microfibre de verre (Whatman GF/C, 1,2 µm), préalablement carbonisés pendant 4h à 450°C. Tous les échantillons ont été conservés à 75°C jusqu'à l'analyse, réalisée avec un analyser CHN (2400 Series II CHNS/O, Perkin-Elmer).

## 4.4. Les analyses de génomique

Les analyses de génomiques, réalisées au laboratoire PBA, IFREMER de Nantes, répondaient à 3 objectifs. Le premier était d'identifier les souches présentes dans les populations de *T. lutea* pendant

les expériences d'évolution en laboratoire. Le second était de détecter les mutations susceptibles de se produire pendant ces expériences, et d'identifier celles qui étaient complètement absentes du génotype de départ, et qui seraient donc la preuve d'une évolution effective des populations. Enfin, il s'agissait, si possible, de localiser ces mutations pour déterminer si elles touchaient ou non un gène.

Les cellules sont récoltées par centrifugation (2000 g, 10°C, 15 min) ; les culots sont conservés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN et l'analyse. L'extraction a été réalisée avec le protocole en phénol-chloroforme décrit par Hu et al. (2004). Des masses de 20 à 30 µg d'ADN ont été utilisées pour réaliser le séquençage à la plateforme génomique GeT-PlaGe (INRA de Toulouse, France) sur un séquenceur Illumina HiSeq3000. Les librairies ont été éditées en kit Illumina TrueSeq : l'ADN a été fragmenté en morceaux d'une longueur moyenne de 430 pb. Chaque fragment a ensuite été séquençé aux 2 extrémités sur ~150 pb, produisant des paires de séquences.

Les données sont ensuite nettoyées : tous les adaptateurs de séquençage Illumina sont retirés, ainsi que les séquences de qualité insuffisante. Elles sont alors traitées avec le logiciel TrimGalores et un script créé par le laboratoire PBA, afin que soient supprimées toutes les séquences qui totalisent moins de 120 pb, qui présentent des nucléotides non identifiés, ou qui ont un score de séquençage moyen inférieur à Q30. Sur la totalité des échantillons, plus de 80% des séquences ont été conservées après ce nettoyage.

Les séquences sont ensuite alignées sur le génome de référence, version 2.0 (environ 85 Mb), proposé par Bertheliet et al. (2018), avec le logiciel BWA-MEM (utilisation des paramètres par défaut). Quel que soit l'échantillon, plus de 86% des séquences ont été alignées correctement. La profondeur de séquençage moyenne était de 225.

Une recherche des mutations SNP est enfin conduite avec le logiciel Freebayes (Garrison & Marth, 2012), avec le paramétrage suivant : allèles minimaux, 20 ; fréquence minimale sur la totalité des séquences, 5%, option « pooled-continuous » activée (cela indique que le génome à analyser résulte du séquençage d'une population (donc de plusieurs individus), dont le nombre n'est pas connu de manière précise). Les résultats sont mis en forme grâce à un programme créé par le laboratoire PBA.

Ce protocole est appliqué à la fois sur les populations soumises aux stress pendant les expériences d'évolution en laboratoire, et indépendamment sur les 12 souches de *T. lutea* que j'ai utilisées au cours de mon doctorat. Des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) spécifiques ont été identifiés pour chacune des souches. Ils permettent d'identifier les souches au sein d'une population mélangée, en effectuant une comparaison croisée présence/absence avec les SNP détectés dans les populations des expériences d'évolution en laboratoire.

#### 4.5. Les analyses en cytométrie en flux

##### *Le double marquage viabilité/mortalité*

Les analyses ont été réalisées avec un cytomètre en flux Accuri C6 (BD) équipé d'un passeur d'échantillons. Une solution de fluorescéine diacétate (FDA) à 10 mg/mL dans l'acétone est préparée le jour même pour le marquage de viabilité, une solution d'érythrosine à 1 mg/mL dans une solution de NaCl à 38g/L est préparée et conservée à 4°C pour le marquage de mortalité.

Un mélange de billes de tailles connues (2,5 ; 5 ; 10 et 16 µm) est passé en début d'analyse afin de déterminer la disposition des tailles sur le cytogramme. Un échantillon biologique non marqué est ensuite passé et les cellules sont identifiées grâce à la fluorescence de la chlorophylle, visible sur le

canal FL3. La zone correspondante est identifiée (gate) sur le cytogramme. Les billes passées précédemment permettent d'estimer une fourchette de taille pour les cellules.

La concentration des échantillons est ajustée à 15 000 cell/mL avec de l'eau de mer filtrée sur 0,2  $\mu\text{m}$ . Toutes les mesures sont réalisées en triplicats. Pour le marquage au FDA, 1 mL de culture additionné de 3  $\mu\text{L}$  de la solution de FDA est incubé pendant 20 minutes à la lumière et température ambiante. La mesure est réalisée immédiatement en FL1. Pour le marquage à l'érythrosine, 1 mL de culture additionnée de 20  $\mu\text{L}$  de la solution d'érythrosine est incubé pendant 60 minutes au noir et à température ambiante. La mesure doit être faite dans l'heure qui suit en FL3.

## 5. Protocoles des expériences d'évolution dirigée

Ces expériences ont été réalisées en mode turbidostat, dans les sélectiostats présentés précédemment (partie 3.1) et le détail des protocoles est présenté dans les chapitres correspondants.

Le principe de sélection est inspiré de celui mis en œuvre par Bonnefond et al. (2017) et consiste à soumettre les cultures en continu à un stress dynamique et d'intensité croissante pendant une durée de 6 mois. Deux facteurs de stress ont été utilisés au cours des expériences : la lumière et la température. Des oscillations quotidiennes ont été implémentées suivant un signal carré. Cela avait pour but d'empêcher les cellules de trop bien s'acclimater au facteur de stress utilisé. En effet, il a été montré que les microalgues ont tendance à s'acclimater aux conditions moyennes quotidiennes de leur environnement (Combe et al., 2015 ; Bonnefond, 2015). Les oscillations dynamiques de la lumière ou de la température entre 2 extrêmes, restent donc stressantes pour les cellules qui s'acclimatent à la température moyenne ou à la dose moyenne de lumière qu'elles reçoivent. L'intensité du stress était augmentée périodiquement en modifiant l'amplitude des oscillations : la température basse était ainsi de plus en plus froide, et la température élevée de plus en plus chaude. Cela permet de maintenir en permanence la pression de sélection due au stress. En effet, une fois qu'une intensité de stress est implémentée, les cellules qui sont le plus impactées par cette intensité, et qui croissent donc le moins rapidement, sont évacuées du sélectiostat. Par contre, les cellules qui restent dans le sélectiostat tolèrent cette intensité de stress, soit parce qu'elle est dans leur gamme d'acclimatation, soit parce que les cellules contiennent une ou plusieurs mutations qui leur confère une meilleur fitness. La pression relative de la sélection est donc moindre pour elles. Afin de poursuivre la sélection et/ou l'évolution de la culture, il est nécessaire d'augmenter l'intensité du stress.



## Chapitre 3 : Tolérance de *Tisochrysis lutea* au stress oxydatif : une étude préliminaire centrée sur le métabolisme lipidique

### Introduction

Les microalgues sont naturellement soumises à des variations parfois brutales de leur environnement. Ainsi, les phénomènes d'évaporation ou de dilution par les intempéries modifient la salinité des masses d'eau. Les courants ramènent les microalgues en surface, ce qui les expose à des intensités lumineuses élevées et aux rayonnements ultra-violet. Enfin, les activités humaines comme les ports ou les plateformes off-shore provoquent l'apparition de certains composés, comme le cuivre et le zinc (Nguyen-Deroche et al. 2012, Masmoudi et al. 2013, Hamed et al. 2017). Ces changements de l'environnement provoquent des stress de différentes natures chez les microalgues : stress thermique, lumineux, osmotique, oxytif, etc. Le stress oxydatif est causé par l'accumulation dans les cellules de molécules oxydantes, les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais i.e. peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxygène singulet, anion superoxyde). La formation de ROS est un phénomène naturel au sein de certains organites comme les chloroplastes, les mitochondries ou les peroxysomes (Lesser, 2006 ; Marshall et al., 2005a Moller, 2001 ; Corpas et al., 2001). Le peroxyde d'hydrogène, qui est plus stable que les autres en milieu aqueux, peut aussi être présent dans l'environnement et pénétrer dans les cellules. Ces molécules sont cytotoxiques car elles oxydent les autres constituants cellulaires ce qui les rend instables (Lesser, 2006). En temps normal, les ROS ne s'accumulent pas parce que les cellules se détoxifient grâce à un certain nombre de molécules anti-oxydantes (enzymes, pigments, vitamines, polyphénols, acides gras polyinsaturés) (Lesser, 2006 ; Marshall et al., 2005). Par contre, lorsque les conditions de culture ou les paramètres environnementaux ne sont pas optimaux, il arrive que les cellules n'arrivent pas à se détoxifier aussi vite que les ROS ne sont formés. C'est à ce moment que le stress oxydatif se met en place, et la cellule y réagit en modifiant son métabolisme. En soumettant les cultures à un stress oxydatif, il devrait donc être possible d'induire la synthèse et l'accumulation dans la cellule de composés impliqués dans la détoxification cellulaire. Parmi eux, le rôle des acides gras polyinsaturés (AGPI) est encore mal connu. Toutefois, il a été constaté qu'un stress oxydatif modifie le profil lipidique des cellules (Burch & Frank, 2016 ; Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017). Les AGPI sont recherchés en alimentation humaine et animale, en cosmétique ou en pharmaceutique (De Jesus Raposo 2013 ; Koller et al., 2014), il est donc intéressant de chercher des souches de microalgues qui en produisent de grandes quantités. Un moyen d'obtenir ces souches pourrait être d'utiliser l'évolution dirigée en laboratoire : cette méthode permet de modifier le phénotype des souches (Bonnefond et al., 2017 ; Fu et al., 2013 ; Perrineau et al., 2013) sans avoir besoin d'utiliser des techniques d'ingénierie génétique. Il semble donc intéressant d'étudier la possibilité d'utiliser le stress oxydatif comme levier d'évolution dirigée pour modifier le profil lipidique de *Tisochrysis lutea*.

Ce chapitre présente différentes expériences préliminaires dont l'objectif était d'évaluer les effets en acclimatation du peroxyde d'hydrogène, une espèce réactive de l'oxygène pouvant engendrer un stress oxydatif, et donc une réponse métabolique forte, chez la microalgue *Tisochrysis lutea*.

## 1. Choix des molécules oxydantes

Il fallait d'abord trouver un moyen de provoquer un stress oxydatif chez les microalgues. Un certain nombre de conditions, comme des changements brusques de salinité ou d'intensité lumineuse, sont susceptibles de provoquer un tel stress (voir le chapitre 1). Toutefois, ces conditions impactent parallèlement le métabolisme de la cellule : les fluctuations d'intensité lumineuse jouent sur l'activité des photosystèmes, la température sur les cinétiques enzymatiques, la salinité sur la pression osmotique intracellulaire et la disponibilité des ions. Le stress oxydatif n'est souvent qu'une conséquence du changement de ces conditions : le métabolisme des cellules fonctionne de manière sub-optimale pendant qu'elles s'acclimatent aux nouvelles conditions, et cela peut causer une production accrue et/ou une mauvaise détoxification des ROS. Toutefois, différencier, dans l'acclimatation observée, la part de ce qui est provoqué par le changement de conditions de celle qui résulte du stress oxydatif occasionné n'est pas simple. C'est pourquoi l'utilisation de molécules oxydantes capables de traverser les membranes pour pénétrer dans les cellules est *a priori* une piste d'étude plus prometteuse. Ces molécules pourraient en effet permettre d'infliger un stress oxydatif direct aux cellules.

Une liste des molécules chimiques susceptibles de provoquer un stress oxydatif chez les microalgues ainsi que les principaux effets sur la cellule est présentée dans le tableau 1. Ces molécules appartiennent à différentes classes chimiques et ont des effets cellulaires variés.

Il ressort de cette étude bibliographique que, parmi les molécules candidates, seules quelques-unes semblent adaptées à une expérience d'évolution dirigée. En effet, l'hydroperoxyde de cumène et les azides ont des effets multiples sur le métabolisme cellulaire et des modes d'action mal documentés, tout comme le bleu de méthylène. L'acifluorène n'est pas directement impliqué dans la production d'espèces réactives de l'oxygène, et a également d'autres effets sur le métabolisme cellulaire. *A contrario*, le rose Bengale a un mode d'action connu, qui semble restreint à la production d'oxygène singulet. Le peroxyde d'hydrogène et le dioxygène sont des molécules présentes naturellement et en quantités variables dans la cellule, qui provoquent spontanément un stress oxydatif au-delà d'un certain seuil. De plus, le peroxyde d'hydrogène a déjà été testé chez *Scenedesmus* pour augmenter la production de lipides (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017). Il a un temps de demi-vie dans l'eau qui varie avec la température, allant de quelques heures à cinq jours (Cooper & Zepp, 1990 ; Petasne & Zika, 1997 ; Yuan & Shiller, 2004, Roe et al. 2016). Le peroxyde d'hydrogène et le rose Bengale sont donc deux candidats prometteurs pour mettre en place un protocole de stress oxydatif.

Tableau 6 : synthèse des effets de différentes molécules oxydantes utilisées

Nom	Nature	Effets sur la cellule	Référence
Peroxyde d'hydrogène	Espèce réactive de l'oxygène	Oxydant Messenger chimique	Drabkova et al., 2007
Hydroperoxyde de cumène	Peroxyde organique : ROS	Induit l'activité des superoxydes dismutases, peroxydases, catalases.	Shaish et al., 1993 Mittler & Tel-Or, 1991
Acifluorfené-méthyl	Diphényl éther (herbicide)	Provoque l'accumulation de tétrapyrroles (principalement des porphyrines), eux-mêmes producteurs d'oxygène singulet sous l'induction de la lumière. Interactions possibles avec les pigments de la photosynthèse (caroténoïdes, chlorophylles) Toxicité sur les algues.	Matringe & Scala, 1988 Shaish et al., 1993 Jeong & Choi, 2016
Azides	Famille moléculaire large dérivée de l'acide hydrazoïque $\text{HN}_3$	Effets variés et dépendants de l'espèce. Inhibe la respiration cellulaire (découplage de la phosphorylation oxydative) et l'activité des catalases et des superoxyde dismutases. Inhibe les cytochromes oxydases. Provoque la dépolarisation de la membrane par accumulation des anions azides dans la cellule.	Stavis Shaish et al., 1993
Rose Bengale	Dérivé de la fluorescéine	Producteur d'oxygène singulet sous l'action de la lumière	Banks et al., 1985 Shaish et al., 1993
Bleu de méthylène	Dérivé chloré organique	Producteur d'oxygène singulet sous l'action de la lumière. Interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires.	Schäfer et al., 2004 Fukuzawa et al., 1997

## 2. Protocoles

### 2.1. Détermination de la toxicité du peroxyde d'hydrogène

Une expérience préliminaire a été réalisée pour obtenir une première estimation de l'effet de concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène sur la croissance de *Tisochrysis lutea* CCAP 927/14, estimé d'après la quantité de microalgues produites après 5 jours de cultures en batch réalisées en erlenmeyers, sous agitation magnétique, dans un incubateur (MLR-351, Sanyo). La température a été maintenue à 28°C, et la lumière en cycle jour/nuit 12/12 à 250  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ . Le pH n'était pas régulé. Les cultures ont été inoculées pour obtenir une concentration initiale  $1,2 \times 10^4$  cell/L, et du peroxyde d'hydrogène a été ajouté pour obtenir les concentrations de 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 et 500  $\mu\text{mol/L}$ . La concentration et la taille des

cellules ont été déterminées en début et fin de culture à l'aide d'un compteur à particules (HIAC), et la production cellulaire est calculée d'après la différence des concentrations finales et initiales.

## 2.2. Impact du peroxyde d'hydrogène à l'inoculation sur la croissance

Une seconde expérience a été réalisée pour suivre plus précisément la dynamique de la croissance en batch de la même souche soumise à des concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène. Les cultures ont été réalisées en triplicats dans des multicultivateurs MC 1000-OD (Photon Systems Instruments), à 28°C, sous illumination continue à 250  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  et sans régulation du pH. Le peroxyde d'hydrogène a été ajouté à des concentrations initiales de 0, 10, 25, 50 et 75  $\mu\text{mol/L}$  pour une concentration cellulaire de  $1,2 \times 10^4$  cell/mL. Pour obtenir un suivi précis des cultures, des mesures d'absorbance à 720 nm ont été réalisées à haute fréquence (10 min) pendant 18 jours de culture, et des mesures occasionnelles de concentrations cellulaires ont été effectuées au compteur HIAC aux jours 6, 7, 10, 11 et 18.

En fin de culture, des échantillons de 2 mL ont été filtrés en duplicats sur filtre Whatman GF/C (pores 1,2  $\mu\text{m}$ ) préalablement brûlés, puis stockés à l'étuve à 75°C avant d'effectuer les analyses de carbone et d'azote particulaires (analyseur élémentaire CHN, 2400 Series II CHNS/O, Perkin-Elmer). Les volumes résiduels des triplicats de culture ont été rassemblés en un seul échantillon de volume suffisant pour une analyse fine des lipides, qui, après centrifugation à 2000 g pendant 15 min (10°C), a été stocké à -80°C. Les lipides ont été extraits et analysés selon la méthode décrite dans le chapitre 2.

Les taux de croissance maximaux ont été calculés à partir des données d'absorbance, selon la méthode décrite dans le chapitre 2.

## 3. Détermination du seuil de toxicité du peroxyde d'hydrogène $\text{H}_2\text{O}_2$

Le but de cette première expérience était de déterminer les niveaux de concentrations de peroxyde d'hydrogène suffisants pour induire une pression de sélection tout en préservant la viabilité des cellules. La gamme de concentration testée est relativement étendue mais reste de l'ordre du micromolaire, parce que la concentration cellulaire de l'inoculum était faible. La quantité de peroxyde d'hydrogène par cellule reste donc dans les gammes testées dans la littérature. En effet, Drabkova et al. (2007) ont testé, sur une cyanobactérie, une diatomée et une algue verte, une gamme allant de 0 à 588  $\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène pour une concentration cellulaire de 2 à  $5 \times 10^5$  cellules/mL. Sivaramakrishnan & Inchaorensakdi (2017) ont utilisé une gamme allant de 0 à 5 mmol/L sur *Scenedesmus* sp., pour des densités optiques initiales à 730nm de 0.05 u.a. (pas d'indication des concentrations cellulaires initiales).

Ce test préliminaire (tableau 2) a permis de déterminer que les concentrations supérieures à 200  $\mu\text{mol/L}$  limitent fortement la multiplication des cellules au cours d'une culture en batch de 5 jours. Deux hypothèses non exclusives permettent d'expliquer les différences de densité cellulaire finale observées parmi les traitements. La première est une réduction du taux de croissance avec les concentrations initiales croissantes de peroxyde d'hydrogène (les cellules se divisent moins rapidement), traduisant un effet sur le cycle cellulaire ou le métabolisme (Chen et al., 2016). Cette hypothèse est corroborée par l'accroissement du diamètre cellulaire moyen, lequel a généralement tendance à augmenter au sein d'une population lorsque le cycle cellulaire est bloqué avant la phase

de division. Incapables de se diviser, les cellules resteraient dans une phase du cycle cellulaire où leur volume atteint sa valeur maximale en raison de l'incorporation continue de carbone photosynthétique en régime lumineux constant (Cooksey et al., 1989). La seconde hypothèse est un accroissement du temps de latence initial avec l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène, résultant d'une mortalité rapide et d'une lyse d'une partie des cellules et donc de la population initiale (Nyström, 2004 ; Franklin et al., 2006), ou bien d'un temps plus long nécessaire à leur détoxification.

**Tableau 7 : diamètre cellulaire et augmentation cellulaire après 5 jours de croissance en batch, pour 9 cultures soumises à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène à l'inoculation – Concentration cellulaire de l'inoculum :  $1,2 \times 10^4$  cell/mL ; diamètre moyen de l'inoculum :  $4,78 \mu\text{m}$**

Concentration H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol/L)	Diamètre cellulaire (μm)	Augmentation de densité cellulaire (cell/mL)
10	3,79	$4,218 \times 10^6$
25	4,26	$1,858 \times 10^6$
50	4,22	$8,75 \times 10^5$
75	4,52	$2,98 \times 10^5$
100	4,43	$1,08 \times 10^5$
200	4,56	$1,40 \times 10^5$
300	4,91	$1,79 \times 10^4$
400	4,95	$2,03 \times 10^4$
500	5,04	$3,41 \times 10^4$

Pour l'expérience suivante, les 4 concentrations les plus faibles ont été retenues.

#### **4. Impact du peroxyde d'hydrogène sur la croissance initiale d'une culture de *Tisochrysis lutea***

Le but de cette expérience était de suivre plus précisément la dynamique de croissance (durée de la phase de latence, taux de croissance maximal, densité cellulaire maximale atteinte) de cultures soumises à des concentrations initiales croissantes de peroxyde d'hydrogène. La linéarité des relations de la figure 20 montre que la mesure de l'absorbance à 720 nm constitue une bonne approximation de la densité cellulaire mesurée au HIAC. Cette mesure a donc été utilisée pour mesurer le taux de croissance exponentiel maximal, calculé d'après la pente estimée sur la partie linéaire de la relation entre le logarithme népérien de la turbidité et le temps (figure 21).

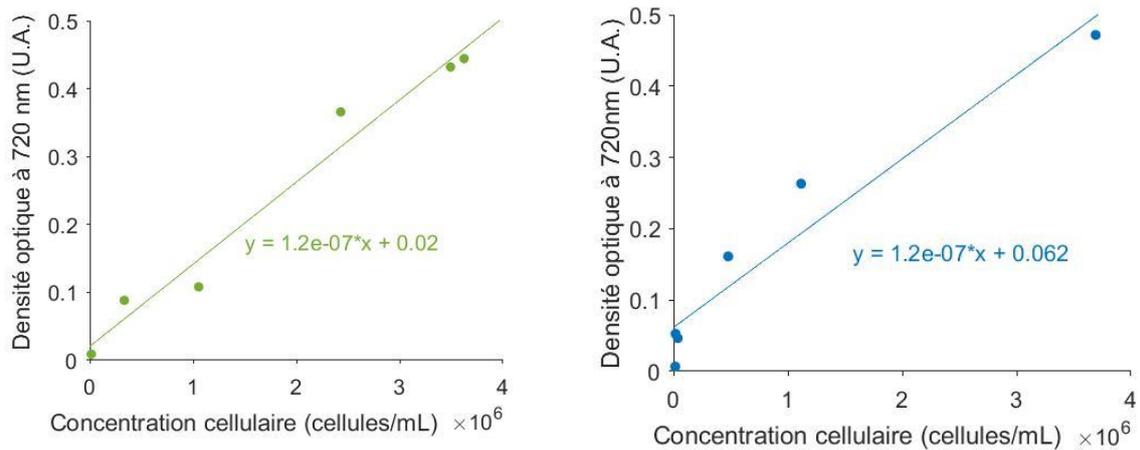


Figure 20 : Exemple de relations entre l'absorbance à 720 nm et la concentration cellulaire pour 2 cultures.

Suivant les cultures et la longueur de la phase de latence, il y a donc un décalage dans le temps d'une culture à l'autre, comme le montre l'exemple du graphique ci-dessous.

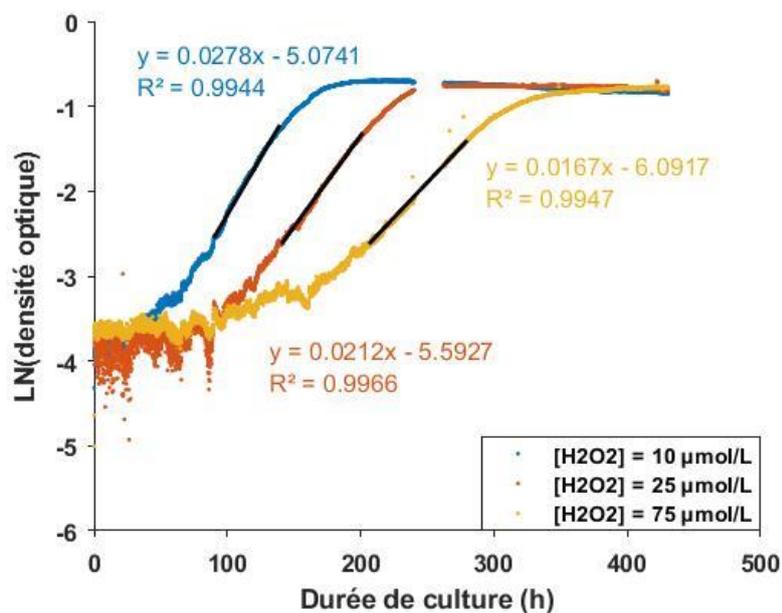


Figure 21 : Exemple de calcul du taux de croissance à partir du logarithme népérien des valeurs d'absorbance.

#### 4.1. Impact sur la croissance

Comme supposé lors de l'expérience préliminaire, les figures 22 et 23 montrent que la durée de la phase de latence est bien corrélée avec la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène, ce qui traduit probablement une proportion de cellules lysées directement après l'inoculation (Nyström, 2004 ; Franklin et al., 2006) et un temps de détoxification plus importants aux concentrations plus élevées. La sensibilité du capteur de densité optique ne permet pas de détecter une diminution de la concentration cellulaire dans les heures qui suivent l'inoculation. Le test de corrélation de Pearson montre une très forte corrélation positive entre la concentration initiale en peroxyde d'hydrogène et le temps de latence pour les concentrations testées (0-75 µmol/L) : en effet, le coefficient de

corrélation est de 0.9785 et la p-value de 0.0038. La relation de corrélation est présentée en figure 23.

Sur la figure 22, on voit que les absorbances maximales atteintes par les cultures à 10  $\mu\text{mol/L}$  et 25  $\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène sont inférieures à l'absorbance maximale atteinte par le témoin pendant la culture en batch. Par contre, il n'y a plus de différence d'absorbance entre ces deux cultures soumises à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à la fin de l'expérience, mais leur valeur d'absorbance reste inférieure à celle du témoin à la fin de l'expérience. Une explication pourrait être que les cellules utilisent une partie des nutriments présents dans le milieu lors de leur détoxification ; il en reste donc moins à disposition des cellules lorsque la croissance redémarre, et le développement cellulaire maximal que peut permettre le milieu appauvri est inférieur à celui que peut soutenir le milieu « neuf ». Les cultures à 50 et 75  $\mu\text{mol/L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'ont pas atteint leur pic d'absorbance pendant la durée de l'expérience, à cause de leur phase de latence beaucoup plus longue. Toutefois, l'absorbance la plus haute, atteinte à la fin de l'expérience, pour la culture à 50  $\mu\text{mol/L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est plus élevée que les pics d'absorbance pour les cultures à 10  $\mu\text{mol/L}$  et 25  $\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène.

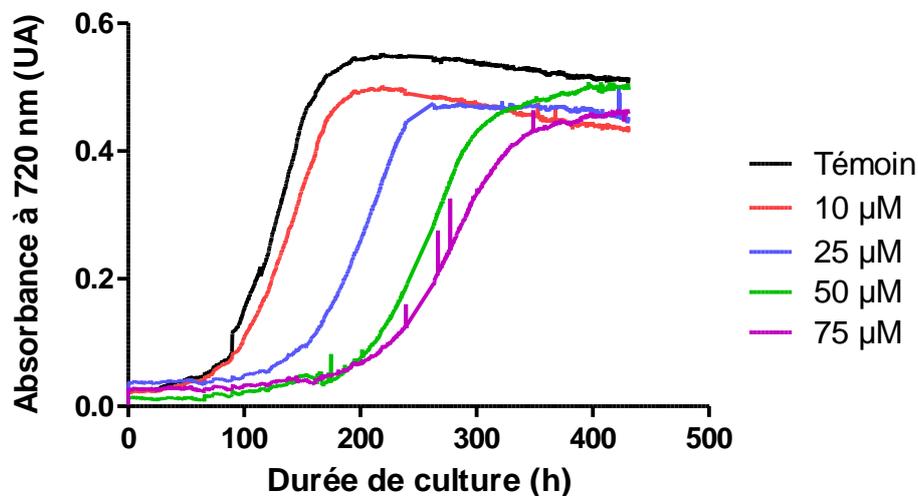


Figure 22 : Suivi de l'absorbance à 720 nm. Valeurs moyennées sur des triplicats de mesures (n=3) sauf pour la concentration 75  $\mu\text{M}$  (duplicat, n=2).

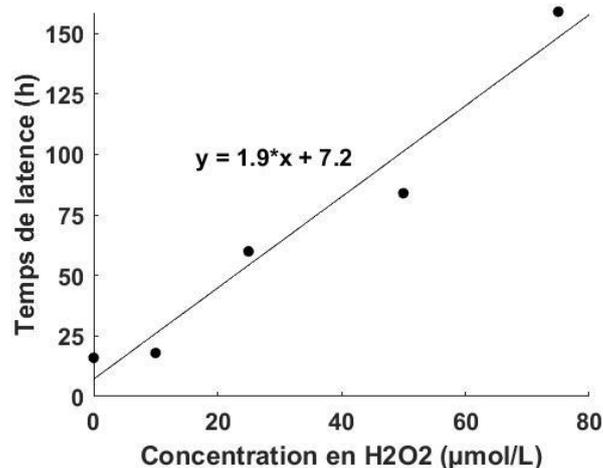


Figure 23 : Corrélation entre le temps de latence des cultures et la concentration initiale en peroxyde d'hydrogène.

Bien que variables, les taux de croissance maximaux mesurés sont inversement corrélés avec la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène (tableau 3) (Test de corrélation de Pearson : coefficient de -0.8964 et p-value de 0.039). Les taux de croissance sont deux à quatre fois plus faibles que ceux mesurés par Huang et al. (2019) dans des conditions de culture proches ( $\mu = 1,8-1,9 \text{ j}^{-1}$ , milieu Conway Walne, 27°C, illumination continue à 300  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ). Cela pourrait résulter de l'inhibition de la croissance des cellules intactes par des composés relargués (polysaccharides, lipides, acides gras libres, Baldi et al., 1997) par les cellules lysées au moment de l'inoculation. Le milieu des cultures en batch n'étant pas renouvelé, l'effet inhibiteur est à la mesure de la lyse cellulaire, et donc de la concentration initiale en peroxyde d'hydrogène. L'autre possibilité est une inhibition de la croissance par le peroxyde d'hydrogène (Burch & Frank, 2016 ; Chen et al., 2016). En effet, le temps de demi-vie du peroxyde d'hydrogène dans l'eau de mer est de l'ordre de quelques heures à quelques dizaines d'heures (Cooper & Zepp, 1990 ; Petasne & Zika, 1997 ; Yuan & Shiller, 2004, Roe et al. 2016) et les temps de latence mesurés s'échelonnent entre environ 18h pour les cultures à 10  $\mu\text{mol/L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et environ 159h pour les cultures à 75  $\mu\text{mol/L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Tableau 8 : Taux de croissance maximaux - triplicats sauf 75  $\mu\text{M}$ , duplicat**

Concentration	0	10	25	50	75
$\mu_{\text{max}} (\text{j}^{-1})$	$0.861 \pm 0.432$	$0.635 \pm 0.219$	$0.541 \pm 0.225$	$0.482 \pm 0.093$	$0.403 \pm 0.02$

D'après ces observations, on peut conclure que le peroxyde d'hydrogène a un impact immédiat sur la croissance de *Tisochrysis lutea* cultivée en batch. Mais, des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier les hypothèses avancées sur la lyse cellulaire, le blocage du cycle cellulaire, la toxicité du peroxyde d'hydrogène, l'effet inhibiteur de substances relarguées par les cellules lysées, et la limitation éventuelle par des nutriments arrivés à épuisement. Notamment, l'usage de la cytométrie permettrait d'apporter un éclairage supplémentaire sur les hypothèses concernant le cycle cellulaire et la viabilité des cellules.

#### 4.2. Impact sur la composition lipidique

L'analyse du carbone et de l'azote particulaire (fig. 24) montre que toutes les cultures sont carencées en azote à la fin de l'expérience. En effet, les valeurs de ratio sont toutes inférieures à 0,1 alors que celui d'une culture de *T. lutea* non carencée est de l'ordre de 0,13-0,14 (Garnier et al., 2016). Pourtant, les phases stationnaires n'ont pas toutes eu la même durée (d'environ 230h pour les cultures-témoin à environ 130h pour les cultures avec 75  $\mu\text{mol/L}$  à l'inoculation, qui ont eu la phase de latence la plus longue).

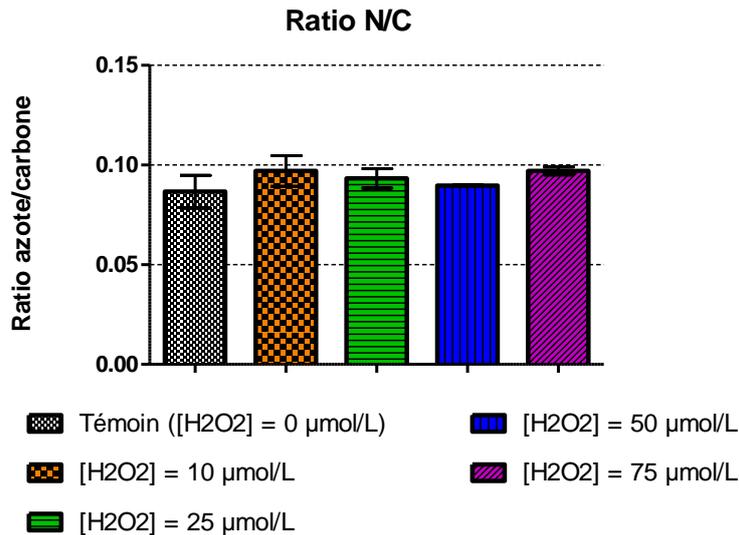


Figure 24 : ratio N/C massique dans les cultures à la fin de l'expérience, au moment du prélèvement pour analyses lipidiques. Valeurs moyennées sur des triplicats (n=3)

### Classes lipidiques

L'analyse des fractions lipidiques (fig. 25) montre une accumulation de lipides neutres dans tous les échantillons, qui peut être due à la fois au statut physiologique de la culture (phase stationnaire) (Fidalgo et al., 1998) et à l'effet du peroxyde d'hydrogène ajouté initialement (Burch & Frank, 2016 ; Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2017). Le peroxyde d'hydrogène a un temps de demi-vie dans l'eau de mer bien inférieur (de 8h jusqu'à 5 jours, Petasne & Zika, 1997) à la durée de 18 jours des cultures, il n'y en a donc plus dans le milieu de culture à la fin de l'expérience. De plus, le témoin (sans peroxyde d'hydrogène) présente une proportion de lipides neutres similaire à celle des autres conditions. L'hypothèse du statut physiologique des cellules semble à privilégier sur celle d'un effet à J18 du peroxyde d'hydrogène.

Les proportions de glycolipides et de phospholipides sont par contre plus variables d'un échantillon à l'autre. Elles sont équivalentes (~20%) dans le témoin et très proches dans les échantillons à 25 et 50 µmol/L, pour lesquelles les phospholipides sont légèrement plus importants que les glycolipides. Par contre, les échantillons à 10 et 75 µmol/L ont des comportements opposés. En effet, il y a 2 fois plus de phospholipides que de glycolipides dans l'échantillon à 75µmol/L et inversement dans celui à 10 µmol/L. Cela pourrait être lié aux différences des durées de phase stationnaire. En effet, Fidalgo et al. (1998) ont constaté une diminution de la proportion de phospholipides dans les cellules entre le début et la fin de la phase stationnaire chez *Tisochrysis lutea*. Attention, la fraction glycolipides de l'échantillon à 75µmol/L est surestimée, dû à une contamination de cette fraction lors de la séparation des classes lipidiques.

En effet, des modifications du profil lipidique de *T. lutea* ont été constatées pendant la phase stationnaire de leur croissance (Huang et al., 2019 ; Garnier et al., 2016). Tout d'abord, l'arrêt de la division cellulaire provoque une réduction de la synthèse de lipides polaires au profit des lipides neutres. Il a déjà été suggéré que cette accumulation de lipides neutres provient à la fois d'une synthèse de novo et du recyclage d'une partie des lipides polaires, qui sont réincorporés dans les lipides neutres (Garnier et al., 2016). Lors d'une carence azotée, les voies de synthèse des TAGs n'est pas particulièrement induites et la production de TAGs est possible via l'hydrolyse des lipides

membranaires (Tonon et al., 2002 ; Guihéneuf et al., 2013). Par contre (Huang et al., 2019), les membranes thylakoïdales subissent d'importantes modifications, avec une réduction de la teneur en sulfoquinovasyldaicylglycéroles (SQDG). Les monogalactosyldiacylglycéroles (MGDG), digalactosyldiacylglycéroles (DGDG) et phosphatidylglycéroles (PG) seraient moins affectés. Ces réorganisations seraient nécessaires pour permettre des adaptations du métabolisme photosynthétique.

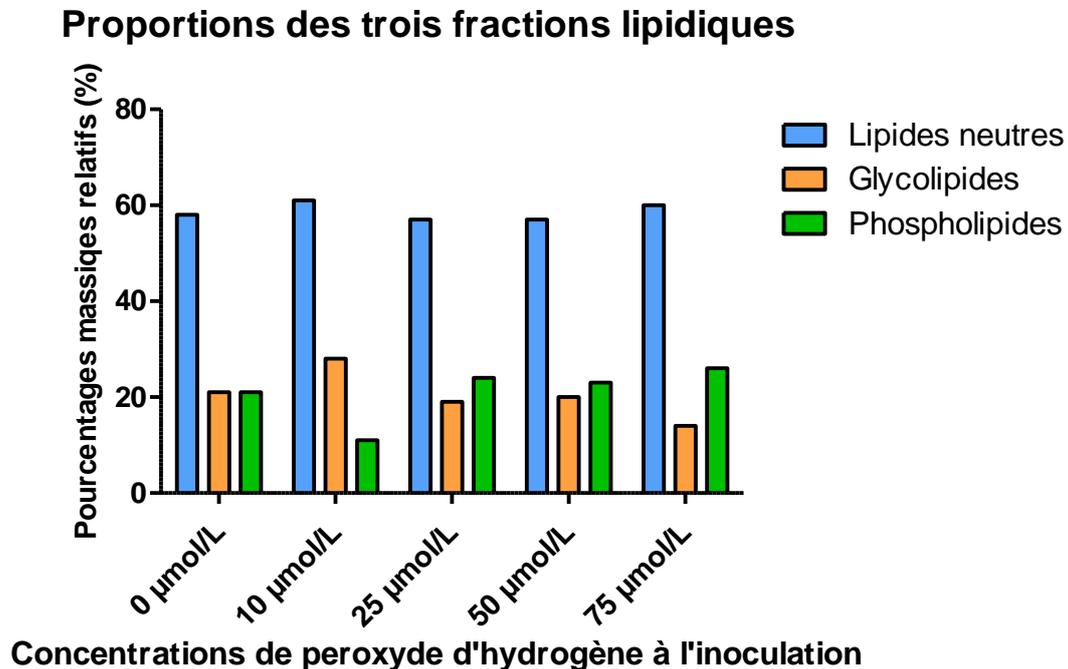


Figure 25 : fractions lipidiques (lipides neutres, glycolipides, phospholipides) dans les échantillons

Pendant la phase stationnaire, deux situations peuvent coexister. Dans la première, la culture est composée de cellules qui se divisent et qui meurent approximativement au même rythme, ce qui se traduit par un taux de croissance net (apparent) nul. Dans la seconde, il n'y a ni croissance ni mortalité, les cellules survivent sans se diviser, dans un état pseudo-végétatif (Nyström, 2004). Il est probable que ces situations respectives évoluent au cours du temps. Ainsi, au début de la phase stationnaire, la majorité des cellules continueraient de croître, mais la mortalité compenserait cette croissance. Lorsque la phase stationnaire se prolonge, la proportion de cellules bloquées dans leur cycle cellulaire et incapables de se multiplier augmenterait pour finalement devenir majoritaire. Enfin, si la phase stationnaire se prolonge encore, ces cellules entameraient un processus de lyse, et la culture dont l'effectif décroît entre dans sa phase de sénescence (Fredriksson & Nyström, 2006 ; Franklin et al., 2006).

Or, une cellule qui se divise, même lentement, est dans un état métabolique différent de celui d'une cellule arrêtée dans son cycle cellulaire (Nyström, 2004). En particulier, une cellule en division produit des membranes plasmiques, composées de phospholipides (Jackowski, 1996). Il semble donc logique qu'elle possède proportionnellement plus de phospholipides que de glycolipides. *A contrario*, une cellule qui ne se divise pas va plutôt modifier les membranes de ses organites intracellulaires (Huang et al., 2019 ; Zienkiewicz et al., 2020) afin d'impacter son métabolisme, en particulier celles des chloroplastes qui hébergent les chaînes photosynthétiques. Les membranes des chloroplastes

étant composées de glycolipides, ces cellules pourraient présenter une proportion de glycolipides plus importante que de phospholipides. Le suivi de la croissance des cultures (fig. 22) montre que leur phase stationnaire est d'autant plus courte que la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène est grande. La phase stationnaire a en effet été atteinte de plus en plus tard, puisque la phase de stress initiale était de plus en plus longue lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène augmentait. La culture à 10  $\mu\text{mol/L}$  était donc potentiellement plus proche de la phase de sénescence que celle à 25  $\mu\text{mol/L}$ , elle-même plus proche de la phase de sénescence que la culture à 50  $\mu\text{mol/L}$ , et la culture à 75  $\mu\text{mol/L}$  la plus éloignée de la sénescence. La culture à 10  $\mu\text{mol/L}$  aurait donc la plus grande proportion de cellules dans un état « figé » et la plus faible encore en croissance, tandis que ce serait l'inverse pour la culture à 75  $\mu\text{mol/L}$ . Cela pourrait expliquer pourquoi les proportions de glycolipides et de phospholipides semblent s'inverser progressivement lorsque la concentration initiale en peroxyde d'hydrogène augmente.

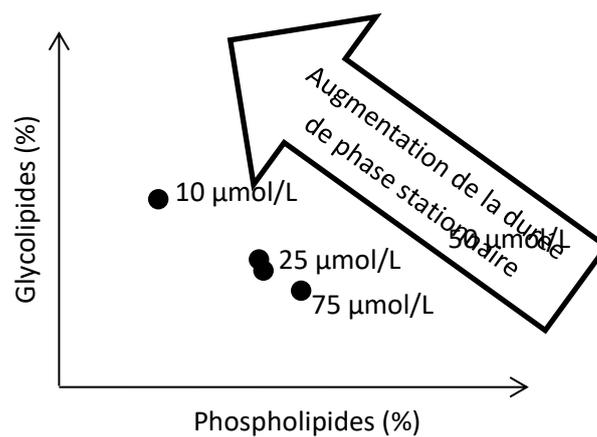


Figure 26 : Schéma de l'évolution des proportions de glycolipides et de phospholipides

Les proportions de glycolipides et phospholipides du témoin, chez lequel la phase stationnaire a pourtant été la plus longue, ne correspondent pas à ce schéma (fig. 26). Toutefois, cette culture, qui n'a pas reçu de peroxyde d'hydrogène à l'inoculation, n'a pas subi de stress. Il est par conséquent possible que cela ait eu un impact sur la résistance des cellules (Chen et al., 2016). Sans stress initial, la proportion de la population de cellules capables de conserver un métabolisme élevé au cours du temps est accrue, de sorte que l'on n'observe pas le réarrangement lipidique observé chez les populations de cellules ayant subi un stress initial.

### **Profile d'acides gras dans les lipides polaires**

Les principaux acides gras (représentant plus de 2% des acides gras totaux) présents respectivement dans les phospholipides et les glycolipides ont été analysés. Ce sont les mêmes dans ces deux classes, à l'exception du 22:5 $\omega$ 6 qui excède les 2% uniquement dans les phospholipides. Il y a donc deux acides gras saturés, 3 acides gras mono-insaturés et 3 acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les phospholipides contre 2 AGPI dans les glycolipides. Les proportions de ces acides gras diffèrent toutefois dans les 2 classes, bien qu'il soit difficile de dégager une tendance sur leurs variations. *Attention, la fraction glycolipides à 75  $\mu\text{mol/L}$  ayant été contaminée, la quantification de ses acides gras est à prendre avec précaution.*

Tableau 9 : variations des principaux acides gras dans les phospholipides et les glycolipides

Acide gras	14:0	16:0	16:1 $\omega$ 7	18:1 $\omega$ 9	18:1 $\omega$ 7	18:3 $\omega$ 3	18:4 $\omega$ 3	22:5 $\omega$ 6	22:6 $\omega$ 3
Variations dans les PL	-16% à +21%	-16,2% à +10,4%	-1% à +44%	-34,5% à -2,8%	-10,3% à +33,6%	-50,5% à +73,8%	-40,9% à +20,6%	-10,9% à +13,9%	-23,3% à +13,6%
Variations dans les GL	-5% à +15%	-27% à +3%	+21% à +58%	-17% à +3%	-60% à +28%	-10% à +25%	-8% à +53%	--	-43% à -12%

Il semble que le peroxyde d'hydrogène ait assez peu d'effets sur les glycolipides (fig. 27). Comme la production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène a principalement lieu dans les chloroplastes et dans les peroxysomes, ces deux organites sont probablement mieux équipés pour contrer les effets nocifs de cette molécule (enzymes, antioxydants) (Lesser, 2006). Le seul acide gras qui semble significativement impacté est le 18:4 $\omega$ 7, qui présente une diminution progressive de 50% quand les concentrations de peroxyde d'hydrogène augmentent. Les acides gras majoritaires sont globalement en accord celles de la littérature. En effet, Huang et al. (2019) identifient le 14:0 (13,5% molaire); le 16:0 (14% molaire), le 16:1 $\omega$ 7 (5% molaire), le 18:1 $\omega$ 9 (40% molaire), le 18:2 $\omega$ 6 (2,5% molaire), le 18:3 $\omega$ 3 (5% molaire), le 18:4 $\omega$ 3 (12,5% molaire) et le 22:6 $\omega$ 3 (5% molaire) comme étant les acides gras majoritaires dans les glycolipides de *Tisochrysis lutea*.

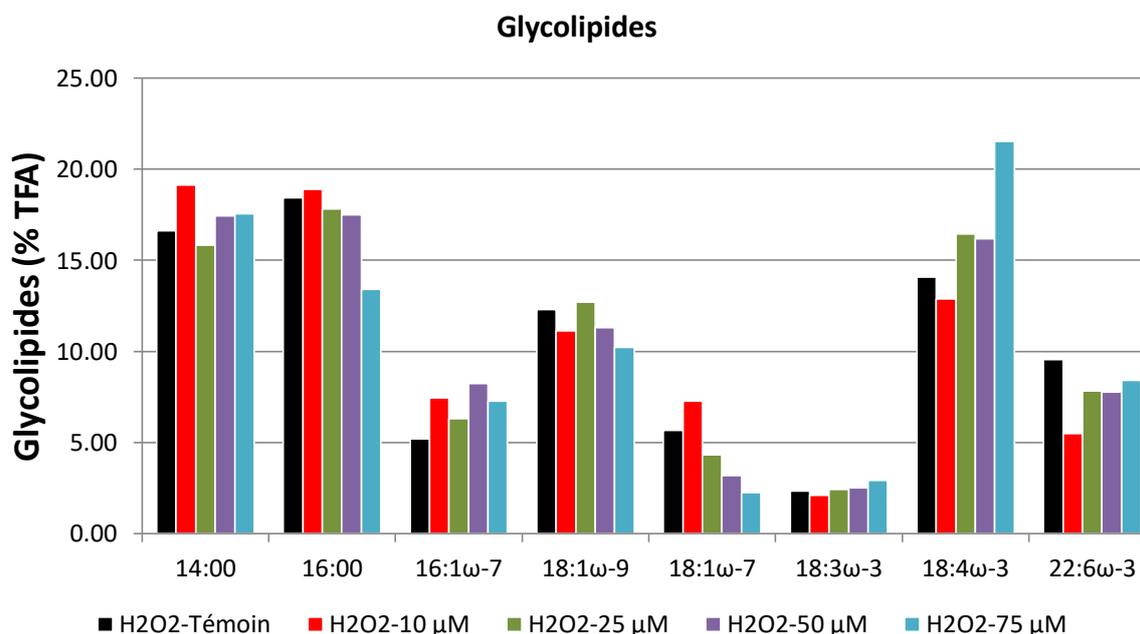


Figure 27 : Principaux acides gras (>2% des acides gras totaux) dans les glycolipides

Dans les phospholipides, Huang et al. (2019) identifient le 14:0 ; le 16:0, le 18:1 $\omega$ 9, et le 22:6 $\omega$ 3. Le profil des principaux acides gras dans les phospholipides est plus riche dans notre expérience (fig. 28). Il semble qu'il y ait un impact positif sur la production de 14:0, de 16:1 $\omega$ 7, de 18:3 $\omega$ 3 et de 18:4 $\omega$ 3. Toutefois, le 16:0 et les deux autres acides gras mono-insaturés semblent négativement impactés, et le 22:6 $\omega$ 3 a des teneurs très variables d'une concentration de peroxyde d'hydrogène à l'autre à l'autre.

Malheureusement, en l'absence d'information sur la variabilité de ces échantillons faute d'analyses répliquées, il n'est pas possible d'affecter un indice de confiance aux variations relatives entre les différents acides gras, et de statuer sur leur significativité statistique. Enfin, comme les cultures ont été récoltées après des phases stationnaires de durées variables, il n'est pas possible de discerner si les modifications du profil lipidique observées résultent de différences de l'état physiologique des cultures ou de l'effet du peroxyde d'hydrogène ajouté lors de l'inoculation. Toutefois, le peroxyde d'hydrogène étant un agent oxydant, s'il avait un effet sur les lipides on devrait observer une diminution des AGPI, très sensibles à l'oxydation, corrélée à l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Or c'est plutôt la tendance inverse qui est observée, avec une augmentation du 16:1 $\omega$ 7, du 18:3 $\omega$ 3 et du 18:4 $\omega$ 3. Cela sous-entend que le peroxyde d'hydrogène n'a plus d'effet sur les lipides après 18 jours de culture, et c'est cohérent avec son temps de demi-vie dans l'eau de mer (<5 jours, Petasne & Zika, 1997)). Cela semble également montrer qu'après 18 jours de culture en batch, les cellules initialement soumises à des concentrations de peroxyde d'hydrogène élevées sont moins stressées. Elles ont eu un temps de latence plus long, donc un démarrage de la croissance plus tardif et sont par conséquent probablement moins avancées dans la carence en nutriments.

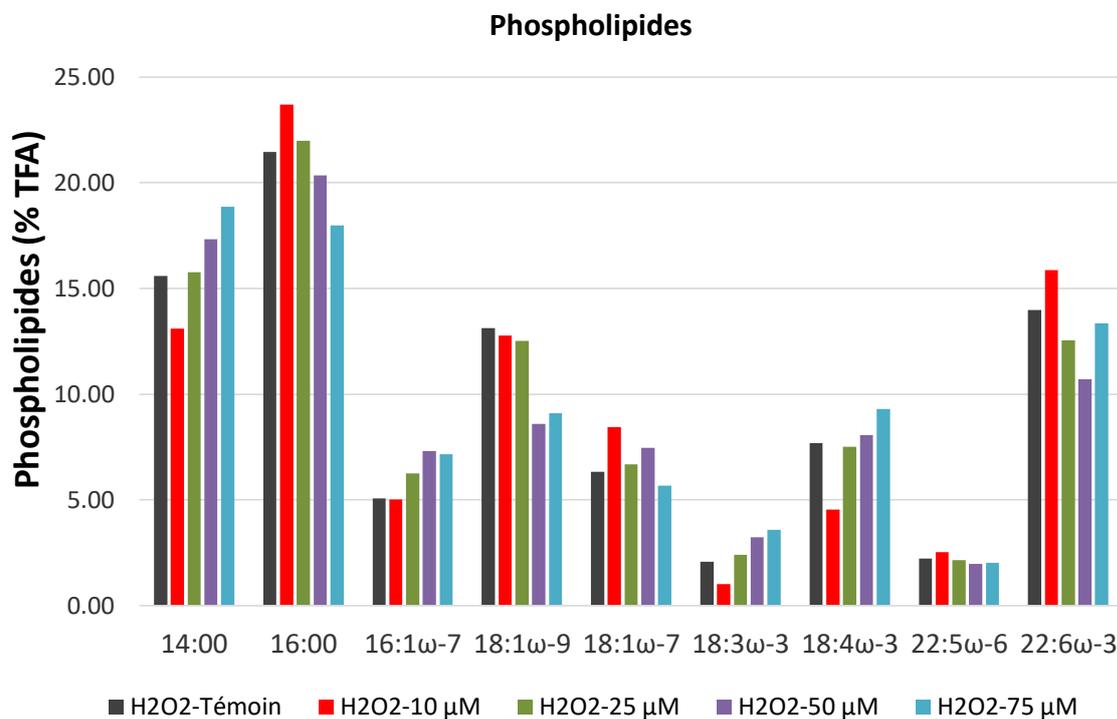


Figure 28 : Principaux acides gras (>2% des acides gras totaux) dans les phospholipides.

Pour conclure, le peroxyde d'hydrogène a un impact très net sur le temps de latence des cultures, lequel est positivement corrélé à la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène. Plus la concentration de peroxyde d'hydrogène à l'inoculation est importante, plus le temps de latence est long. Le peroxyde d'hydrogène impacte aussi, mais dans une moindre mesure, le taux de croissance maximal et la biomasse maximale des batch cultures. En effet, ils sont moins importants pour des cultures qui ont été mises en présence de peroxyde d'hydrogène à l'inoculation. Malheureusement, il ne nous est pas possible de statuer clairement sur un effet possible du peroxyde d'hydrogène sur la composition des lipides polaires, laquelle dépend aussi du statut physiologique des cellules. Pour cela, il faudrait reproduire cette expérience avec des volumes de culture plus importants, permettant

de prélever des triplicats d'échantillons pour l'analyse des lipides, et en effectuant la récolte des échantillons sur des cultures arrivées au même stade de leur croissance. Le suivi en temps réel de la turbidité permettrait d'effectuer les prélèvements décalés de chaque culture, de façon qu'ils échantillonnent des cellules ayant vécu des phases stationnaires de mêmes durées. Une autre possibilité serait d'utiliser un mode de culture en continu, le turbidostat, qui permet d'atteindre un état d'équilibre avec un état physiologique donné.

## Liste des figures et tableaux

Figure 20 : Exemple de relations entre l'absorbance à 720 nm et la concentration cellulaire pour 2 cultures. ....	62
Figure 21 : Exemple de calcul du taux de croissance à partir du logarithme népérien des valeurs d'absorbance.....	62
Figure 22 : Suivi de l'absorbance à 720 nm. Valeurs moyennées sur des triplicats de mesures (n=3) sauf pour la concentration 75 µM (duplicat, n=2). ....	63
Figure 23 : Corrélation entre le temps de latence des cultures et la concentration initiale en peroxyde d'hydrogène. ....	63
Figure 24 : ratio N/C massique dans les cultures à la fin de l'expérience, au moment du prélèvement pour analyses lipidiques. Valeurs moyennées sur des triplicats (n=3) .....	65
Figure 25 : fractions lipidiques (lipides neutres, glycolipides, phospholipides) dans les échantillons ..	66
Figure 26 : Schéma de l'évolution des proportions de glycolipides et de phospholipides.....	67
Figure 27 : Principaux acides gras (>2% des acides gras totaux) dans les glycolipides .....	68
Figure 28 : Principaux acides gras (>2% des acides gras totaux) dans les phospholipides.....	69
Tableau 6 : synthèse des effets de différentes molécules oxydantes utilisées.....	59
Tableau 7 : diamètre cellulaire et augmentation cellulaire après 5 jours de croissance en batch, pour 9 cultures soumises à différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène à l'inoculation – Concentration cellulaire de l'inoculum : $1,2 \times 10^4$ cell/mL ; diamètre moyen de l'inoculum : 4,78 µm .	61
Tableau 8 : Taux de croissance maximaux - triplicats sauf 75 µM, duplicat .....	64
Tableau 9 : variations des principaux acides gras dans les phospholipides et les glycolipides .....	68



## Chapitre 4 : Utiliser le stress thermique et l'évolution dirigée en laboratoire pour améliorer la teneur en lipides polaires de *Tisochrysis lutea*

La première expérience d'évolution dirigée en laboratoire a été conduite avec un stress thermique, dans le but d'impacter les membranes cellulaires. En effet, les membranes sont composées de lipides polaires. Les phospholipides composent la membrane plasmique et ses invaginations, les glycolipides composent les membranes chloroplastiques. En soumettant les cellules à des variations brutales de température pendant 6 mois, il devrait être possible de faire émerger une population avec une capacité accrue à modifier sa composition de lipides polaires. Cela serait en effet nécessaire pour maintenir l'homéostasie membranaire (fluidité, entièresité, etc). De plus, en diminuant la température basse plus rapidement que la température haute n'augmente, il pourrait y avoir une adaptation de la population aux basses températures comme observé par Bonnefond et al. (2017). Cela se traduirait par une teneur plus importante en acides gras polyinsaturés dans les lipides polaires. Enfin, cette expérience a été lancée sur un consortium initial de 12 souches de *Tisochrysis lutea*, afin de maximiser la diversité génétique de départ. Cela permet d'augmenter la probabilité d'avoir un ou plusieurs individus à fort potentiel dans la population de départ.

*Ce chapitre correspond à une publication soumise à Applied Microbiology and Biotechnology*

### Enhancing PUFA-rich polar lipids in *Tisochrysis lutea* using dynamic Darwinian selection with thermal stress

Manon Gachelin<sup>1</sup>, Marc Boutoute<sup>1</sup>, Gregory Carrier<sup>2</sup>, Amélie Talec<sup>1</sup>, Eric Pruvost<sup>1</sup>, Freddy Guihéneuf<sup>1,4</sup>, Olivier Bernard<sup>3</sup>, Antoine Sciandra<sup>1</sup>

**1** Sorbonne Universités, CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV, UMR 7093), 06230 Villefranche-sur-Mer, France

**2** Laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues (PBA), IFREMER, Nantes, France

**3** Biocore, INRIA Sophia Antipolis Méditerranée, Valbonne, France

**4** SAS Inalve, 181 chemin du lazaret, 06230 Villefranche-sur-Mer, France

### Introduction

Microalgae are known for their diverse and original metabolisms, leading to an ability to produce many bioactive compounds depending on species and cultivation strategies. They therefore offer potential applications in food and feed, cosmetics, and pharmaceuticals (Spolaore et al., 2006). Microalgae have an interesting potential for food and feed, as natural resources become more and more limited (FAO, 2017). The phenotypic plasticity of their metabolisms allows to cope with environmental fluctuations. It can also be enhanced to better fit their cultivation conditions and optimise their industrial productivities. Adaptive laboratory evolution (ALE) is widely used for strain improvement of yeast and bacteria (Dragosits and Mattanovich, 2013 ; Wang et al., 2014). Few studies have been published, which tested evolution protocols on microalgae, but they obtained promising results to enhance different metabolic pathways. Bonnefond et al., (2017) enhanced lipid productivity. Fu et al. (2012, 2013) increased carotenoid content. Perrineau et al., (2013) observed

higher tolerance to high salinity. Li et al., (2015) obtained cells resistant to high CO<sub>2</sub> concentration. Wang et al., (2016) enhanced the phenol degradation capacity.

Fish oils are often the lipid sources in feed, resulting in pressuring wild fish stocks. Moreover fish oil supply is unsecured, with fluctuating quality and quantity along the year. There is therefore room for another source of lipids (Naylor et al., 2009). Some microalgae species can accumulate 20 to 50% lipid in dry biomass and even up to 80% under certain conditions (Santo-Sanchez et al., 2016; Bellou et al., 2014). Their fatty acid (FA) profile can be rich in specific essential fatty acids,  $\omega$ 3- and  $\omega$ 6- long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) (over 20% of total fatty acids). Temperature is a factor that strongly influence growth rate and lipid content (Roleda et al., 2013; Zhu et al., 2016) with strong species-specific effects (Zhu et al., 2016; Renaud et al., 1995; Thompson et al., 1992; Renaud et al., 2002; Bonnefond et al., 2017). Temperature also affects the saturated/unsaturated FA ratio and profile (Renaud et al., 1995; Thompson et al., 1992). It has been hypothesized that this acclimation contributes to maintain membrane fluidity (Ackman et al., 1968; Mortensen et al., 1998).

Temperature has already been used as a selection factor in long term adaptive experiments to improve lipid productivity. A 6-month experiments with *Tisochrysis lutea* consisting in applying daily fluctuating temperatures of increasing amplitude (Bonnefond et al., 2017) contributed to enlarge thermal niche (+16%) together with the maximal growth rate (+9%). It also resulted in modifying the FA profile. The key idea of this evolution experiment was to maintain a dynamic selection pressure to force the cells to permanently acclimate to their environment, this is the reason why such protocol was called “dynamic Darwinian selection” (DDS).

Here we use DDS for enhancing *Tisochrysis lutea* in PUFA-rich polar lipids. This oleaginous microalga is commonly used in aquaculture (Rico-Villa et al., 2006) especially for its significant content of docosahexaenoic acid (DHA) (Renaud et al., 1995; Thompson et al., 1992; Liu et al., 2013). Twelve wild-type strains were equi-proportionally mixed in the inoculum to increase initial genomic diversity. This mix of strains was continuously cultivated for 6 months under thermal stress. The DDS experiment consisted in daily fluctuating temperature with increasing amplitude. The stress intensity (amplitude of the fluctuations) was increased weekly, balancing between a reasonable growth rate and the induction of durable modifications in the fatty acid profile of polar lipids. Genomics analyses were performed at the end of each selection cycle to determine the remaining strains and track genomic modifications.

## Material and methods

### Microalgal strains

The 12 strains of the photoautotrophic microalga *Tisochrysis lutea* used in this study (Chap. 2, table 1) originated from culture collections (CCAP927/14, CCMP463, RCC179, RCC1344, RCC3691, RCC3692, RCC3693, RCC3699, NIVA 4-91, IMFG and Argenton 1998). The strain Tiso S-5 (maintained at PBA laboratory, IFREMER, Nantes, France) was derived from the original strain CCAP927/14 after a sequential selection procedure (1% lowest lipid content).

## Cultivation device and protocol

### *The dynamic Darwinian selection (DDS) device*

The microalgae were grown under computer-controlled conditions in duplicate flat panel photobioreactors (TL1 and TL2), 6 cm-culture thickness. These home-designed water-jacketed 1.8 L photobioreactors (called "selectiostats", see Fig. 1) were specially designed to maintain and survey continuous cultures for several months. Biofouling was prevented as much as possible by bubbling 0.2  $\mu\text{m}$  filtered air along the transparent walls of the selectiostats, and their simple geometry makes the optical measurements of PAR and turbidity reliable.

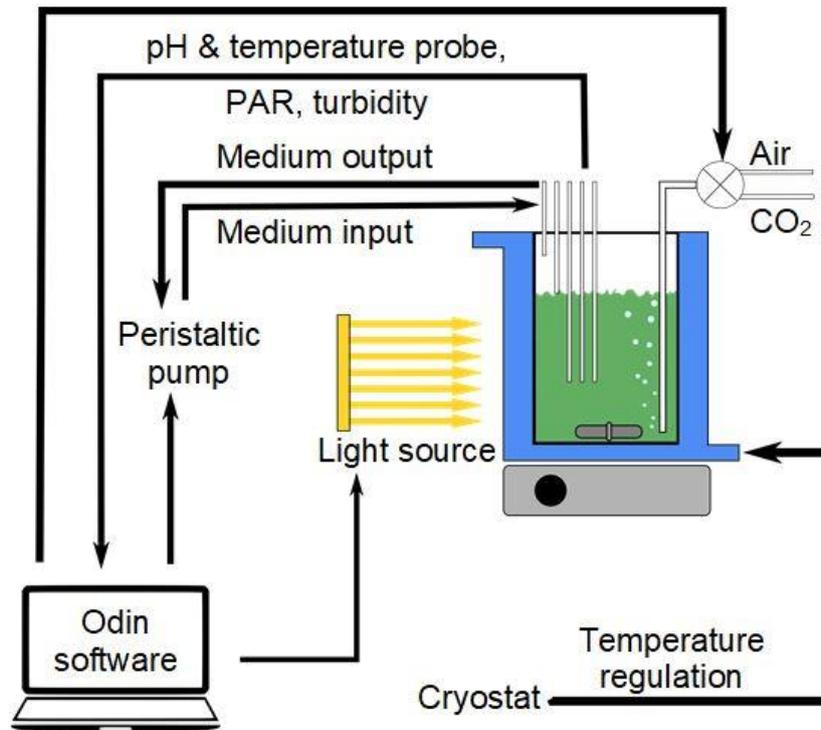


Figure 29 : Simplified diagram of a selectiostat and its controlled parameters.

Cultures were grown in turbidostat mode, i.e. dilution rate was automatically regulated to maintain the turbidity and thus cell density between 3.5 and 4 million cells.mL<sup>-1</sup>. Turbidity was estimated from the beam attenuation of a light source at 750 nm through the thickness of the culture. It was kept sufficiently low to avoid self-shading and nutrient limitation. Continuous light was provided by a LED panel (Nichia NVSL219BT 2700°K) placed on one side of the photobioreactor. Intensity of incident light in the visible spectrum (PAR: Photosynthetically Active Radiation) was set at 300  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , and occasionally controlled with a spherical Biosphere Instrument QSL-100 probe. PAR was also continuously measured with a flat Skye PAR Quantum Sensor probe positioned against the transparent wall on the other side of the photobioreactor. Measured PAR behind the photobioreactor was oscillating between 150 and 200  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Cultures were homogenized through magnetic stirring and bubbling. pH was continuously measured and regulated at 8.2 by controlled micro-injections of CO<sub>2</sub> in the bubbled air. The renewing medium was prepared in 20 L Nalgen tanks with autoclaved (121 °C, 30 min), 0.2  $\mu\text{m}$  filtered natural seawater, enriched with sterile Conway-Walne medium (Walne, 1974). Medium was introduced in the selectiostats with a peristaltic pump (Gilson Minipuls 3), through a 0.22  $\mu\text{m}$  Whatman filter. The flow rate of the peristaltic pumps was automatically regulated and regularly checked.

As temperature was the stressing factor, special attention has been paid to its control. In particular, the stainless-steel frame of the selectiostats were designed to reduce thermal inertia of cultures as much as possible, that allowed a rapid circulation of fresh water whose temperature was regulated with a programmable cryostat (Lauda Proline RP845). Temperature regime imposed to selectiostats (Table 1) followed a succession of cycles, each of them consisting in a diel alternation of 16 and 8 hours at high (HT) and low (LT) temperatures, respectively. The low and high temperatures were chosen in such a way that the mean daily temperature remained constant throughout the whole experiment (around 24 °C), except for the last cycle.

**Table 1 : Temperature stress cycles implemented in the selectiostats during the 150-days of ALE experiment. \*As the cultures collapsed on the second day of S7 cycle, they were restarted with less stressful conditions, identical to those of S5 cycle.**

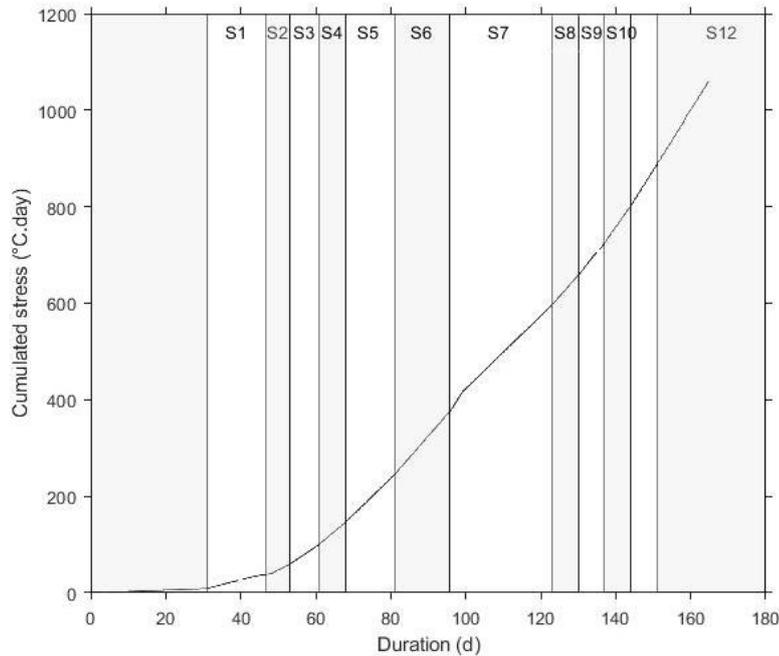
Stress cycle	HT (°C)	LT (°C)	Cycle duration (days)	Mean Temperature (°C)
S1	26	21	15	24.33
S2	27	19	7	24.33
S3	28	17	7	24.33
S4	29	16	7	24.67
S5	30	14	15	24.67
S6	31	12	15	24.67
S7	32	10	2*	24.67
S8	30	14	24	24.67
S9	31	12	7	24.67
S10	32	10	7	24.67
S11	33	8	7	24.67
S12	34	6	15	24.67
S13	35	8	7	26.00

The decision to shift from one cycle to the next one depended on the culture fitness (estimated from the growth rate), according to the “ratchet” protocol experienced by Bonnefond et al. (2017).

A stress indicator (Fig. 2) cumulating the pressure that the cells have faced in the selectiostat from initial experimental time to current time  $t$  was calculated as the cumulated difference from the reference temperature:

$$\check{\varphi}(T) = \int_0^t |T - T_{ref}| dt$$

$T$  being the temperature at time  $t$  and  $T_{ref} = 24$  °C, the non-stressful temperature chosen as reference.



**Figure 30 : Calculated stress indicator representing the cumulated stressed faced by the cells in the selectiostats during the experiment.**

Before use, selectiostats were sterilized with 10% HCl for 20 min and rinsed with sterile culture medium (note they had to be cleaned similarly 3 times during the experiment to eliminate biofouling). They were inoculated with an assemblage of the 12 strain cultures at the same concentration ( $15000 \text{ cells.mL}^{-1}$ ). The ODIN software (developed by Inria) allowed automatic control of the selectiostats, by recording at high frequency the parameters measured online (PAR, turbidity, pH, temperature, speed of dilution pump), and by controlling the pump speed to maintain constant turbidity (see Fig. 29).

Cell density was estimated, using a relationship established between the continuous acquisitions of turbidity and cell concentrations measured twice a month with a Multisizer 3 Beckman coulter. Cell density in continuous cultures varies accordingly to the following equation:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx \quad (1)$$

with  $x$ , the cell concentration,  $\mu$ , the net growth rate and  $D$ , the dilution rate (medium flow rate divided by culture volume). When the turbidostat is at equilibrium ( $\frac{dx}{dt} = 0$ ), the net growth rate equals the dilution rate.

### **Standardized measurements of the overall mixed-population properties**

At the end of each stress cycle, a benchmark experiment in standardized conditions was performed to measure the properties of the overall mixed-population. Triplicate batch cultures of 85 mL were inoculated with samples taken in each selectiostat. Duplicate batch cultures inoculated with the initial strain *T. lutea* CCAP 927/14 was systematically cultivated in parallel and served as reference. Indeed, CCAP 927/14 is the strain of *T. lutea* most used in aquaculture. All the cultures were controlled with the Multi-Cultivator MC 1000-OD culturing device (Photon Systems Instruments, PSI). Growth conditions were the same as in the selectiostats, except that  $T^{\circ}\text{C}$  was maintained constant at  $20^{\circ}\text{C}$ , and pH was not regulated. Optical density (OD) was measured continuously at 720 nm in each

flask culture to follow the growth in real time. The maximum growth rate was calculated during the exponential phase, using ODs measured after 24 hours post-inoculation and whose values did not exceed 0.3 (i.e. the value below which OD is linearly correlated with cell density).

Culture samples of 2 mL were filtered in duplicate on pre-combusted glass-fiber filters (Whatman GF/C, threshold 1.2  $\mu\text{m}$ ) and kept at 75 °C until particulate carbon and nitrogen analyses made with a CHN analyzer (2400 Series II CHNS/O, Perkin-Elmer).

As the biomass reached in each batch culture of the PSI Multi-Cultivator was not sufficient for accurate lipid estimation, triplicate cultures were pooled together to provide one large sample. Two sub-samples of 100 mL and 50 mL, centrifuged at 2000g during 15 min (10 °C) after addition of 50  $\mu\text{L}$  of  $\text{FeCl}_3$  (50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) to facilitate sedimentation and formation of cell pellets, were stored at -80 °C until extraction.

### **Lipid extraction and class separation**

Total lipids were extracted following the method previously described by Bligh and Dyer (1959). The total lipids were then dried using a Büchi R-200 rotavapor and then freeze-dried to remove solvent traces, then determined gravimetrically and stored at -80 °C under nitrogen atmosphere.

The lipid classes (i.e. neutral lipids (NL), glycolipids (GL) and phospholipids (PL)) were obtained by solid-phase extraction (SPE) fractionation on silica columns (Interchim, SI-S-500/6 columns) with 6 volumes of chloroform (NL), 4 volumes of acetone (GL), 6 volumes of methanol and 2 of methanol/10% ammonia (PL) (Vorbeck and Marinetti, 1965), respectively. Each class was then dried under vacuum, determined gravimetrically and stored at -80 °C under nitrogen atmosphere.

### **Fatty acids analysis**

To determine the fatty acid (FA) composition and content, the lipid class samples were methylated following the protocol described by Morrison and Smith (1964), with 7% boron trifluoride in methanol and toluene as extraction solvent for the fatty acid methyl esters (FAME). Each sample was washed 3 times to ensure maximal FAME recovery. The FAME profiles for both phospholipids and glycolipids were obtained separately and analyzed quantitatively (fg FAME/cell) and qualitatively (% total fatty acids, TFA). FAME were analyzed by gas chromatography (GC) on a Perkin-Elmer XL Autolab GC equipped with a flame ionization detector (FID) and a quartz capillary column coated with famewax (Restek, 30 m length, 0.32 mm internal diameter). The column was operated isothermally at 182 °C while injector and detector were maintained at 250 °C. Helium was used as carrier gas at 7 psig. The variability was 3% for major components, <9% for intermediate ones and 25% for minor components (<0.5% of total FAME); commercial nonadecanoic acid (19:0) in chloroform was co-injected with FAME sample for FA quantification.

### **DNA extraction and sequencing**

The cell pellets of samples TL1 and TL2 stress cycles S1, S8 and final population S12 were stored at -80 °C prior to DNA extraction, using a phenol-chloroform method described by Hu et al. (2004). Sequencing was carried out with an Illumina HiSeq3000, with 20 to 30  $\mu\text{g}$  of DNA, by the genomic platform GeT-PlaGe, INRA (Toulouse, France). The libraries were realized in TrueSeq Illumina kit (2x150 paired-end sequenced for a DNA fragment of 430 pb on average). Raw data was filtered to

first remove all Illumina residual adapters, and to finish keep the reads with sufficient quality. It was then treated with softwares TrimGalore and home-made script to discard all reads with a mean sequencing score under Q30 or a length shorter than 120pb. After filtering, more than 80% of the total reads were kept for each sample.

The version 2.0 of reference genome of *Tisochrysis lutea* (approx. 85 Mb) (Bertheliet et al., 2018) was used to map the samples' genomes with BWA-MEM software (run with default parameters). For all samples, more than 86% of the pair-reads were aligned properly and in average 225 depth of sequencing genome were obtained for each sample. A search for SNP was performed with Freebayes software (minimal alleles depth: 20, minimal frequency in total reads 5%, pooled-continuous option) (Garrison and Marth, 2012). The results were edited using a home-made script.

To identify the strains coexisting in the cultivated population during the DDS experiment, each of the 12 initial strains were sequenced independently using the same protocol. Some specific SNPs were identified for each of them. These SNPs were used to allow the identification of the strains actually represented in the cultures during the experiment with a cross-comparison of the SNPs in each strain and the two cultivated populations. A presence index was calculated for each initial strain, by dividing its number of SNPs with the total number of SNPs.

Table 2 : Cell concentration, volume and diameter in the Multi-Cultivator devices upon harvest for lipid analysis

Stress cycle	Reference			Culture TL1			Culture TL2		
	cell/mL	Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ )	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	cell/mL	Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ )	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	cell/mL	Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ )	Diameter ( $\mu\text{m}$ )
S1	1.20E+07	48	4.44	1.31E+07	44	4.31	1.33E+07	43	4.29
S2									
S3	1.93E+07	43	4.28	1.73E+07	42	4.26	1.87E+07	42	4.25
S4	1.08E+07	48	4.44	1.49E+07	41	4.22	1.45E+07	40	4.20
S5	1.63E+07	42	4.24	1.43E+07	49	4.43	1.57E+07	44	4.31
S6				6.79E+06	66	4.84	7.62E+06	53	4.51
S7									
S8	1.64E+07	43	4.30	1.42E+07	49	4.42	1.40E+07	51	4.46
S9	1.58E+07	41	4.22	1.00E+07	47	4.33	1.11E+07	49	4.40
S10	1.46E+07	46	4.39	2.19E+07	54	4.55	2.43E+07	48	4.39
S11	1.22E+07	42	4.26	8.19E+06	62	4.71	9.26E+06	54	4.51

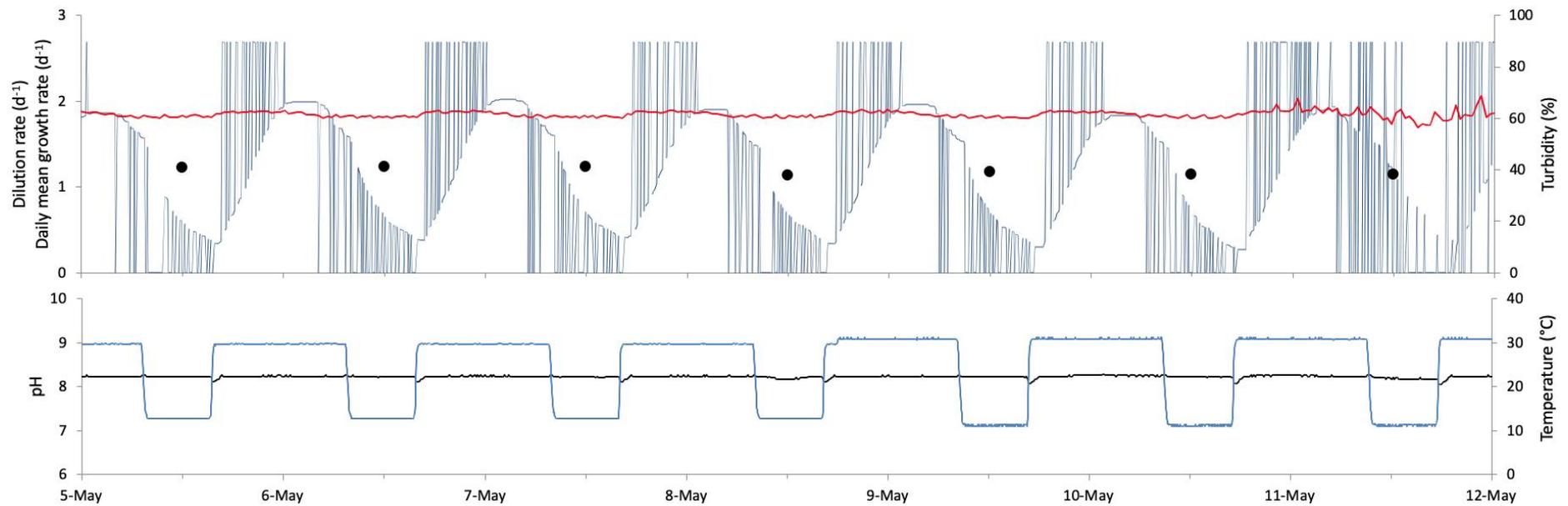


Figure 31 : Monitoring of selectostat TL1 during 1 week. Upper graph, turbidity in red, dilution rate in blue, mean daily growth rate in black dots. Lower graph, pH in black and temperature in blue.

## Results and discussion

### Overall evolution in the selectiostat

An example of the monitoring of selectiostat TL1 over one week is presented in Fig. 31. Turbidity was well regulated by the automatic activation of the peristaltic pump, pH was stable, and temperature variations rapidly tracked the desired pattern between low and high temperatures, meaning that the temperature regulation through the cryostat was efficient.

At the beginning of each high temperature (HT) period, the pump regularly reached its maximum speed to counterbalance growth and keep the turbidity stable by diluting the selectiostat. The pump stabilizes when half of the HT period was reached, which implies culture growth slowed down. Finally, the pump activity reduces, with frequent stops, from  $\frac{3}{4}$  of the HT period and throughout the whole LT period. During that time, the growth of the culture is therefore very limited, as little dilution of the culture is then necessary to maintain a constant turbidity.

The cell growth rate thus presented daily oscillations (Fig. 31), with constant mean daily growth rate. This behavior was different from observations on single-strain continuous cultures by Bonnefond et al. (2017). It might be due to the coexistence of several sub-populations in the selectiostats, which grow alternatively and thus reduce the apparent variations in the growth rate.

A closer look at daily growth rate pattern shows a clear phasing with temperature oscillations. This is probably due to the synchronization of cell division with temperature as already observed in *D. salina* (Bonnefond et al., 2016). Most of the cells divide at the same time during the first half of each HT period, generating an increase in turbidity.

### Phenotype evolution in standardized cultivation conditions

#### Growth rate

The recorded growth rates estimated in the standardized benchmark conditions ( $0.79 \pm 0.17 \text{ d}^{-1}$ ) are consistent with values reported by Bonnefond et al. (2017), who obtained growth rates ranging between 0.5 and 0.6  $\text{d}^{-1}$  at 20 °C, and up to 1.2  $\text{d}^{-1}$  at the optimal growth temperature of the cultures. Growth rate (Fig. 32) was normalized according to the reference. The variations are slightly more important for culture TL1 than for TL2 (0.87-1.31 and 0.88-1.18, respectively). However, a T-test comparing the growth rate of each culture with the control shows no significant difference (p-values 0.66 for TL1 and 0.76 for TL2). This shows that the selection process did not affect the overall growth rate of the population throughout the experiment and contrasts therefore with previous results obtained on mono-strain experiments (Bonnefond et al., 2017; Fu et al., 2012). A possible explanation could be that different sub-populations are coexisting and alternatively growing depending on the conditions, thus reducing the growth rate variations.

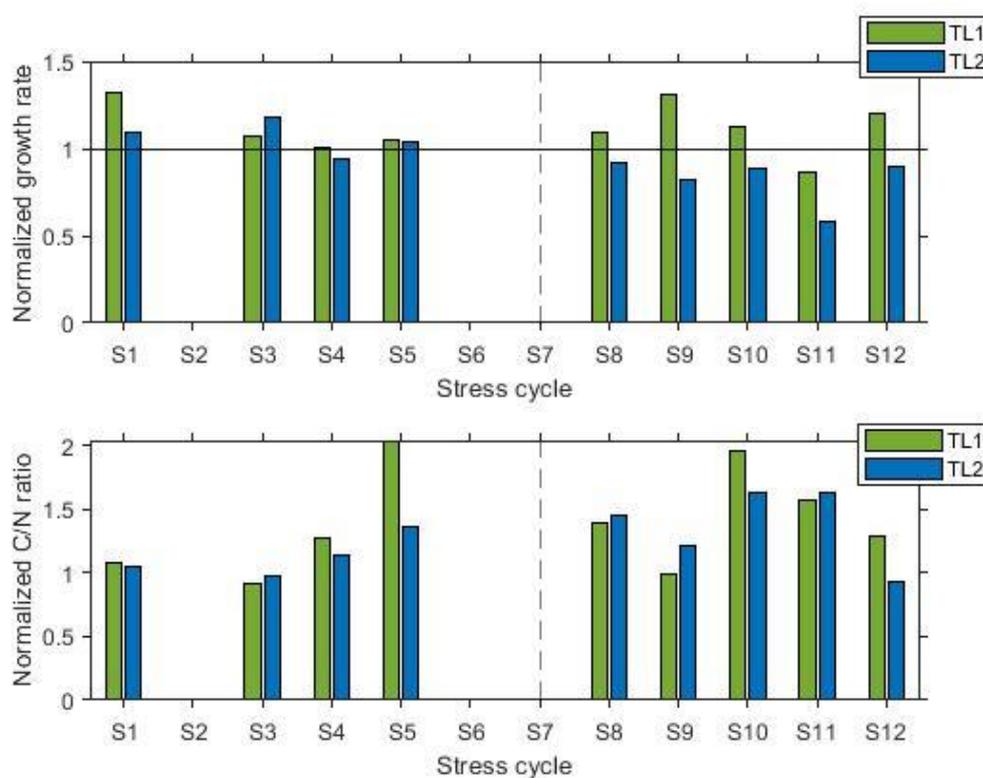


Figure 32 : Normalized growth rates\* and normalized C/N ratio\* of cultures in standardized conditions (PSI Multi-Cultivator device) throughout the experiment, triplicates. No data for stress cycles S2 and S6; cultures collapsed during stress S7. \* Calculated as fold change in growth rate or C/N ratio normalized to the reference.

### Nitrogen content

Nitrogen content in the cells tends to slightly decrease during the experiment while carbon content doubles and stabilizes from stress cycle S5 onwards for TL1 and S8 for TL2 (supplementary data, figure S2), leading to an overall increase in C/N ratio despite the strong variability between cycles. This increase is consistent with the cell volume increase in both cultures from stress cycle S6 onwards (table 2). The slight evolution of cell nitrogen content, as the variability of the normalized C/N ratio (Fig. 32), could be linked to differential growth rates or result from different stresses when inoculating the bench-PSI Multi-Cultivator device. After 7 days, the initial delay may have induced spreading of the time when cells are N limited, and thus different N limitations were reached in the control or in the cultures.

### Total lipid content and lipid classes

The mass of total lipid per cell gradually increases along the selection process. From stress cycle S1 to S12, a progressive enrichment of total lipid content per cell was observed. The gain between two successive stress cycles from S3 to S11 ranged from 8 to 20%. This leads *in fine* to a cellular lipid content increased by 2.1 for TL1 and 1.8 for TL2, whereas the reference culture stays constant at an average value of  $6.158 \pm 0.615$  pg/cell (Fig. 33). The lipid productivity shows the same increasing trend. At the end of the experiment, total and neutral lipid contents are similar to those measured by Da costa et al. (2016, 2017) on their lipid-rich *T. lutea* strain (11.2 pg/cell and 4.3-5.1 pg/cell respectively) in similar growing conditions (continuous  $\sim 200$   $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  white light, 20-23 °C, Conway medium).

Cellular lipid content for each lipid class (5.7-7.8 pg/cell for total lipids, 3.1-7.5 pg/cell for neutral lipids, 1-3.1 pg/cell for phospholipids and 1-2.4 pg/cell for glycolipids) is slightly higher than those measured (via HPTLC) by Carrier et al. (2018) (3-6 pg/cell for total lipids, 0.4-3.1 pg/cell for triacylglycerol, 0.9-1.3 pg/cell for phospholipids and 1.4-1.7 pg/cell for glycolipids). The quantitative measurements of each major lipid class after fractionation (Fig. 33) shows a cellular enrichment of every class from stress cycle S5 onwards.

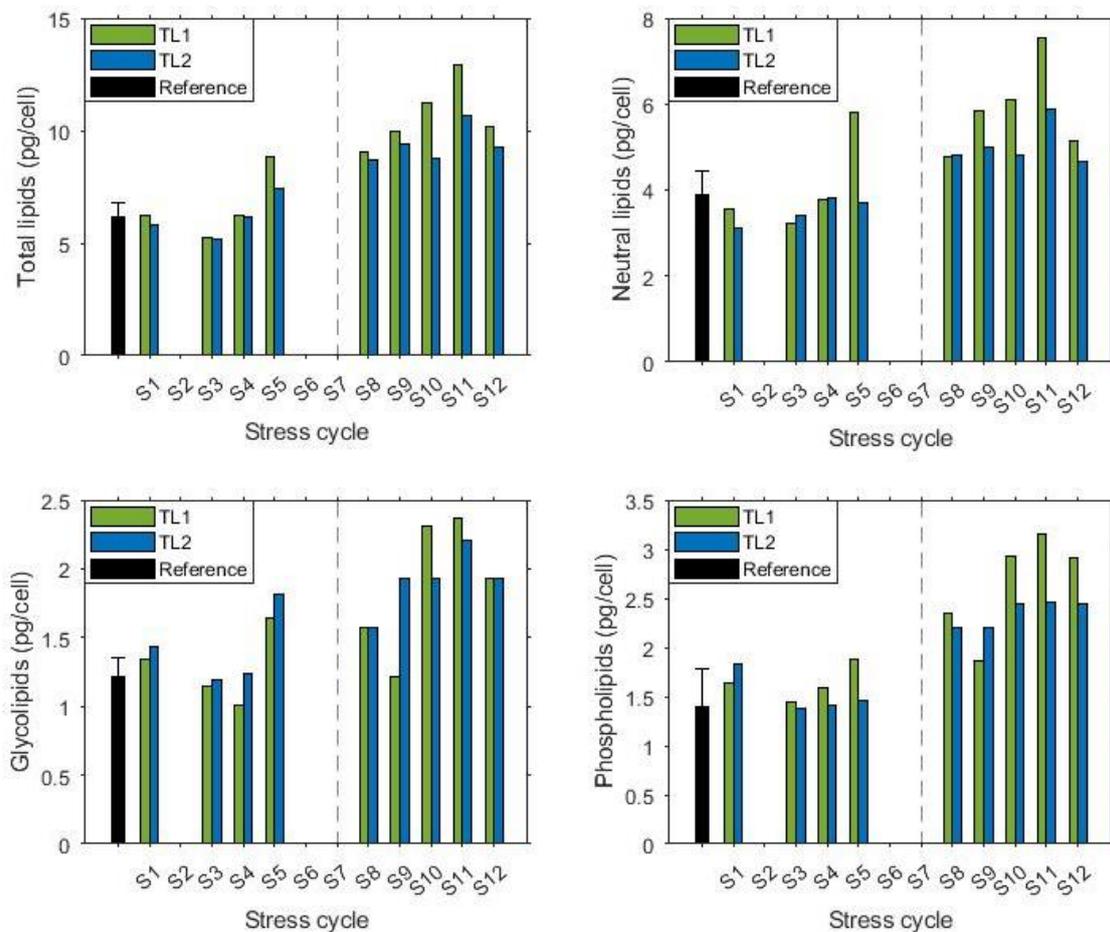


Figure 33 : Evolution of cellular total lipid and lipid class contents (pg/cell) throughout the stress cycles; cultures in standardized cultivation conditions in the Multi-Cultivator. No data for stress cycles S2 and S6; cultures collapsed during stress S7. Reference is an average of 9 measurements on independent cultures.

The selection process occurring in the selectiostats seems to favourably impact lipid metabolism with higher lipid content in all lipid classes; however polar lipids double while neutral lipids increase only by 1.5-fold. This is also visible in the calculated proportions (supplementary data, figure S1), which show a slight decrease for neutral lipids and concomitantly a slight increase in phospholipids while glycolipids remain stable throughout the experiment. These data, and notably the polar lipids changes, are consistent with the measured increase of the cell volume during the experiment (table 2). Indeed, this means that more cell membranes are produced, thus increasing the quantity of phospholipids, but not necessarily more chloroplasts since glycolipids compose thylakoidal membranes and not cell membranes.

Our new population of *T. lutea* fits the major criteria to be used as feed for bivalve larvae (Rico-Villa et al., 2006), i.e. a rapid growth and an easy cultivation (these parameters were not impacted by the evolution process of the experiment). The larger cell diameter (around 5  $\mu\text{m}$  with an increase detected from stress cycle S6 onwards, table 2), is likely to present an improved nutrition value compared to *T. lutea* wild type. Indeed, the observations made by Da Costa et al. (2016) on the growth and survival of *C. gigas* larvae fed with *T. lutea* suggest that a high level of NL within total lipids impedes the larvae's survival. The new mixed-population, with higher polar lipids content compared to NL, is likely to provide a more balanced lipid source as the fatty acid profile of polar lipids (see below) has hardly been affected.

### **Fatty acid composition**

The main fatty acids partitioned to phospholipids are 14:0, 16:0, 18:1 n-9, 18:3 n-3, 18:4 n-3 and 22:6 n-3 in the 2 stressed and reference cultures. The same fatty acids are incorporated into glycolipids together with 18:2 n-6. Overall, fatty acid profiles of polar lipids (GL+PL) (Table 3) are similar to those reported by Marchetti et al. (2018), and closely similar to total fatty acid profile (16% for 14:0, 14.5% for 16:0, 4.2% for 16:1 n-7, 20.1% for 18:1 n-9, 3.6% for 18:3 n-3, 17.4% for 18:4 n-3, 2.5% for 18:5 n-3 and 8.5% for 22:6 n-3) obtained by Volkman et al. (1989). However, they differ from the profiles obtained by Renaud et al. (1995) who cultivated *T. lutea* at 15, 20, 25 and 30 °C. They obtained significantly higher amounts of 14:0 (except at 15 °C), 18:4 n-3 (>20%, >22% respectively) and 18:5 n-3 but only at the lowest temperature (15 °C). On the other hand, they observed lower amounts of 16:0, 18:1 n-9, 18:2 n-6, 22:5 n-6 and DHA except at 15 °C (<9.6%, <8.7%, <4.8%, <1% and <9.7%, respectively). However, Renaud et al. (1995) and Volkman et al. (1989) studied total lipids, not polar lipids, the observed variations can therefore be caused by the specific fatty acid composition of polar lipids, which can greatly differ from the overall fatty acid composition.

The fatty acid profiles at S1 is similar to the reference for both cultures; except 18:1 n-9 which is slightly lower compared to the reference culture (10.63% and 12.81% for TL1 and TL2 respectively,  $16.22 \pm 3.71\%$  for the reference). Similarly, the total SFA and PUFA proportions are similar; the lower total MUFAs in the cultures is linked to their lower 18:1 n-9 content. At S12, the selection process seems to have impacted the fatty acid composition, especially of polar lipids, the two major SFAs (14:0 and/or 16:0) but also DHA have diminished and 18:1 n-9 increased almost two-fold in both stressed cultures. When growth temperature in *T. lutea* was increased from 10 to 20 °C, Thompson et al. (1992) a strong metabolic shift from 16:1 n-7 to 18:1 n-9 and greater production of FA 18:5 n-3. This acclimation strategy is coherent with the lipid adaptation obtained in the DDS experiment. Since 18:1 n-9 is the first unsaturated fatty acid in the PUFA biosynthesis pathway; this could be a metabolic shift of the cells to prioritize the PUFAs biosynthesis pathway over the one of SFAs. The logic of the 18:5 n-3 shifts is unclear as it diminishes of 42% in TL1 and increases of 64% in TL2 between stress cycle S1 and S12. These modifications in the FA profile, along with the measured increase of the cells' biovolume, suggest an adaptation of the membranes to cold temperature. It is consistent with previous observations and conclusions when studying both cell adaptation with a similar approach (Bonfond et al., 2017) and cell acclimation (Renaud et al., 1995).

Table 3 : Proportions of fatty acids in the polar lipids representing more than 0.1%TFA at the beginning and the end of the experiment. Cultures in standardized conditions (PSI Multi-Cultivator device). Reference is an average of 8 measurements on independent cultures.

Fatty acid (% TFA)	Reference	TL1-S1	TL1-S12	TL2-S1	TL2-S12
<u>14:0</u>	<u>13.99 ±3.23</u>	<u>15.21</u>	<u>11.75</u>	<u>16.94</u>	<u>8.01</u>
ISO15:0	0.22 ±0.10	0.22	0.09	0.12	0.04
15:0	0.55 ±0.43	0.70	0.16	0.29	0.13
ISO17:0	0.19 ±0.16	0.30	0.22	0.00	0.39
<u>16:0</u>	<u>15.26 ±2.34</u>	<u>13.58</u>	<u>14.91</u>	<u>16.39</u>	<u>9.61</u>
17:0	0.25 ±0.21	0.35	0.06	0.25	0.06
18:0	0.54 ±0.18	0.52	0.31	0.35	0.30
Total SFAs	<b>31.25 ±5.14</b>	<b>31.02</b>	<b>27.69</b>	<b>37.75</b>	<b>18.67</b>
14:1 n-7	0.13 ±0.13	0.36	0.16	0.16	0.00
14:1 n-5	0.23 ±0.09	0.35	0.21	0.50	0.22
<u>16:1 n-7</u>	<u>3.71 ±0.25</u>	<u>3.27</u>	<u>3.72</u>	<u>3.62</u>	<u>4.01</u>
16:1 n-5	0.15 ±0.10	0.06	0.05	0.21	0.00
17:1 n-10	0.08 ±0.07	0.13	0.03	0.14	0.08
<u>18:1 n-9</u>	<u>16.22 ±3.71</u>	<u>10.63</u>	<u>20.75</u>	<u>12.81</u>	<u>22.35</u>
18:1 n-7	0.35 ±0.22	0.40	1.17	0.35	0.00
18:1 n-5	0.12 ±0.11	0.00	0.05	0.00	0.00
22:1 n-13+11	0.09 ±0.13	0.13	0.00	0.15	0.17
Total MUFAs	<b>21.32 ±3.62</b>	<b>15.42</b>	<b>26.18</b>	<b>18.07</b>	<b>26.87</b>
16:2 n-6	0.20 ±0.17	0.22	0.03	0.25	0.00
16:2 n-4	1.05 ±0.12	0.77	0.76	1.18	0.82
<u>18:2 n-6</u>	<u>4.48 ±0.94</u>	<u>4.37</u>	<u>4.94</u>	<u>3.90</u>	<u>6.10</u>
20:2 n-6	0.14 ±0.04	0.13	0.08	0.15	0.09
16:3 n-4	0.07 ±0.02	0.11	0.05	0.13	0.07
16:3 n-3	0.26 ±0.26	0.29	0.09	0.16	0.13
18:3 n-6	0.16 ±0.08	0.06	0.14	0.08	0.22
<u>18:3 n-3</u>	<u>6.47 ±0.56</u>	<u>6.97</u>	<u>7.90</u>	<u>6.75</u>	<u>7.94</u>
20:3 n-3	0.16 ±0.06	0.04	0.00	0.05	0.11
16:4 n-3	0.06 ±0.03	0.03	0.05	0.09	0.02
16:4 n-1	0.16 ±0.08	0.18	0.10	0.08	0.11
<u>18:4 n-3</u>	<u>14.68 ±2.99</u>	<u>16.40</u>	<u>15.79</u>	<u>14.82</u>	<u>23.64</u>
20:4 n-6	0.10 ±0.07	0.12	0.05	0.06	0.04
22:4 n-6	0.09 ±0.06	0.05	0.00	0.18	0.05
<u>18:5 n-3</u>	<u>3.77 ±0.69</u>	<u>5.57</u>	<u>3.25</u>	<u>3.35</u>	<u>5.50</u>
20:5 n-3	0.26 ±0.10	0.45	0.24	0.35	0.18
21:5 n-3	0.64 ±0.26	0.78	0.55	0.50	0.58
<u>22:5 n-6</u>	<u>2.30 ±0.44</u>	<u>2.39</u>	<u>1.87</u>	<u>2.27</u>	<u>1.04</u>
22:5 n-3	0.13 ±0.07	0.14	0.06	0.23	0.07
<u>22:6 n-3</u>	<u>11.86 ±1.92</u>	<u>14.08</u>	<u>10.12</u>	<u>11.94</u>	<u>7.12</u>
Total PUFAs	<b>47.43 ±6.63</b>	<b>53.55</b>	<b>46.13</b>	<b>44.18</b>	<b>54.47</b>
Others	0.89	0.61	0.28	1.21	0.81
Total n-3 PUFAs	39.29 ±6.95	44.77	38.05	39.23	45.29
Total n-6 PUFAs	7.46 ±1.80	7.356309	7.11	4.89	7.54
n-3/n-6 ratio	5.13	6.09	5.35	5.55	6.00

The cellular content of DHA partitioned to polar lipids nearly tripled between the beginning and the end of the DDS experiment. It is mainly due to the important increase of the total lipid cell content.

DHA increase is significant from stress cycle S8 onwards (Fig. 6). Indeed, in the first half of the experiment, before cycle S7, the DHA content partitioned to polar lipids varies between 50 and 100 fg/cell. In the second half of the experiment, it reaches 200 fg/cell during stress cycles S8 and S9, then increases of  $13\% \pm 3\%$  between stress cycles S9 to S12 for TL1, and 20 to 23% for TL2. This difference could result from the intense stress during cycle S7 which led to the culture crash. It may have caused a stronger selection, and possibly the emergence of a sub-population with a higher DHA content.

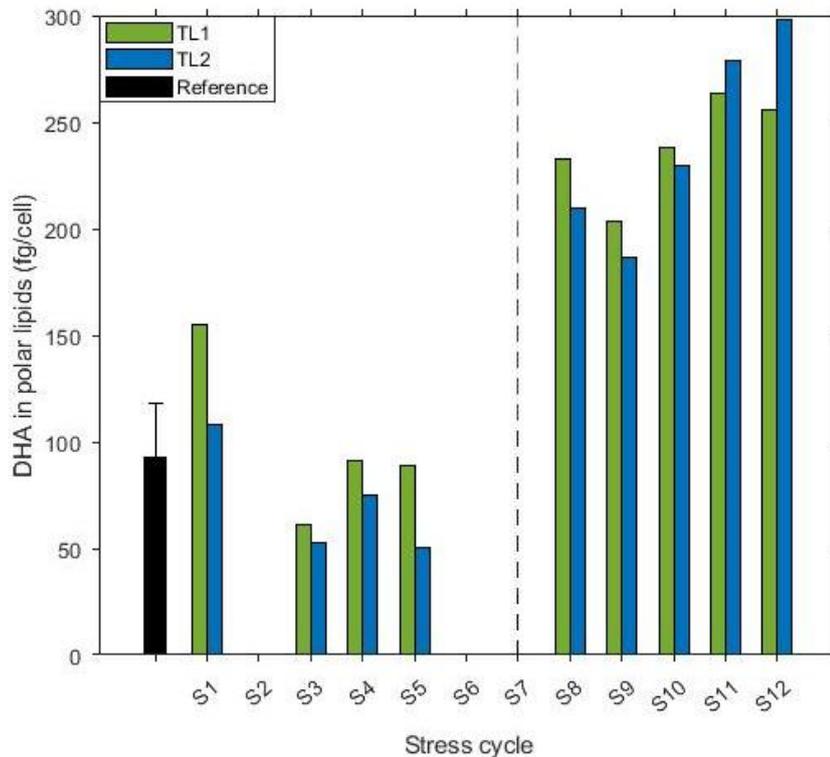


Figure 34 : Evolution of cellular DHA content partitioned to polar lipids. No data for stress cycles S2 and S6; cultures collapsed during stress S7. Reference is an average of 9 measurements on independent cultures.

The importance of PUFAs for the development of *C. gigas* larvae has been extensively studied (Chu and Webb (1984), Rico-Villa et al. (2006), Da Costa et al. (2016)). It was shown that EPA and DHA contents in the range of 7-17% and 7-14% of TFA respectively (Rico-Villa et al., 2006) were necessary to ensure a good larval development. *Tisochrysis lutea* produces only traces of EPA but its DHA content is within the necessary proportion range. However, the cells of our new population are richer in total lipids compared to the reference, therefore it could be a better source of DHA for oysters.

### Genomic analysis

Samples for genomic analysis were taken and analyzed at the end of stress cycle S1, S8 and S12. Through the SNPs search, mutations corresponding to a total change of genotype (disappearance of the initial genotype) were detected in both cultures and for each sequenced sample. It demonstrates an evolution of the initial population rather than a simple selection of some initial characteristics.

The overall presence indexes were calculated from cross-comparison of the global SNPs with the initial ones. Presence indexes inferior to 0.15 means that the corresponding strain is not present in

the population. They ranged between 0.08 and 0.16 except for strains CCMP 463 (0.40) and RCC 1344 (0.50). This demonstrates that these two strains dominate the population, since the beginning of the experiment. Both are originated from low latitudinal coastal areas from north hemisphere: CCMP 463 was isolated in the Caribbean archipelago (Turks and Caicos Islands) and RCC 1344 along the Spanish Atlantic coast (Bendif et al., 2013). This data suggests that, out of the initial twelve-strain assemblage, only CCMP 463 and RCC 1344 compose the population undergoing the stressed cultivation and the final population of *T. lutea*. The 10 other strains were cleaned up during the build-up phase (batch growth and turbidostat stabilization) and during first stress cycle (S1) of the experiment.

Costas et al. (2014) suggested that *I. galbana* wild strain had a “greater genetic variability in fitness”, with a high adaptive potential to thermic stress compared to the other species they studied. Our data tends to confirm this result for *T. lutea*, as the final population was able to grow outside its initial thermal niche.

Total mutation and selection events detected at stress cycle S1, S8 and S12 stayed quite stable for both cultures throughout the experiment (5874, 4743 and 4783 for TL1 and 4870, 3725 and 5232 for TL2 respectively). This is surprising considering the culture crash at stress cycle S7, with the loss of a large fraction of the cells and the observed change in the lipid phenotype, suggesting that this event had little impact on the genomic diversity of the population.

Few SNPs led to a complete change of the genotype, with the disappearance of the initial one: 49 for culture TL1 and 17 for culture TL2. Further analyses on those specific mutations were carried out to determine whether they could be partially responsible for the phenotype changes observed on the final populations. For culture TL2, 2 out of the 17 SNP mutations were localized in coding regions, and 9 out of 49 for culture TL1. Putative associated functionality search on these genes remains on the prospective side, as very little is known on the function of genes in *T. lutea*. Researches of homologous genes in Uniprot database did not lead to associated functionality for 7 of the genes, 2 could be GAG-POL transposons. The last 4, all detected in culture TL1, could be impacting a ClpC protease, a dihydrolipoamide acyltransferase part of the pyruvate deshydrogenase complex, a trehalose-phosphate synthase and a ribonucleotide-diphosphate reductase. Extensive studies of these candidate genes must be conducted to confirm their potential roles. Especially, the ClpC protease could act as a chaperone during heat shocks by targeting denatured proteins and addressing them for degradation (Uniprot database, identified function in *Staphylococcus aureus*). If that role was confirmed in *T. lutea*, it would be very interesting to investigate how it impacts the operation of the protein and potentially link it to the dynamic stress protocol.

## Conclusions

This study demonstrated the efficiency of DDS with an enhanced population of *T. lutea* enriched in PUFA-rich polar lipids. Two strains out of the 12 composing the initial population turn out to survive the adaptation experiment. The observed mutations suggest that evolution took place upon selection. The lipid phenotype drastically changed during the second half of the experiment, with a two fold increase in total lipid content and a threefold increase in the DHA partitioned to polar lipids DHA. As growth rate was not affected, the gain in lipid and DHA is directly a gain in productivity.

## Acknowledgments

This work was performed, in partnership with the SAS PIVERT, within the frame of the French Institute for the Energy Transition (Institut pour la Transition Energétique (ITE) P.I.V.E.R.T. ([www.institut-pivert.com](http://www.institut-pivert.com)) selected as an Investment for the Future ("Investissements d'Avenir"). This work was supported, as part of the Investments for the Future, by the French Government under the reference ANR-001-01.

## Liste des figures et tableaux

Figure 29 : Simplified diagram of a selectiostat and its controlled parameters.....	75
Figure 30 : Calculated stress indicator representing the cumulated stressed faced by the cells in the selectiostats during the experiment.....	77
Figure 31 : Monitoring of selectiostat TL1 during 1 week. Upper graph, turbidity in red, dilution rate in blue, mean daily growth rate in black dots. Lower graph, pH in black and temperature in blue. ....	80
Figure 32 : Normalized growth rates* and normalized C/N ratio* of cultures in standardized conditions (PSI Multi-Cultivator device) throughout the experiment, triplicates. No data for stress cycles S2 and S6; cultures collapsed during stress S7. * Calculated as fold change in growth rate or C/N ratio normalized to the reference. ....	82
Figure 33 : Evolution of cellular total lipid and lipid class contents (pg/cell) throughout the stress cycles; cultures in standardized cultivation conditions in the Multi-Cultivator. No data for stress cycles S2 and S6; cultures collapsed during stress S7. Reference is an average of 9 measurements on independent cultures. ....	83
Figure 34 : Evolution of cellular DHA content partitioned to polar lipids. No data for stress cycles S2 and S6; cultures collapsed during stress S7. Reference is an average of 9 measurements on independent cultures. ....	86
Table 1 : Temperature stress cycles implemented in the selectiostats during the 150-days of ALE experiment. *As the cultures collapsed on the second day of S7 cycle, they were restarted with less stressful conditions, identical to those of S5 cycle. ....	76
Table 2 : Cell concentration, volume and diameter in the Multi-Cultivator devices upon harvest for lipid analysis.....	80
Table 3 : Proportions of fatty acids in the polar lipids representing more than 0.1%TFA at the beginning and the end of the experiment. Cultures in standardized conditions (PSI Multi-Cultivator device). Reference is an average of 8 measurements on independent cultures. ....	85

## Chapitre 5 : Effets conjugués d'un stress thermique et d'un stress lumineux sur les teneurs en lipides polaires riches en acides gras polyinsaturés à longues chaînes chez deux souches de *T. lutea*

Les données présentées dans ce chapitre font l'objet d'un article en cours de rédaction.

### 1. Introduction

L'évolution dirigée en laboratoire est un outil éprouvé pour obtenir des souches de bactéries ou de levures qui présentent un phénotype spécifique (Chapitre 1 – partie 6.1). C'est également une méthode qui a été testée avec succès pour améliorer la croissance des microalgues (Fu et al., 2012), leur tolérance à différents stress (hautes salinités, Perrineau et al. (2013), hautes concentrations en CO<sub>2</sub>, Li et al. (2015)) ou leur teneur en lipides (Bonfond et al. (2017), Gachelin et al. (soumis)) ou en caroténoïdes (Fu et al. (2013)). Cette technique d'évolution peut, en principe, être mise en œuvre pour modifier le profil lipidique d'espèces de microalgues utilisées en aquaculture. Cela permettrait *in fine* de remplacer les huiles de poisson comme source de lipides dans la nourriture animale et dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, certaines microalgues produisent des acides gras essentiels, ainsi que des acides gras à longues chaînes polyinsaturés en  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6. D'autres microalgues sont capables d'accumuler de grandes quantités de lipides : de 20 à 50% de leur masse sèche, voire jusqu'à 80% dans des conditions de culture spécifiques (Santo-Sanchez et al., 2016; Bellou et al., 2014). Le but final de cette expérience était d'améliorer la productivité des cellules en lipides polaires riches en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (AGPI-LC).

Certains paramètres de culture qui peuvent, sur le long terme, modifier la capacité des cellules à produire des lipides sont connus. Parmi eux, la température a été testée dans des protocoles d'évolution en laboratoire, avec des effets bénéfiques sur la productivité de l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) (Gachelin et al. (soumis), Bonfond et al. (2017)). Sur des expériences de plus courte durée, qui étudiaient la réponse métabolique liée à l'acclimatation des cellules à la lumière, un effet sur la production de lipides a été constaté (Wahidin et al. (2013), Del Pilar Sanchez-Saavedra (2015), Marchetti et al. (2018)). Toutefois, les effets combinés de ces deux facteurs n'ont jamais été étudiés dans une expérience d'évolution en laboratoire. Nous pensons que leur combinaison va générer un stress oxydatif au sein des cellules. Or, Sun et al. (2018) et Ren et al. (2017) ont montré qu'un stress oxydatif modéré est associé à une meilleure accumulation de lipides et AGPI-LC plus particulièrement de DHA au sein des cellules de *Cryptocodinium cohnii* et *Schizochytrium* sp.

L'exposition périodique à de hautes intensités lumineuses provoque la production d'espèces réactives de l'oxygène (EPO i.e. ROS en anglais) comme coproduit de la photosynthèse au niveau des photosystèmes I et II (Roach et al., 2015 ; Ksas et al., 2015). Toutefois, lorsque la cellule est soumise à un stress, la photophosphorylation de l'eau et la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH ne fonctionnent pas de manière optimale (Ivanov et al., 2012 ; Roach et al., 2015). Dans le cas d'une mauvaise photophosphorylation, certains électrons ne sont pas transmis à la plastoquinone et viennent réagir avec la molécule de dioxygène. Cela produit des anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, qui dismutent spontanément en peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD) catalysent également cette réaction chimique. Deux sortes de ROS sont donc produits. Pour quelques

espèces, des études ont montré que, à forte intensité lumineuse, 50% des électrons captés par le PS II peuvent rester associés au dioxygène au lieu d'intégrer la chaîne photosynthétique (Waring et al., 2010 ; Roberty et al., 2014). Par ailleurs, une partie de l'énergie excédentaire absorbée par la chlorophylle du PS II est dissipée vers le dioxygène présent dans le lumen des thylakoïdes. Cela forme des oxygènes singulet  $^1O_2$ , une autre forme de ROS (Ivanov et al., 2012). Enfin, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec l'atome de fer de la ferrédoxine et se décomposer en radical hydroxyle  $OH\cdot$ , une quatrième forme de ROS, et en anion hydroxyde  $OH^-$  (réaction de Fenton).

D'autre part, la ferrédoxine réduite peut transmettre ses électrons au dioxygène (réaction de Mehler, Badger et al., 2000 ; Roach et al., 2015) formant ainsi des anions superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Chez les microalgues, Badger et al. (2000) ont montré que 20 à 30% des électrons de la ferrédoxine réduite sont ainsi transmis au dioxygène. Comme dans le cas du PS II, les anions superoxydes peuvent conduire à la formation de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyles. De plus, le rapport NADPH/NADP<sup>+</sup> semble varier avec l'intensité lumineuse (Forti et al., 2003 ; Takahama et al., 1981). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, Forti et al. (2003) montrent que ce rapport augmente quand l'intensité lumineuse augmente. Cela veut dire que le NADP est davantage sous forme réduite lorsque l'intensité lumineuse est élevée, donc qu'il y en a moins sous forme oxydée pour accepter les électrons du PS I. Pour maintenir le cycle d'oxydation/réduction du PS I, il est possible que le transfert des électrons de la ferrédoxine à d'autres accepteurs terminaux, comme le dioxygène, soit favorisé à haute intensité lumineuse, ce qui favoriserait la production de ROS.

Par ailleurs, la température du milieu joue également un rôle dans la production de ROS. Elle impacte le métabolisme des microalgues à plusieurs niveaux, en entraînant des réarrangements membranaires (augmentation des AGPI pour maintenir la fluidité), et en modifiant les cinétiques enzymatiques, ce qui impacte *in fine* l'efficacité photosynthétique (Davison, 1991). Mackey et al. (2013) ont montré que *Synechococcus* sp. régule le flux d'électrons à travers ses chaînes photosynthétiques, suivant la température, en utilisant des phycobiliprotéines. Ainsi, lorsque la température est optimale, les phycobiliprotéines sont associées au PS II pour maximiser le flux d'électrons. Par contre, quand la température est sub-optimale, l'association des phycobiliprotéines au PS I favorise une légère sur-réduction du PS II et limite ainsi le flux d'électrons à travers le PS II. Venkataramanaiah et al. (2003) montrent que l'activité du PS II d'*Arthrospira platensis* est réduite à des températures sub-optimales, alors que l'activité du PS I ne semble pas affectée.

Pour provoquer un stress oxydatif maximal au sein des cellules, il apparaît donc judicieux d'associer les stress thermique et lumineux en opposition de phase (haute intensité lumineuse, basse température et vice-versa). En effet, la température faible va diminuer l'efficacité de détoxification normalement associée à une forte lumière, en réduisant l'activité des enzymes (SOD, catalases, peroxydases, etc.). Elle va également permettre une solubilité accrue du dioxygène dans le milieu. Combiné à la production élevée de ROS autour des chaînes photosynthétiques, cela devrait permettre l'accumulation de ROS pendant la phase d'éclairement intense. Néanmoins, appliquer uniquement une forte intensité lumineuse et une faible température pourrait avoir un impact limité pour des cellules qui mettraient en place des mécanismes d'acclimatation, notamment pour réduire les processus de collecte de photons, par exemple en réduisant leur contenu pigmentaire. L'idée, inspirée de Bonnefond et al. (2017), est de maintenir les cellules dans un état d'acclimatation inadapté à ces stress intenses. Pour l'effet de la lumière, il a été montré (Combe et al. 2015) que la cellule s'acclimatait au niveau moyen de lumière qu'elle rencontre à l'échelle de la journée. Ainsi, en

maintenant une intensité lumineuse moyenne faible, en dépit d'évènements plus ponctuels très intenses, Bonnefond (2015) a maintenu les cellules dans des conditions physiologiques acclimatées aux faibles lumières, pour lesquels les fortes lumières étaient particulièrement impactantes. De la même manière, il s'agissait ici d'appliquer un signal de lumière et de température réduisant le développement de mécanismes de résistance, ainsi que de permettre des périodes de récupération où les cellules retrouveraient un métabolisme plus actif. C'est pour cela qu'un signal en créneau et en opposition phase entre la température et la lumière a été appliqué (haute intensité lumineuse, basse température et vice-versa). Dans notre expérience d'évolution dirigée, nous avons choisi d'augmenter de manière dynamique le stress oxydatif au cours du temps en modifiant uniquement les températures minimales et maximales.

L'expérience d'évolution en laboratoire a été réalisée sur *Tisochrysis lutea*, qui est une microalgue oléagineuse couramment utilisée en aquaculture (Rico-Villa et al., 2006) pour sa teneur importante en DHA (Liu et al., 2013). L'expérience a été menée en duplicats sur une souche sauvage et sur la population résultant de la première expérience d'évolution. La souche RCC3691 a été choisie à cause de sa teneur en lipides polaires. En effet, parmi les 12 souches du laboratoire, c'est celle qui possédait la teneur en lipides polaires la plus importante en fin de phase exponentielle de croissance. La population TLS13, obtenue lors de la première expérience d'évolution sous stress thermique, a été choisie pour deux raisons. Tout d'abord, je voulais essayer de pousser l'évolution de la population encore plus loin, pour voir s'il était possible de provoquer de nouvelles modifications de la teneur ou du profil lipidique. En particulier, les glycolipides avaient été peu impactés pendant la première expérience d'évolution dirigée. De plus, il était intéressant de regarder si cette population, qui avait déjà été soumise à un stress thermique important, possédait une meilleure capacité de résistance aux stress que la souche sauvage sélectionnée.

## 2. Matériel et méthodes

Durant la seconde expérience d'évolution en laboratoire, également conduite en mode turbidostat, le stress a donc été induit par deux facteurs simultanément : la température et la lumière.

### 2.1. Matériel biologique

L'expérience a été conduite sur deux souches de *Tisochrysis lutea*. La première souche, RCC3691, était une souche sauvage isolée à Tahiti; la deuxième, TLS13 avait été obtenue précédemment au laboratoire, grâce une expérience d'évolution sous stress thermique sur un mélange de 12 souches de *T. lutea* (Chapitre 4).

### 2.2. Système de culture et protocole

#### 2.2.1. Les sélectiostats pour l'expérience d'évolution

Les deux souches ont été cultivées en duplicats sur un milieu Conway-Walne filtré sur 0.2  $\mu\text{m}$  puis passé sous UV, avec une salinité de 35g/L, dans les sélectiostats décrits dans le chapitre 2. Les deux cultures de la souche RCC3691 ont été nommées 3691-1 et 3691-2, celles de la population TLS13, TLS13-1 et TLS13-2. Elles ont été maintenues en turbidostat à 1,5 million cellules/mL grâce à l'asservissement de la pompe de renouvellement à la mesure de turbidité en ligne.

Les cultures ont été soumises à un cycle jour/nuit de 12h, synchronisé et en opposition de phase avec les variations de la température : 4h d'illumination à 1200  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  (HL), pendant laquelle la température était basse, et 8h d'obscurité pendant laquelle la température était haute (tableau 1).

Tableau 10: cycles de stress thermiques et lumineux pendant l'expérience, température ( $T_m$ ) et lumière ( $I_m$ ) moyennes. \* perte de la majorité de la biomasse des sélectiostats.

Cycles de stress	HT (°C)	LT (°C)	$T_m$ (°C)	Culture (j)		Intensité lumineuse (HL) ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	$I_m$ ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )
				RCC 3691	TLS13		
S1	28	16	24	7	7	1200	400
S2	29	14	24	7	7	1200	400
S3	30	12	24	7	7	1200	400
S4	31	10	24	7*	3*	1200	400
Batch 3691	24	24	24	7	--	1200	400
Batch TLS13	31	10	24	--	12	1200	400
S4 bis	31	10	24	2*	13	1200	400
Batch 3691	24	24	24	14	--	400 pour RCC3691	
S5	30	12	24	63	49	1200	400

Une mesure de rendement quantique maximum (maximum quantum yield, MQY i.e.  $F_v/F_m$ ) était réalisée avec un fluorimètre Aquapen (chapitre 2) au bout de 7 jours de culture dans ces conditions de stress. Si la mesure était supérieure à 0,5, le stress était augmenté en modifiant les températures minimales et maximales (l'intensité lumineuse reste inchangée), sinon le stress était maintenu à l'identique pour 7 jours supplémentaires.

### 2.2.2. Les multicultivateurs pour les analyses en conditions standardisées

A la fin de chaque cycle de stress, un inoculum était prélevé dans chaque sélectiostat et remis en culture dans les conditions standardisées des multicultivateurs MC 1000-OD (voir chapitre 2). Après 3 jours de croissance dans des conditions standards (400  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  en illumination continue, 21°C, pH non régulé), les cultures étaient diluées à 1,5 million cellules/mL et réparties en triplicats puis remises à croître dans les mêmes conditions pendant 4 jours. Les cultures étaient récoltées à la fin de leur phase exponentielle de croissance. Leurs propriétés ont été comparées à la valeur de référence des souches initiales, cultivées à chaque fois en duplicats dans les mêmes conditions.

Les taux de croissance ont été calculés à partir de la densité optique mesurée à 720 nm pendant la phase exponentielle du deuxième batch de croissance (chapitre 2) ; les mesures de carbone et d'azote particulières ont été réalisées telles que décrites dans le chapitre 2 et le chapitre 4.

### 2.3. Analyses lipidiques

Les analyses lipidiques ont été réalisées en triplicats, à partir de 50 à 65 mL de culture récoltés par centrifugation (2000 g, 15 min, 10°C) et conservés à -80°C jusqu'à extraction et analyses. Les lipides totaux et les classes lipidiques ont été obtenus par le protocole décrit dans les chapitres 2 et 4. La détermination du profil des acides gras a été effectuée par transméthylation selon le protocole de Morrison & Smith (1964) et analyse en chromatographie en phase gazeuse avec un GC-FID (Perkin-Elmer XL Autolab équipé d'un détecteur à ionisation de flamme). La colonne était opérée en gradient

de température linéaire de 2°-minute entre 165 et 225°C, puis maintien à 225°C pendant 20 minutes (chapitre 2). Une quantité connue d'acide nonadécanoïque commercial (19:0) était ajouté en étalon interne dans tous les échantillons pour la quantification, calculée grâce aux rapports de proportionnalité des aires sous pic sur un même chromatogramme.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Cultures dans les sélectiostats : température, lumière et oxygène

Les trois premiers mois de culture, correspondants aux 4 premiers cycles de stress et au début du cycle S5, sont présentés à titre d'exemple sur la figure 36 pour le sélectiostat TLS13-1.

Une fois les turbidostat stabilisés, les taux de croissance sont faibles, inférieur à  $0,4 \text{ j}^{-1}$ , mais restent positifs sauf pendant le cycle de stress S4 (fig. 35). Pendant le cycle de stress S4, les deux souches ne se sont pas comportées de la même manière. En effet, la biomasse des deux sélectiostats de la souche RCC3691 a décliné de manière beaucoup plus brutale que pour la souche TLS13 (flèches noires). Le stress a donc été réduit en appliquant une température constante modérée (24°C, cadres carrés noirs) à deux reprises pour « sauver » et faire repartir les cellules restantes. Les deux sélectiostats de la souche TLS13 ont vu leur biomasse diminuer plus progressivement, et se stabiliser. Il n'a donc jamais été nécessaire d'utiliser cette stratégie de repli.

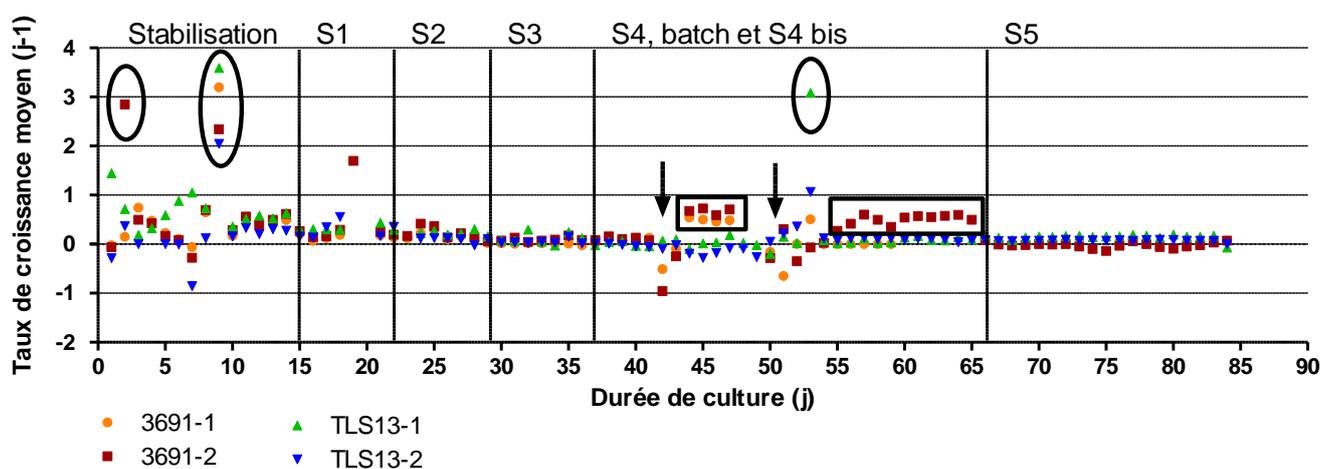


Figure 35: taux de croissance dans les 4 sélectiostats. Flèches, perte de biomasse dans les sélectiostats. Carrés, phases de batch pour les sélectiostats 3691-1 et 3691-2. Ovale : taux de croissance biaisés par le forçage manuel de la pompe afin de diluer les sélectiostats.

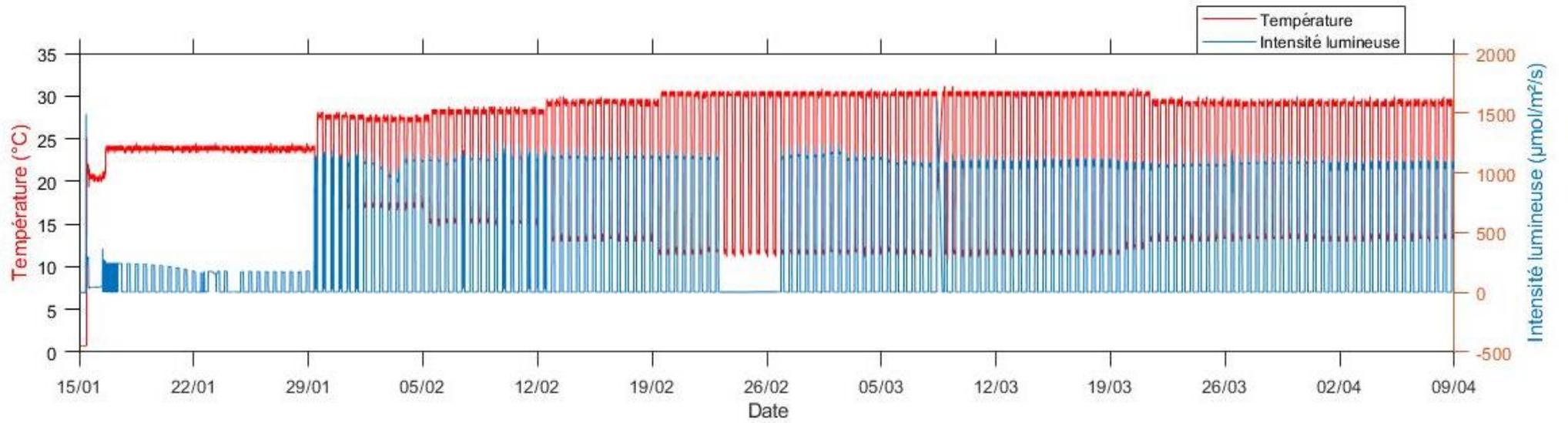
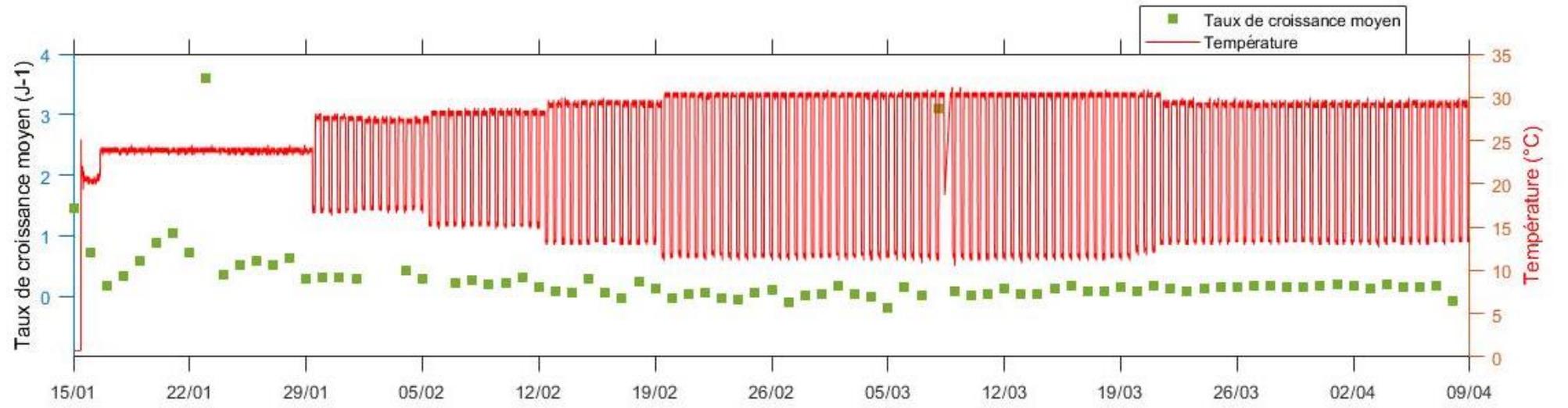
Les variations d'oxygène dissous dans les sélectiostats pourraient en théorie être causées par les facteurs suivants :

- Aux échanges à l'interface eau-air et à la diffusion de l'oxygène dissous au sein de la masse d'eau.
- Aux lois physiques qui régissent la solubilisation du dioxygène dans l'eau. En effet, cette solubilisation est fonction de la température, de la salinité, de la pression atmosphérique et de la pression de vapeur saturante.
- Aux phénomènes biologiques : photosynthèse, respiration.

En pratique, de nombreux paramètres sont constants et les variations d'oxygène dissous sont synchrones et inversées avec celles de la température. Les teneurs maximales enregistrées augmentent au fur et à mesure des stress. Elles sont liées :

- A l'effet direct d'une diminution de la température moyenne, qui provoque une augmentation de la valeur moyenne de saturation du dioxygène. Pour une salinité de 35g/L, la solubilité de l'oxygène est de 316,2  $\mu\text{mol/L}$  à 5°C, 282  $\mu\text{mol/L}$  à 10°C et 230,9  $\mu\text{mol/L}$  à 20°C.
- Aux mécanismes de photosynthèse et de respiration affectés par les variations de de température (la respiration est réduite à plus faible température).

Le bullage d'air dans les sélectiostat empêche à la fois une sous-oxygénation, mais aussi une suroxygénation du milieu, en forçant le dégazage. Pour vérifier cette hypothèse, le bullage a été coupé pendant 48h entre le 20 mars et le 22 mars, et le capteur enregistre immédiatement une accumulation d'oxygène dissous, qui disparaît dès que le bullage est remis.



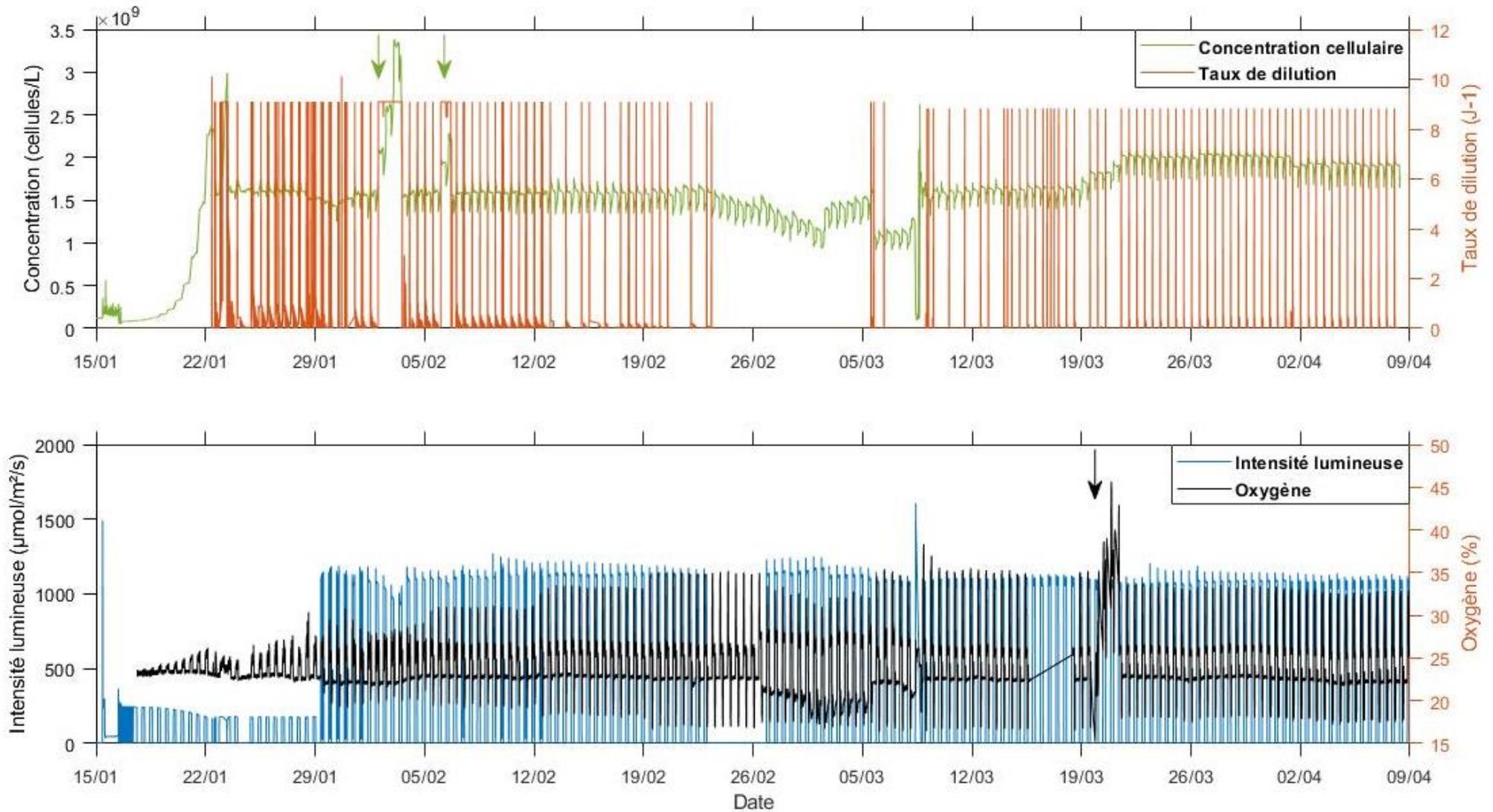


Figure 36: Suivi des paramètres dans le sélectiostat de la culture TLS13-1. Flèche verte, batch involontaire dû à l'absence de milieu de renouvellement (week-end). Flèche noire, arrêt du système de bullage pendant 48h afin d'observer le comportement du dioxygène dissous dans le sélectiostat. Le taux de croissance du 23 janvier est biaisé par le forçage de la pompe afin de diluer le sélectiostat pour le stabiliser à 1,5 millions de cellules/mL.

## 3.2. Caractérisation dans des conditions de culture standardisées

### 3.2.1. Paramètres physiologiques : taux de croissance, taille cellulaire, et rapport N/C

Les taux de croissance obtenus en multicultivateurs oscillent entre 0,5 et 1,2 J<sup>-1</sup> (Fig. 37), ce qui est cohérent avec les expériences de Bonnefond et al. (2017) sur la même espèce. Par contre, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les 2 souches, ni de tendance au cours de l'expérience. Les taux de croissance ne semblent pas évoluer significativement, contrairement aux résultats de Bonnefond et al. (2017) et Fu et al. (2012), qui avaient observé une augmentation du taux de croissance au fil de leurs expériences.

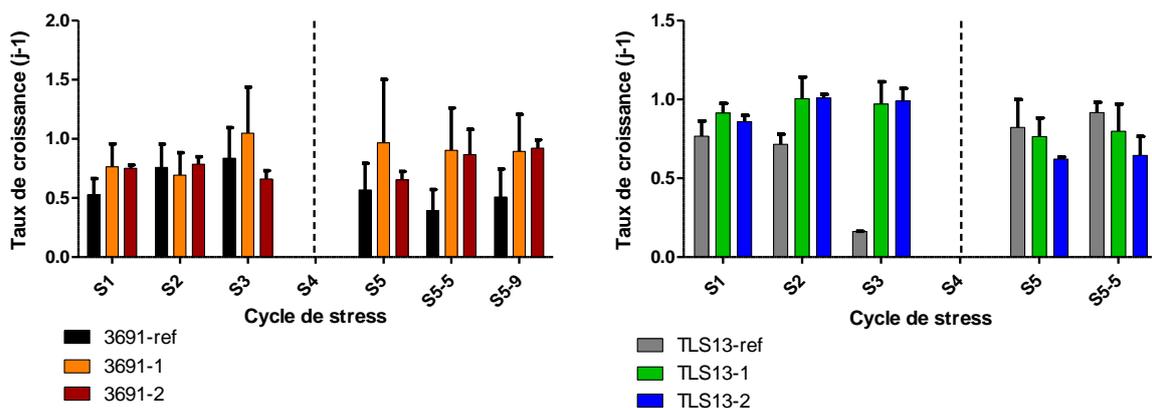


Figure 37: Taux de croissance. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats. Le taux de croissance du témoin de la souche TLS13 au cycle S3 est trop faible comparativement aux mesures de concentrations cellulaires à la récolte, qui sont de 1,4 et 1,6x10<sup>6</sup> cellules/mL. Il est probablement dû à une mauvaise mesure de l'absorbance pour ces cultures

Au moment de la récolte, les cultures sont en fin de phase exponentielle de croissance, mais pas carencées par l'azote, ce que confirme l'analyse du rapport entre azote et carbone particuliers. En effet, le rapport N/C des cultures (Fig. 38) est généralement supérieur à 0,1. Or, *T. lutea* est carencée lorsque le rapport N/C vaut 0,07-0,08, et n'est pas limitée quand il vaut 0,13-0,14 (Garnier et al., 2016). Alors que les cultures de la souche RCC3691 semblent n'avoir jamais été carencées, les cultures de la souche TLS13 semblent avoir été carencées au cours des cycles S2 et S5.

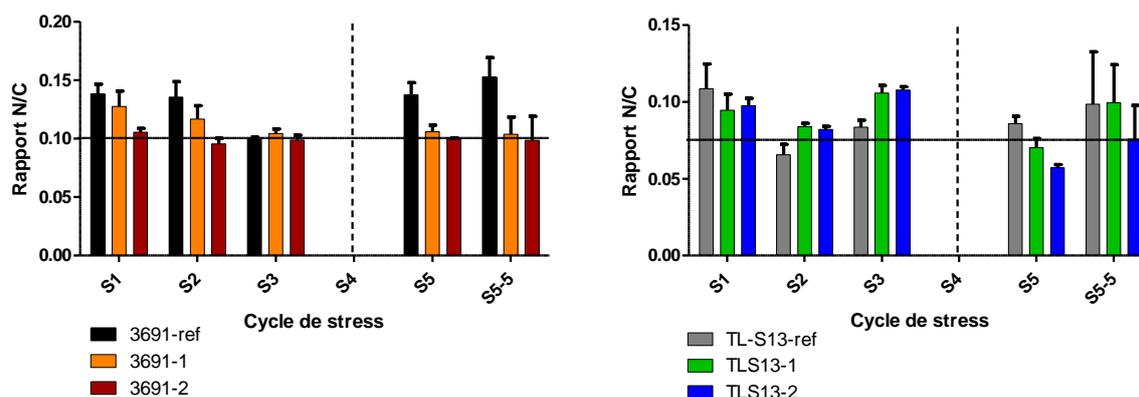


Figure 38: Rapport azote/carbone à partir des mesures réalisées en quadruplicats (références) et en 6 exemplaires pour les échantillons, en conditions standardisées dans les multicultivateurs ; il n’y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats.

Enfin, le diamètre cellulaire (tableau 2) est resté identique entre toutes les cultures et constant pendant les 3 premiers cycles de stress, mais a augmenté pour toutes les cultures pendant le cycle S5. Il est à noter qu’il continue d’augmenter au cours des cycles successifs de S5 pour la culture TLS13-2, mais pas pour les 3 autres cultures.

Tableau 11: Évolution du diamètre cellulaire en conditions standardisées dans les multicultivateurs. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs. Moy = moyenne; ET = écart-type. Pas de données pour le cycle S4.

Cycle de stress	3691-ref		3691-1		3691-2		TLS13-réf		TLS13-1		TLS13-2	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
S1	4,33	0,06	4,40	0,05	4,22	0,05	4,14	0,11	4,09	0,05	4,07	0,02
S2	4,15	0,05	4,11	0,04	3,92	0,08	4,62	0,05	4,13	0,03	4,09	0,03
S3	4,03	0,04	4,03	0,09	3,97	0,02	4,01	0,02	3,71	0,03	3,67	0,01
S4												
S5	4,68	0,02	4,43	0,06	4,53	0,01	4,43	0,02	4,63	0,05	5,01	0,03
S5-5	4,42	0,03	4,29	0,02	4,46	0,03	4,44	0,01	4,45	0,06	5,97	0,02

### 3.2.2. Lipides totaux et classes lipidiques

Les lipides cellulaires totaux montrent des différences importantes entre RCC 3691 et TLS13 ainsi qu’une différence au sein des deux cultures de la souche TLS13 (Fig. 39). Yilancioglu et al. (2014), Kang et al. (2014) et Pancha et al. (2015) avaient observé une augmentation de la teneur en lipides totaux chez *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris* ou *Scenedesmus* sp au cours d’expériences d’acclimatation pendant lesquelles les cellules étaient soumises à un stress oxydatif.

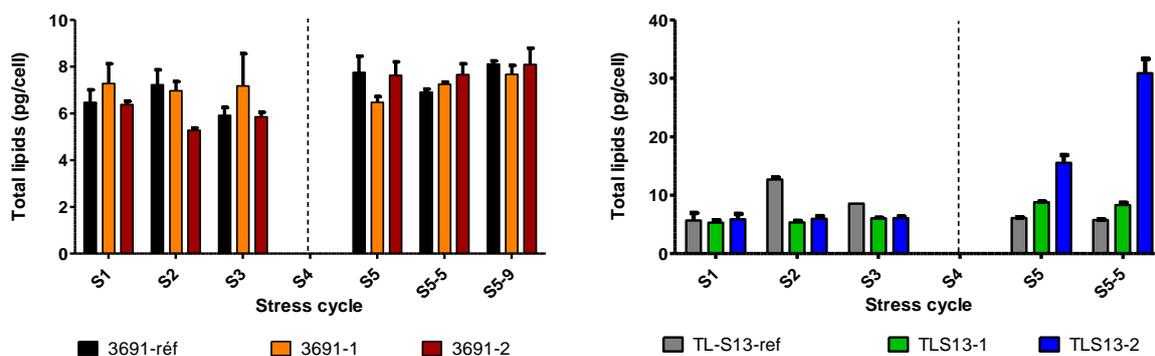


Figure 39: Lipides totaux exprimés en pg/cell. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs ; il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats.

Les teneurs en lipides totaux atteintes en conditions standardisées sont restées constantes et égales à celles du témoin tout au long de l'expérience pour les deux cultures de la souche RCC3691. A *contrario*, les deux cultures de la souche TLS13 montrent une augmentation de leurs teneurs en lipides totaux respectives pendant le cycle de stress S5, mais d'intensité différente. Elle augmente en effet de 80% pour la culture TLS13-1 (passant de  $5,29 \pm 0,42$  pg/cell. à  $8,33 \pm 0,35$  pg/cell.) et de 500% pour la culture TLS13-2, où elle passe de  $5,88 \pm 0,89$  à  $30,89 \pm 2,47$  pg/cell. Alors que les teneurs mesurées sont en accord avec les données de la littérature pour les 3 premières cultures (Da Costa et al., 2016), celles mesurées en fin d'expérience pour la culture TLS13-2 sont trois fois plus importantes.

L'augmentation de la taille des cellules corrobore ces observations : les augmentations du diamètre cellulaire et de la teneur en lipides totaux sont synchrones pour la culture TLS13-2. Or, lors du stress S5-5, le diamètre des cellules de la culture TLS13-2 est supérieur à celui de la culture TLS13-1, de 34%. Cela signifie que la surface des membranes plasmiques est plus grande de 80%. Celle-ci étant composée principalement de phospholipides, les cellules TLS13-2 contiennent davantage de phospholipides que les cellules TLS13-1. Il est donc cohérent de constater une différence de teneurs en lipides totaux. Il est à noter que le facteur d'augmentation de la quantité de phospholipides strictement due au grossissement des cellules de TLS13-2 est de 2,4, mais que celui qui est calculé à partir des teneurs en phospholipides est légèrement supérieur, puisqu'il est de 2,8. Les cellules de TLS13-2 contiennent donc davantage de phospholipides que la quantité strictement induite par leur grossissement.

La souche RCC3691 et la population TLS13, toutes deux polyclonales, présentent une hétérogénéité génomique. En conséquence, la diminution brutale de la biomasse dans chacun des 4 sélectiostats au cycle S4 a provoqué une sélection importante, puisque la majeure partie de la biomasse de chaque culture a été perdue. Cet évènement a probablement permis l'émergence d'une sous-population plus riche en lipides dans la souche TLS13, comme le suggèrent les accroissements en lipides totaux visibles dans les 2 cultures à partir du cycle S5. Par contre, cette sélection ne s'est pas traduite par une augmentation de la teneur en lipides dans la souche RCC3691, malgré deux effondrements consécutifs en 2 semaines. Cela suggère que l'avantage adaptatif résultant de l'augmentation des lipides observé dans la souche TLS13, ne s'est pas produit pour la souche RCC 3691. Par contre, l'apparition d'un biofilm a été constatée dans les deux cultures de cette souche, à partir du cycle S4. La formation d'un biofilm est liée à l'adhésion des cellules à une surface, et est accompagnée par la

production d'exo-polymères qui forment une matrice dans laquelle les cellules sont engluées (Shen et al., 2014 ; Roeselers et al., 2008 ; Becker, 1996, Tsuneda et al., 2003). Les exo-polymères synthétisés par les cellules peuvent être de différentes natures, mais les études de Tsuneda et al. (2003) sur 27 espèces bactériennes ou Badel et al. (2008) ont montré que les exo-polymères majoritaires (75 à 90% selon les espèces) étaient toujours des protéines et des polysaccharides. Les études réalisées sur des microalgues et des cyanobactéries montrent que *Porphyridium sp.* (Badel et al., 2011), *Arthrospira platensis* (Trabelsi et al., 2009), *Rhodella violacea* (Badel et al., 2011), *Chlorella vulgaris* (Ogawa et al., 2001), *Dixonella grisea* (Arad & Levy-Ontman, 2010), *Amphora coffaeiformis* (Becker, 1995), *Cyanospira capsulata* (Garozzo et al., 1998) ou *Botryococcus braunii* (Fernandes et al., 1991) produisent toutes des exopolysaccharides. La synthèse réalisée par Schnurr & Allen (2015) sur les biofilms de microalgues arrive aux mêmes conclusions. Badel et al. (2011) ont montré que les exopolysaccharides étaient nettement majoritaires dans les exo-polymères sécrétés par *Arthrospira platensis*, *Rhodella violacea* et *Porphyridium prupureum*. Bernaets et al. (2018) et Gaignard et al. (2019) ont observé une production d'exo-polysaccharides par *Tisochrysis lutea*. Il est donc possible que le métabolisme des glucides ait été davantage impacté dans la souche RCC 3691. En tout cas, la souche sauvage et la population de laboratoire de *T. lutea* ont eu des réponses métaboliques très différentes bien que soumises au même stress.

La différence entre les réponses des deux cultures de la souche TLS13 soulève une question intéressante dans le cadre des expériences d'évolution dirigée. En effet, on peut se demander à quoi est due cette différence, et en particulier celle observée sur les phénotypes lipidiques obtenus en fin d'expérience, alors que les deux sélectiostats ont été inoculés avec la même population et soumis aux mêmes stress. Ce résultat met en lumière la fragilité de la notion de « réplicats biologiques » dans une expérience d'évolution, comme l'a souligné R. Lenksy à l'issue de ses expériences sur *E. coli* (Zimmer, 2011). En effet, l'apparition et la propagation des mutations au sein des populations est le fruit du hasard, même dans des expériences contrôlées. Dans notre étude, il est probable que les deux cultures (TLS13-1 et TLS13-2) n'ont pas subi et accumulé exactement les mêmes mutations, et que celles qui sont apparues dans TLS13-2 ont davantage impacté le métabolisme des lipides. Des analyses génomiques pourraient apporter des précisions sur cette hypothèse.

Les données de lipides totaux de la population TLS13 sont étonnantes quand elles sont comparées à celles de la première expérience d'évolution en laboratoire (chapitre 4). En effet, c'est la même population qui a été de nouveau soumise à un stress, ou conservée dans les conditions non stressantes de la souchothèque dans le cas du témoin. Il s'est écoulé 6 mois entre les 2 expériences d'évolution, pendant lesquelles la population a été conservée à la souchothèque. Pourtant, lorsque l'on regarde la teneur en lipides totaux du témoin (non stressé), elle est moitié moins importante (environ 6 pg/cellule) que la teneur mesurée à la fin de la première expérience d'évolution en laboratoire (environ 12 pg/cellule), sauf pour le cycle de stress S2. Cet écart pourrait être dû aux modifications du protocole de culture en conditions standardisées : passage d'un batch de 7 jours à 2 batchs successifs de 3 et 4 jours, ce qui influe sur le stade physiologique et potentiellement la teneur lipidique des cellules. Au cycle de stress S2, où la teneur lipidique du témoin (TLS13-ref) est nettement supérieure à celle de tous les autres cycles, la culture est devenue carencée en azote (fig. 38), contrairement à toutes les autres mesures. Il semble donc que l'écart constaté entre les teneurs en lipides totaux des deux expériences soit principalement dû à la différence d'état physiologique de la population TLS13.

Le fractionnement des lipides en classes (lipides neutres, glycolipides, phospholipides, fig. 40) montre qu'il n'y a pas de variation pour la souche RCC 3691 (Test de Welch ; p-values de 0,88 et 0,24 pour les lipides neutres ; 0,98 et 0,40 pour les glycolipides ; 0,80 et 0,30 pour les phospholipides). Les lipides neutres restent à  $43\pm 5.6\%$  pour le témoin,  $44\pm 4.5\%$  pour la culture 3691-1 et  $48\pm 8.1$  pour la culture 3691-2 ; les glycolipides sont à  $24\pm 3.9\%$  (témoin),  $24\pm 3.1\%$  (3691-1) et  $22\pm 3.4\%$  (3691-2) ; les phospholipides sont à  $33\pm 5\%$  (témoin),  $33\pm 4.5\%$  (3691-1) et  $30\pm 6.7\%$  (3691-2). Le stress n'a donc pas induit de réorganisation des membranes et donc des classes lipidiques dans cette souche.

L'augmentation attendue de la proportion de phospholipides en fin d'expérience pour la souche TLS13, en lien avec le grossissement des cellules, n'a pas été observée (Fig. 40). Au contraire, la proportion de phospholipides tend à diminuer alors que celles des lipides neutres tend à augmenter. Ces variations ne sont toutefois pas significatives. En effet, le test de Welch renvoie des p-value de 0,93 et 0,30 pour les lipides neutres ; de 0,34 et 0,87 pour les phospholipides.

Le test de Welch pour les glycolipides renvoie des p-values de 0,07 pour TLS13-1 et 0,02 pour TLS13-2. La proportion en glycolipides de TLS13-2 est donc significativement inférieure à celle du témoin, par contre, elle reste stable au cours de l'expérience. C'est surprenant : si la proportion de glycolipides reste stable, à environ 20%, alors que la teneur en lipides totaux augmente de 6 à 30 pg/cellule, cela semble signifier que la teneur en glycolipides augmente, en l'occurrence de 1,3 à 5,5 pg/cell. Comme ces derniers composent les membranes thylakoïdales, cela signifie qu'il y a davantage de membranes chloroplastiques dans les cellules en fin d'expérience. Deux hypothèses (non exclusives) peuvent expliquer l'augmentation de la teneur en glycolipides des cellules : soit elles contiennent davantage de chloroplastes, soit ces derniers sont plus gros. Les microalgues contiennent généralement un ou deux chloroplastes, de taille et de forme très variées (Kim et al., 2009 ; AlgaeBASE ; Burgess, 1985). Ils ne sont pas synthétisés ni formés par la cellule, mais obligatoirement hérités de la cellule-mère et se multiplient par division binaire, suivant un processus proche de la division chez les bactéries (Glynn et al., 2007 ; Alberts et al., 2002 ; Burgess, 1985). Il semblerait que chez les microalgues, la division chloroplastique et la division cellulaire soient relativement synchronisées (Glynn et al., 2009). Cela serait lié au petit nombre (1 ou 2) de chloroplastes présents chez de nombreuses microalgues. En effet, cela permet d'éviter la génération de cellules-filles dépourvues de chloroplastes, vouées à mourir puisqu'elles seraient incapables de créer des chloroplastes *ex nihilo*. La qualité de la lumière semble aussi être un facteur important dans la division chloroplastique, en tout cas chez les plantes supérieures (Burgess, 1985 ; Hashimoto & Possingham, 1989). La division des chloroplastes est donc régulée, cela suggérerait plutôt que l'accroissement de la teneur en glycolipides est dû à une augmentation de la taille des chloroplastes et/ou de la surface du granum (empilement des membranes thylakoïdales), concomitante avec l'accroissement de la taille des cellules chez la souche TLS13. Une étude par microscopie confocale ou par microscopie électronique à transmission permettrait de confirmer la taille et la conformation des chloroplastes et des granum thylakoïdaux.

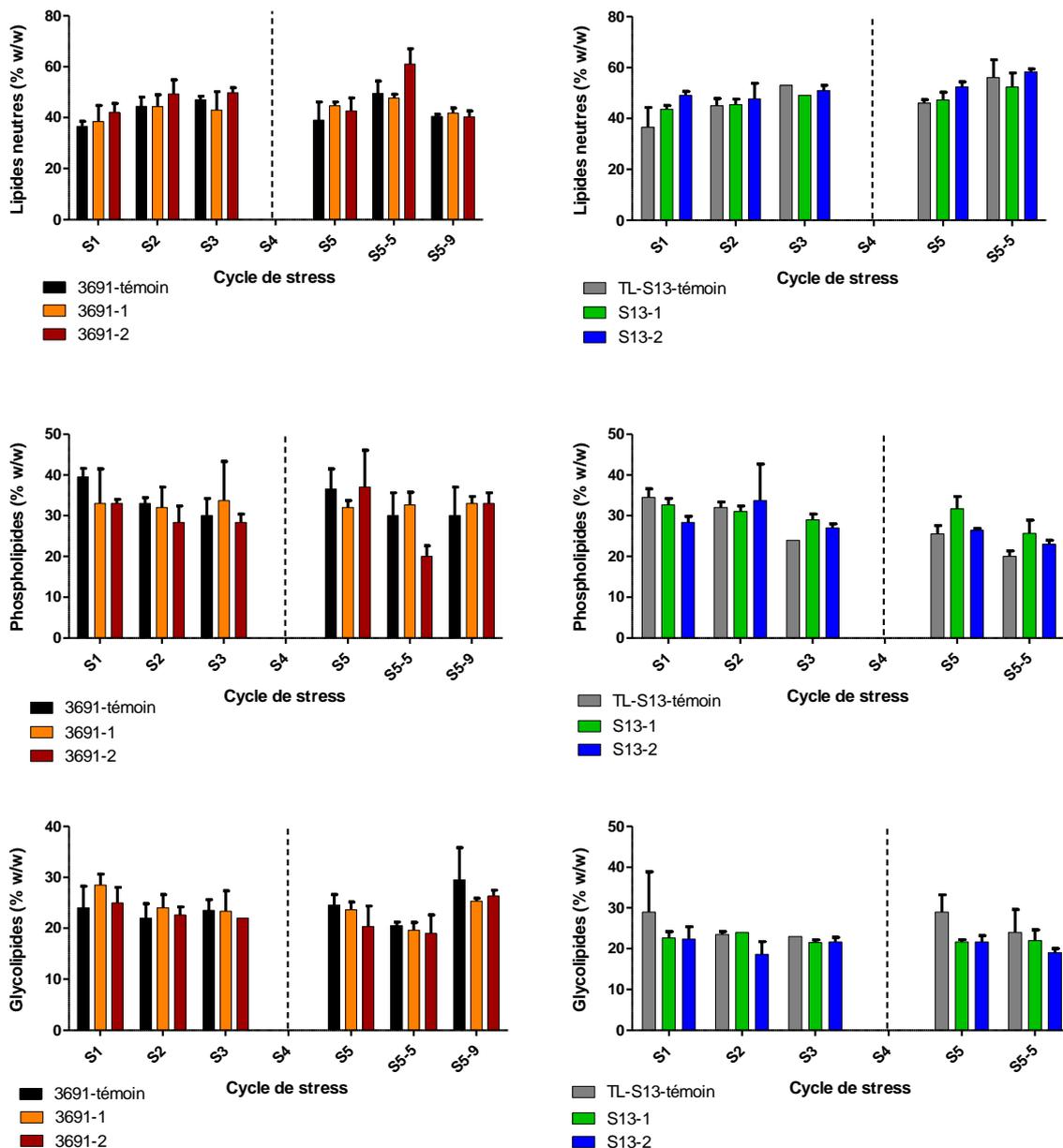


Figure 40: Classes lipidiques. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs ; il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats.

### 3.2.3. Profils d'acides gras dans les lipides polaires

Les phospholipides et les glycolipides ont été analysés séparément pour toutes les cultures.

Les profils d'acides gras des deux cultures de la souche RCC 3691 ne présentent aucune évolution significative, que ce soit dans les phospholipides ou les glycolipides (Fig. 41). Ces cultures n'avaient également pas montré de modifications dans leurs teneurs en lipides totaux (fig. 39) ni dans les proportions des classes lipidiques (fig. 40). Cela suggère que cette souche a une plasticité métabolique importante, et notamment un métabolisme lipidique très résilient. En effet, les données suggèrent que les cultures 3691-1 et 3691-2 ont pu se contenter d'une acclimatation métabolique

dans les sélectiostats, pour revenir à un profil lipidique « standard » dès que les conditions de cultures n'étaient plus stressantes (donc une fois transférées dans les multicultivateurs). Il aurait été intéressant d'analyser le profil lipidique d'échantillons prélevés directement dans les sélectiostats, afin d'étayer cette hypothèse. Selon une autre hypothèse, ce ne serait pas le métabolisme lipidique qui serait impacté, mais plutôt celui des glucides. Cela serait lié à la production d'un biofilm (Limoli et al., 2015 ; Pippo et al., 2013). Les données montrent qu'il n'y a pas d'accumulation de carbone dans les cellules à la fin de l'expérience, mais le carbone est généralement excrété si les cellules produisent des exo-polysaccharides.

La figure 42 montre un accroissement important de la teneur en lipides totaux dans la souche TLS13, particulièrement dans la culture TLS13-2. Les principaux acides gras (>2% acides gras totaux, TFA) sont les mêmes dans les glycolipides et les phospholipides. Ils sont constitués de deux acides gras saturés (AGS, les 14:0 et 16:0), de deux acides gras mono-insaturés (AGMI, les 16:1 n-7 et 18:1 n-9) et de 6 acides gras polyinsaturés (AGPI, 18:2 n-6, 18:3 n3, 18:4 n-3, 18:5 n-3, 22:5 n-6 and 22:6 n-3).

Il n'y a pas de modifications du profil des acides gras majoritaires dans les phospholipides au cours de l'expérience. Concernant les glycolipides, le profil reste à peu près inchangé, sauf pour le 18:1 n-9 qui augmente, et le 18:5 n-3 qui diminue dans chaque culture, ce qui est inattendu. En effet, de nombreuses études chez les plantes et les microalgues ont montré que les glycolipides permettent la régulation de la photosynthèse (Kobayashi et al., 2007 ; Aoki et al., 2004 ; Awai et al., 2007 ; Ivanov et al., 2006). Au cours de nos expériences, les importantes variations diurnes d'intensité lumineuse étaient sensées provoquer des modifications du métabolisme photosynthétique, et par voie de conséquence des modifications dans la composition des glycolipides.

L'absence de modifications significatives sur les principaux acides gras des quatre cultures, même après les événements de sélection du cycle de stress S4, met en lumière la grande plasticité métabolique des deux souches et leur stabilité membranaire. Il ne semble pas y avoir eu d'adaptation des membranes dans cette expérience, malgré le stress oxydatif imposé dans le sélectiostat. En effet, lors d'expériences d'acclimatation, les ROS responsables du stress oxydatif impactent les acides gras polyinsaturés, en oxydant les doubles liaisons carbone-carbone. Les lipides polaires des membranes cellulaires sont particulièrement sensibles à la peroxydation (Almeida et al., 2017) à cause de leur teneur importante en AGPI comparativement aux triglycérides. Toutefois, Sun et al. (2018) et Ren et al. (2017) ont montré qu'un stress oxydatif modéré est associé à une meilleure accumulation d'AGPI-LC plus particulièrement de DHA au sein des cellules de *Cryptocodinium cohnii* et *Schizochytrium* sp. Lors de cette expérience d'évolution en laboratoire sous stress oxydatif, il n'y a pas eu d'accumulation d'AGPI dans les lipides polaires, mais il n'y a pas eu non plus de pertes mesurées. Cela suggère que le stress a permis *a minima* de sélectionner des populations plus résistantes au stress oxydatif, ce qui protège les lipides membranaires, peut-être grâce à une meilleure capacité de détoxification des ROS.

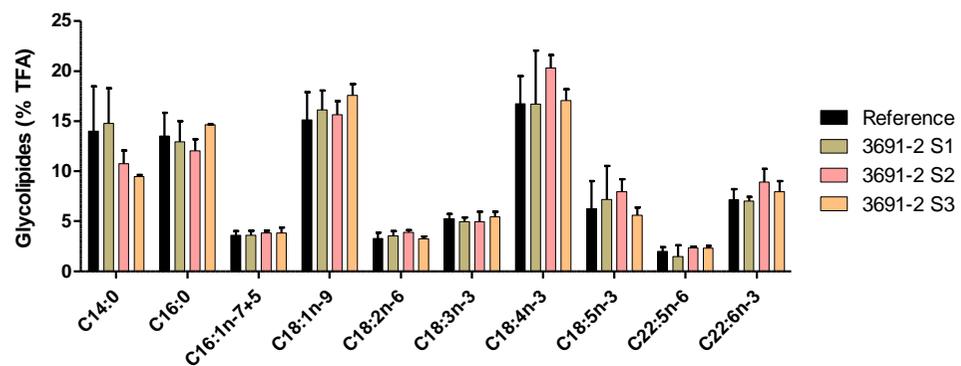
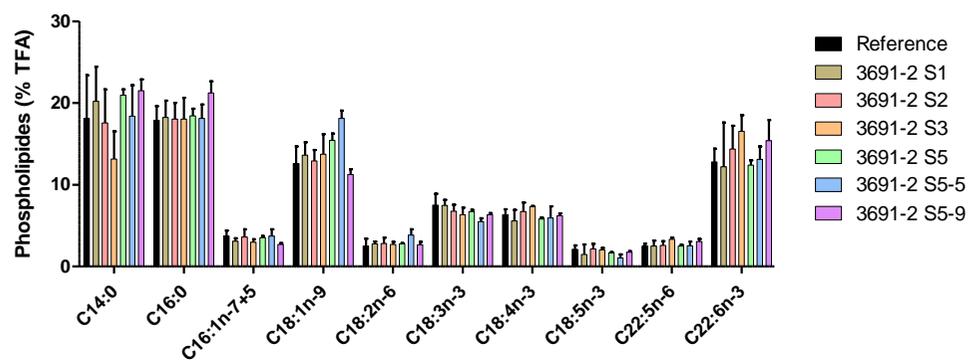
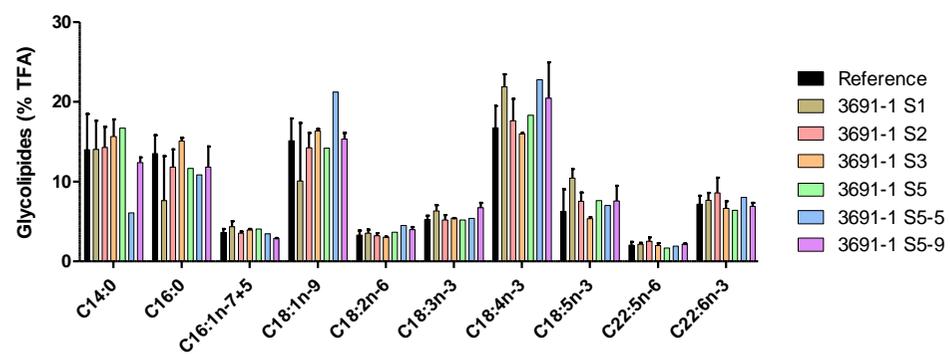
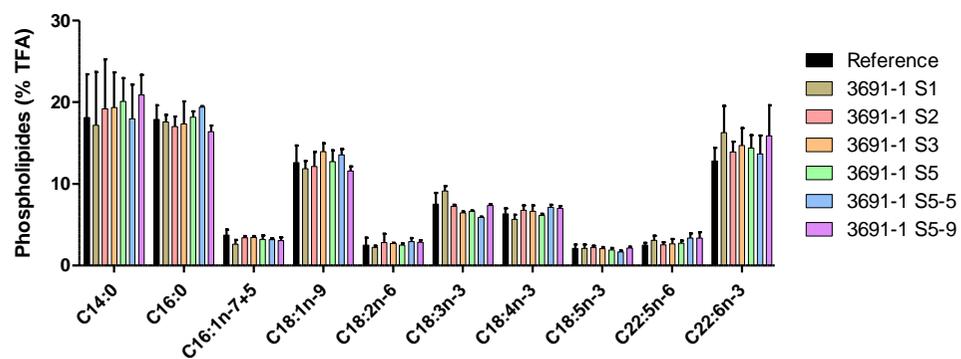


Figure 41: principaux acides gras des cultures 3691-1 et 3691-2

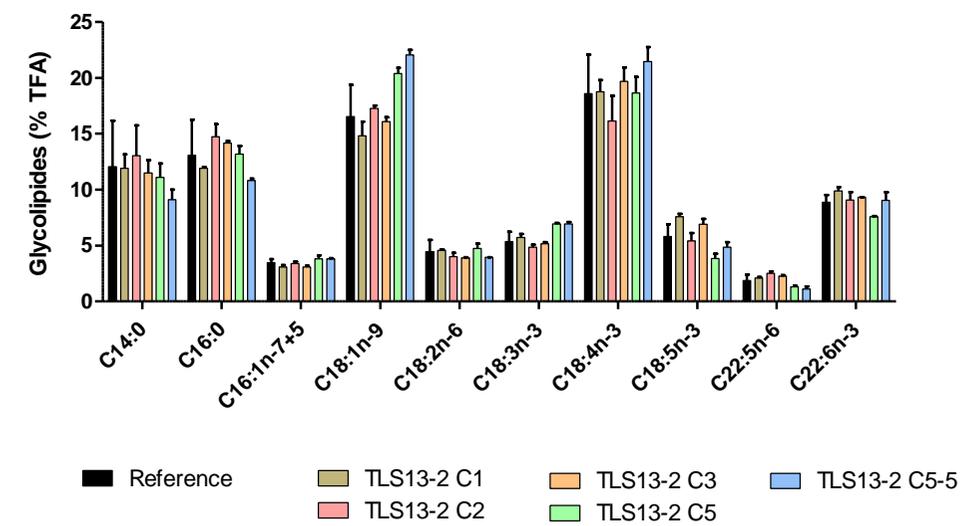
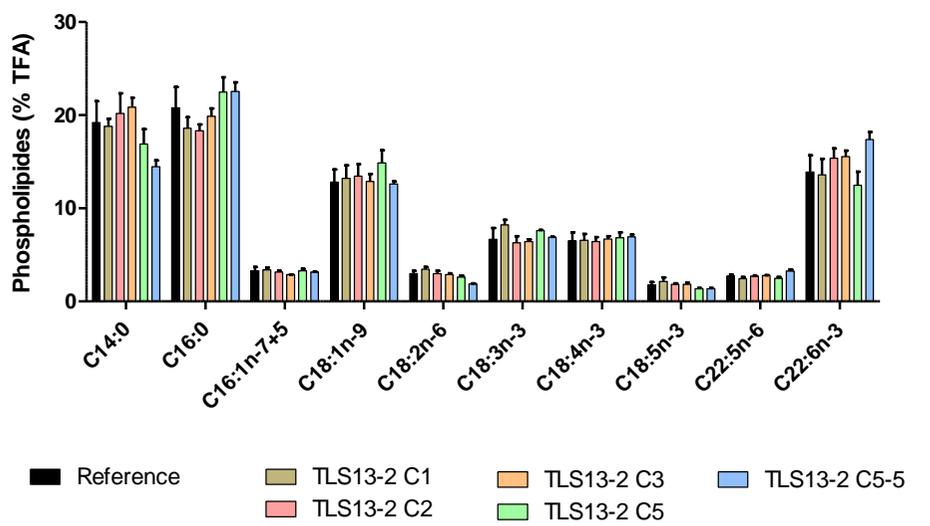
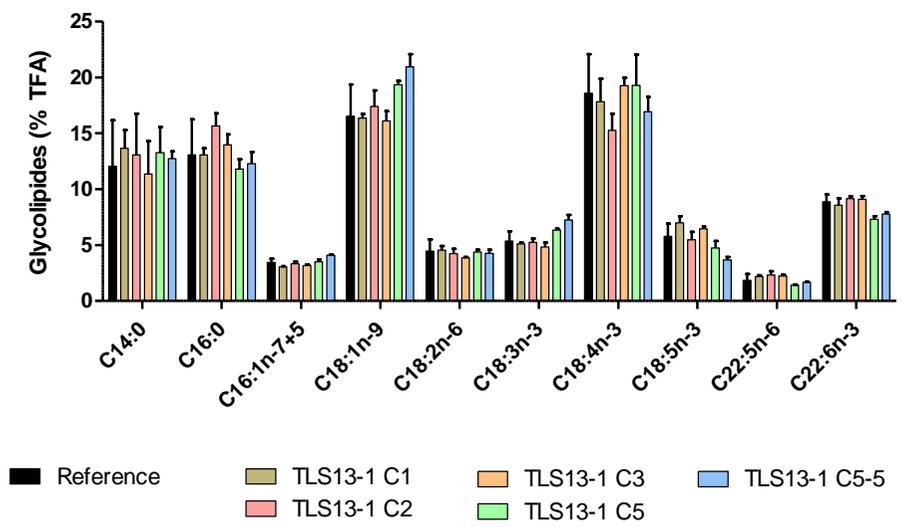
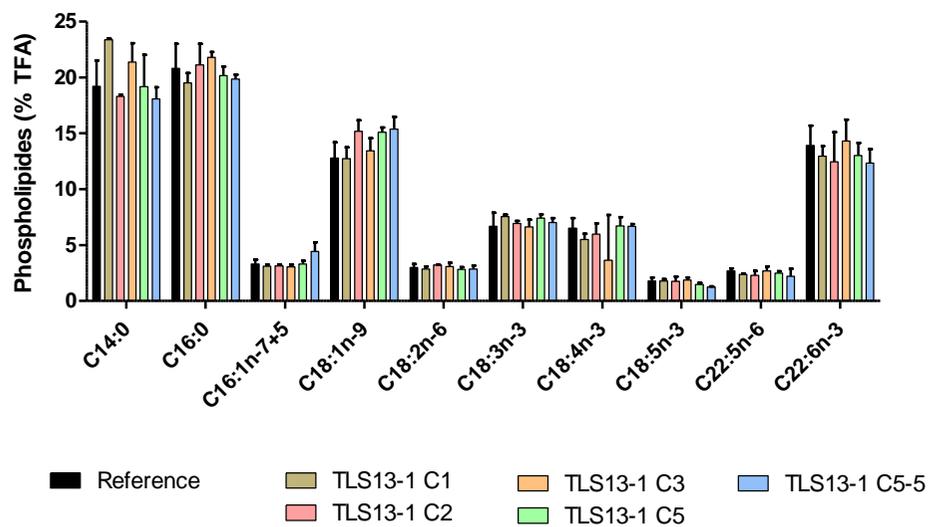


Figure 42: Principaux acides gras dans les deux cultures de la souche TLS13

## 4. Conclusion

La souche sauvage RCC 3691 s'est révélée moins robuste que la population TLS13 face aux stress appliqués. En effet, les deux sélectiostats de la souche sauvage ont subi des pertes majeures de biomasse au cours du cycle de stress S4. La première chute est peut-être due à une succession trop rapide des cycles. Cela aurait sélectionné les cellules capables de supporter le stress, mais sans leur laisser le temps de s'y adapter véritablement et de retrouver un métabolisme pleinement fonctionnel. Au vu de leurs taux de croissance très réduits, on peut également supposer que les cellules résistantes n'ont pas eu le temps de se multiplier et de se propager dans la culture. Dans tous les cas, la première chute de biomasse a été un événement de sélection important dans les populations polyclonales en cours d'évolution, les sélectiostats étant repartis avec moins de 20% de leur biomasse en appliquant une température constante et non stressante. Par contre, la deuxième chute de biomasse, dans les 24h qui ont suivi la reprise du stress S4 (cycle S4 bis), suggère que l'on avait en fait atteint les limites évolutives de la souche RCC 3691 sous le couple de stress lumière-température. Elle n'est pas capable de supporter l'intensité de stress du cycle S4. Même une fois l'intensité du stress réduite (cycle de stress S5), le taux de croissance net reste très faible et devient régulièrement négatif. *A contrario*, la biomasse de la population TLS13 n'a pas subi de chute brutale pendant le cycle S4. Le taux de croissance est resté nul, puis une diminution progressive de la biomasse a été constatée avant qu'elle ne se stabilise à nouveau. L'intensité du cycle de stress S4 n'est donc pas létale pour toutes les cellules de la population TLS13. Par contre, après un mois de culture dans les conditions du cycle S4, il n'y a pas de reprise notable de la croissance des cultures, ce qui a conduit à diminuer l'intensité du stress. Effectivement, le taux de croissance des cultures s'améliore dès le passage au cycle de stress S5.

La répétition d'une expérience d'évolution en laboratoire sur la population de TLS13, qui avait déjà été soumise à une évolution par le stress thermique, a été concluante. En effet, dans le cas de la culture TLS13-2, la teneur en lipides totaux est passée de 6 pg/cell au début de l'expérience, à plus de 30 pg/cell à la fin. Le gain est moins important pour la culture TLS13-1, de 5,3 à 8,5 pg/cell. La gamme de stress testée n'a pas permis de provoquer des modifications sur la souche RCC 3691 (teneurs en lipides totaux et profils en acides gras). Il est possible que les températures extrêmes utilisées au cours de cette expérience (12°C et 30°C) n'aient pas été suffisantes pour provoquer une adaptation génomique des cultures, qui se seraient contentées d'une acclimatation métabolique. En effet, ces 2 températures restent dans la niche thermique des souches initiales de *Tisochrysis lutea*. C'est une différence majeure avec la première expérience d'évolution en laboratoire (Chapitre 4) et le protocole de Bonnefond et al. (2017).

Cette expérience d'évolution en laboratoire montre une différence de réponse entre la souche RCC 3691 et la population TLS13 de *T. lutea*, et au sein d'une même population. En effet, la souche RCC3691 ne présente aucune modification de sa teneur ou de sa composition en lipides polaires alors que la population TLS13 voit sa teneur en lipides totaux augmenter. Ceci est peut-être lié à une adaptation au stress oxydatif. En effet, une augmentation de la teneur en lipides totaux a déjà été constatée chez certaines microalgues soumises à un stress oxydatif (Sun et al., 2018 ; Ren et al., 2018 ; Yilancioglu et al., 2014 ; Kang et al., 2014 ; Pancha et al., 2015). L'augmentation est beaucoup plus importante dans la culture TLS13-2 que dans la culture TLS13-1. La réponse à des variations simultanées de la température, de l'intensité lumineuse, et au stress oxydatif résultant, est probablement lié à la souche de microalgues. De plus, l'évolution est un processus stochastique très

dépendant de différents facteurs, et en particulier des mutations qui peuvent se produire. Il est notamment reconnu que des réplicats ont souvent des comportements très différents, aboutissant à des phénotypes distincts, en particulier dans des environnements variables (Rego-Costa, 2018).

## Liste des tableaux et figures

Figure 35: taux de croissance dans les 4 sélectiostats. Flèches, perte de biomasse dans les sélectiostats. Carrés, phases de batch pour les sélectiostats 3691-1 et 3691-2. Ovale : taux de croissance biaisés par le forçage manuel de la pompe afin de diluer les sélectiostats. ....	93
Figure 36: Suivi des paramètres dans le sélectiostat de la culture TLS13-1. Flèche verte, batch involontaire dû à l'absence de milieu de renouvellement (week-end). Flèche noire, arrêt du système de bullage pendant 48h afin d'observer le comportement du dioxygène dissous dans le sélectiostat. Le taux de croissance du 23 janvier est biaisé par le forçage de la pompe afin de diluer le sélectiostat pour le stabiliser à 1,5 millions de cellules/mL.....	96
Figure 37: Taux de croissance. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats. Le taux de croissance du témoin de la souche TLS13 au cycle S3 est trop faible comparativement aux mesures de concentrations cellulaires à la récolte, qui sont de $1,4$ et $1,6 \times 10^6$ cellules/mL. Il est probablement dû à une mauvaise mesure de l'absorbance pour ces cultures.....	97
Figure 38: Rapport azote/carbone à partir des mesures réalisées en quadruplicats (références) et en 6 exemplaires pour les échantillons, en conditions standardisées dans les multicultivateurs ; il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats.....	98
Figure 39: Lipides totaux exprimés en pg/cell. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs ; il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats. ....	99
Figure 40: Classes lipidiques. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs ; il n'y a pas de données pour le cycle S4, la ligne pointillée représente les crashes des sélectiostats. ....	102
Figure 41: principaux acides gras des cultures 3691-1 et 3691-2 .....	104
Figure 42: Principaux acides gras dans les deux cultures de la souche TLS13 .....	105
Tableau 10: cycles de stress thermique et lumineux pendant l'expérience, température ( $T_m$ ) et lumière ( $I_m$ ) moyennes. * perte de la majorité de la biomasse des sélectiostats. ....	92
Tableau 11: Évolution du diamètre cellulaire en conditions standardisées dans les multicultivateurs. Mesures réalisées en triplicats, en conditions standardisées dans les multicultivateurs. Moy = moyenne; ET = écart-type. Pas de données pour le cycle S4.....	98



## Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

L'évolution dirigée est un outil ancien d'amélioration des organismes utilisés par l'homme. Il est en effet utilisé depuis l'apparition de l'agriculture et de l'élevage, où il a permis de produire les espèces domestiques d'aujourd'hui à partir de leurs ancêtres sauvages. Deux volets ont coexistés dans le processus de domestication: la sélection variétale et le brassage génétique forcé par croisement d'individus choisis. La sélection variétale consiste à choisir certains individus au sein d'une population selon des critères précis (souvent phénotypiques) mesurables ou observables. Par exemple, il peut s'agir de la vitesse de croissance, la taille, ou le nombre de grains/de fruits chez les plantes supérieures ; la force, la vitesse, la quantité de lait produite ou la masse musculaire (quantité de viande) chez les animaux d'élevage. Il peut aussi s'agir de traits de caractère particuliers dans le cas des animaux. La docilité ou la délicatesse envers les enfants sont particulièrement prisés chez les animaux de compagnie par exemple. Les individus les plus intéressants en regard des critères d'intérêt sont sélectionnés. Le brassage génétique forcé consiste à faire reproduire ces individus entre eux. Ainsi, on espère cumuler chez les descendants les avantages phénotypiques ou les traits de caractère observés chez leurs parents.

Chez les microalgues, c'est beaucoup plus compliqué. En effet, les caractéristiques phénotypiques sont beaucoup plus difficiles à observer, et la reproduction sexuée très mal documentée. Comme les microalgues sont des organismes unicellulaires, il faut utiliser des outils couteux et sophistiqués (cytomètre en flux avec trieur, microscope à fluorescence ou électronique, etc.) et des protocoles qui peuvent être chronophages (immobilisation des cellules, bio-marqueurs, analyses biochimiques, etc.) pour évaluer le phénotype d'intérêt et éventuellement le séparer des autres. De plus, les microalgues ont une plasticité métabolique très importante, qui provoque des variations phénotypiques (composition, taille, taux de croissance, etc.) sur des échelles de temps de quelques dizaines de minutes à quelques heures (Davis et al., 2013). Enfin, lorsque l'on arrive à sélectionner et isoler des cellules au phénotype intéressant, le manque d'informations sur la reproduction sexuée des microalgues rend souvent impossible la mise en place d'un brassage génétique forcé. Pourtant, les microalgues restent compatibles et même très intéressantes avec les protocoles d'évolution dirigée en laboratoire, parce que ce sont des organismes unicellulaires. Cela veut dire que toute mutation non létale qui survient dans une cellule sera forcément transmise à sa descendance. Il est donc plus facile de transmettre et d'accumuler les mutations intéressantes chez les microalgues que chez les plantes terrestres, où seules les mutations apparaissant dans les gamètes peuvent être héritées.

### 1. Le stress thermique pour impacter les membranes phospholipidiques

Le choix de la température pour impacter les lipides polaires s'est basé sur les nombreuses études publiées depuis les années 90. Les mécanismes d'acclimatation à différentes températures (Renaud et al., 1995 ; Renaud et al., 2002) ou la résultante de processus d'adaptation (Bonfond et al., 2017), montrent une modification de la composition des membranes chez les microalgues quand la température de croissance varie. Lorsque ce facteur a été utilisé comme élément de stress dans l'expérience d'évolution, une accumulation de lipides au sein des cellules de *T. lutea* a été observée : la teneur en lipides totaux a été multipliée par deux entre le début et la fin de l'expérience. Comme le taux de croissance n'est pas impacté, cela se traduit par un doublement de la productivité lipidique des cellules. De plus, toutes les classes lipidiques sont impactées par cette augmentation, et c'est très intéressant pour une utilisation potentielle des microalgues en alimentation humaine ou animale. En

effet, les membranes sont plus riches en acides gras polyinsaturés que les lipides de réserve, et les AGPI sont des acides gras dont le coût métabolique de synthèse est très important pour le règne animal (enzymes lentes ou absentes). Il est donc plus intéressant pour les organismes animaux d'obtenir les AGPI à travers leur alimentation plutôt que de les synthétiser.

Le profil en acides gras des lipides polaires n'a pas subi de modifications importantes (chapitre 4). Cela peut être lié à l'alternance entre une température haute et une température basse. En effet, les cellules résistantes pourraient avoir un métabolisme lipidique plus réactif, donc capable de modifier plus rapidement la composition des lipides membranaires, pour que la composition de la membrane soit en adéquation avec les variations de température. Ainsi, la composition « par défaut » de leurs membranes n'auraient pas besoin d'être adaptée spécifiquement aux basses ou aux hautes températures, les cellules étant capables de s'acclimater très rapidement.

L'alternance thermique avait pour but de maintenir un taux de croissance suffisant dans les sélectiostats. En effet, en laissant progressivement diminuer la température, il était possible que les cellules basculent dans un état végétatif, avec une croissance nulle (Renaud et al., 1995 ; Renaud et al., 2002). Or, sans croissance, il n'y a pas de réplication de l'ADN, donc pas de possibilité d'apparition de mutations au sein de la population. Ce n'est donc pas souhaitable dans le cadre d'une expérience d'évolution en laboratoire. En alternant entre une température haute et une température basse, Bonnefond et al. (2017) avaient réussi à maintenir des taux de croissance supérieurs à  $0,5 \text{ j}^{-1}$  dans leur expérience de sélection. Pour provoquer l'évolution de *Tisochrysis lutea* vers une souche adaptée aux basses températures, sans trop impacter négativement le taux de croissance il faut probablement garder une alternance entre basse et haute température, mais en abaissant la température moyenne quotidienne au cours de l'expérience. En effet, Combe et al. (2015) et Bonnefond (2015) ont montré que les microalgues ont tendance à s'acclimater aux conditions moyennes qu'elles subissent quotidiennement. Dans le protocole appliqué ici (chapitre 4), la température quotidienne moyenne était restée fixe à environ  $24,5^\circ\text{C}$ . Je propose de modifier ce protocole en abaissant progressivement la température haute de croissance. Ainsi, les cultures pourraient toujours disposer d'une phase de croissance à basse température et d'une phase de croissance et de récupération à plus haute température. Toutefois, comme la température haute serait de plus en plus froide, la température moyenne quotidienne serait également de plus en plus basse, et cela pourra potentiellement favoriser les cellules vers des membranes plus adaptées, « par défaut » à des températures basses, et non vers la sélection des cellules qui ont le métabolisme lipidique le plus flexible.

Les analyses génomiques ont montré qu'un certain nombre de mutations sont apparues sur le génotype de départ (42 pour la culture TL1, 17 pour la culture TL2). Ceci indique que la population a bel et bien évolué génétiquement, en plus de la sélection de certains individus présents initialement (souches CCMP 463 et RCC 1344). Cette évolution peut résulter de la mutation spontanée du génome (de l'ordre de une mutation toutes les 26 générations ou  $2 \times 10^{-10}$ /site/génération pour *C. reinhardtii* (Ness et al., 2012),  $4,77 \times 10^{-10}$ /site/génération pour *Phaeodactylum tricorutum* (Krasovec et al., 2019)), ou avoir été facilitée par le stress thermique en augmentant le taux de mutation. *T. lutea* a un génome d'environ 85 000 000 paires de bases. Pour une durée de culture de 180 jours pour l'expérience d'évolution en laboratoire sous stress thermique, le taux de mutation peut être estimé à  $2,74 \times 10^{-9}$ /site/génération pour la population TL1, et  $1,1 \times 10^{-9}$ /site/génération pour la population TL2. C'est plus élevé que le taux de mutation spontanée estimé pour *C. reinhardtii* et *P. tricorutum*. Il est

donc possible que le stress thermique ait réellement induit une augmentation du taux de mutation. Si la recherche de traits fonctionnels est très prospective à cause du manque d'annotations du génome de *Tisochrysis lutea*, certaines des mutations identifiées pourraient concerner des gènes liés à la réponse à la température (protéases).

Peut-on parler de « nouvelle souche » à la fin de l'expérience ? C'est une question qui est complexe chez les microorganismes (Neofotis et al., 2016 ; Minhas et al., 2016 ; Darienko et al., 2015). Tout d'abord, il est difficile de se baser sur des critères morphologiques, qui sont parfois à peine distinguables entre 2 espèces d'une même famille. Si l'on se base sur les données génomiques, quel critère permet de fixer le seuil de différenciation de 2 souches, surtout quand elles sont elles-mêmes polyclonales ? Pour cette première expérience d'évolution en laboratoire, les différentes souches utilisées ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Tisochrysis lutea* grâce à une analyse 18S. Pourtant, lors du séquençage et de l'alignement de chaque souche sur le génome de référence, il y en a deux qui diffèrent nettement des autres (G. Carrier, données non publiées). En effet, toutes ont un pourcentage de similitude au génome de référence supérieur à 90%, sauf les souches RCC 3692 (80,9%) et RCC 179 (76%).

**Table 4: Pourcentage d'alignement des différentes souches sur le génome de référence de *Tisochrysis lutea***

Souche de <i>Tisochrysis lutea</i>	Pourcentage d'alignement
RCC 179	76.0
RCC 1344	93.8
RCC 3691	94.1
RCC 3692	80.9
RCC 3693	95.5
RCC 3699	95.3
Argenton 1998	91.1
CCMP 463	97.5
S5-1%	97.0
NIVA 4-91	96.6
IFMG	97.0

Les cellules présentant le phénotype d'intérêt dans la population n'ont pas été isolées. Il semble donc plus adéquat, dans ce cas, de parler de population évoluée plutôt que de souche évoluée. Par contre, si les cellules sont isolées dans le futur, il sera intéressant de reconduire une analyse génomique sur l'isolat, puis en utilisant les pourcentages de différence entre les souches sauvages de *T. lutea*, d'évaluer si la dénomination de « souche » est appropriée.

## 2. La conjugaison du stress thermique et du stress lumineux

Après avoir essayé de modifier la composition des phospholipides, j'ai souhaité modifier celle des glycolipides. Comme ils entrent dans la composition des membranes thylakoïdales, il fallait identifier un stress impliquant les chloroplastes. Un stress oxydatif « externe », provoqué par l'ajout d'un composé comme le peroxyde d'hydrogène, aurait impacté l'ensemble du métabolisme cellulaire (Drabkova et al., 2007 ; Xenopoulos & Bird, 1997). Par contre, un stress oxydatif « interne », provoqué par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules elles-mêmes,

présente l'avantage d'être plus ciblé car localisé au sein des organites qui produisent naturellement des ROS. L'exposition intermittente à de très hautes intensités lumineuses, en provoquant une production de ROS par la chaîne photosynthétique (Badger et al., 2000 ; Ivanov et al., 2012 ; Roach et al., 2015 ; Roberty et al., 2014), permet d'atteindre cet objectif. En outre, la régulation de la photosynthèse s'accompagne d'une modification du nombre et de la taille des antennes collectrices, et donc de la composition des membranes thylakoïdales.

L'association de stress thermiques et lumineux était sensée agir à la fois sur les phospholipides et les glycolipides, mais cela ne semble pas avoir été le cas puisque leur composition respective en acides gras n'a pas été modifiée. Les effets de deux stress simultanés sur un organisme ne s'additionnent pas nécessairement (Roleda et al., 2016). Par contre, l'association des stress a provoqué une accumulation très importante de lipides totaux et un grossissement des cellules dans la culture TLS13-2 de la population TLS13. Comme le taux de croissance de la culture n'a pas été impacté, la productivité en lipides a été multipliée par 5 entre le début et la fin de l'expérience dans la population TLS13-2. Dans cette expérience, la souche RCC3691 et la population TLS13 ont réagi différemment. Il aurait été instructif de mesurer les sucres exsudés, en particulier les exopolysaccharides, dans les sélectiostats de la souche 3691, afin d'étayer l'hypothèse que le métabolisme des glucides a davantage réagi que de celui des lipides.

### 3. Comment obtenir et maintenir des souches d'intérêt ?

#### 3.1. « Courir pour rester sur place », mais marcher pour aller loin

Lewis Carroll (1865) a bien imaginé l'un des principes de l'évolution avec la phrase « il faut courir pour rester sur place ». En effet, les espèces sont en perpétuelle évolution pour rester adaptées à un environnement changeant. Pour rester compétitif, les organismes doivent donc *a minima* évoluer en même temps que leurs concurrents ou que les changements de leurs conditions environnementales.

Pendant mes expériences d'évolution en laboratoire, le stress était maintenu inchangé pendant une semaine au moins avant d'être augmenté. *Tisochrysis lutea* a un taux de croissance relativement important, qui peut atteindre  $1,8 \text{ j}^{-1}$  en conditions optimales. Cela permet deux doublements de population par jour, donc au moins 14 générations par semaine. Toutefois, en conditions de stress, le taux de croissance a chuté à 0,2 ou  $0,3 \text{ j}^{-1}$ , soit seulement trois à quatre générations par semaine. Avec du recul, il apparaît qu'il était peut-être un peu ambitieux d'augmenter le stress à la fréquence que nous avons choisie. En effet, comme il s'agissait de sélectionner les cellules présentant un phénotype intéressant, et pas seulement de les acclimater à de nouvelles conditions de culture, il fallait permettre aux cellules survivant au stress de retrouver un métabolisme stabilisé, et surtout leur donner le temps de se multiplier et de prendre le dessus dans la population. Pour cela, il aurait peut-être été plus judicieux d'accroître le stress après un nombre donné de génération, plutôt qu'après un nombre donné de jours de culture. Avec des paliers de stress plus longs, les pertes brutales de biomasse constatées lors du cycle S7 de l'expérience d'évolution sous stress thermique et lors du stress S4 de l'expérience d'évolution sous stress « oxydatif » thermique et lumineux, ne seraient peut-être pas produites.

### 3.2. Isoler les cellules présentant le phénotype d'intérêt

Un autre point très important qui ressort de ce travail, est la possibilité de caractériser et d'isoler les souches finales obtenues au terme des expériences d'évolution. Deux aspects différents entrent en ligne de compte.

Tout d'abord, la méthode d'évolution en laboratoire ne permet pas de contrôler *stricto sensu* l'apparition et la propagation des mutations au sein de la population cultivée. En effet, les mutations qui surviennent et qui s'accumulent diffèrent d'un individu à l'autre. Se met alors en place un équilibre entre plusieurs sous-populations, différenciées par leur phénotype (résultant de leurs génotypes mutés). Si les conditions de l'évolution sont bien choisies, un phénotype prend progressivement le pas sur les autres et devient majoritaire. Toutefois, cela n'implique pas que les autres sous-populations soient complètement éliminées : certaines, franchement désavantagées, le seront effectivement, tandis que d'autres survivront en petite, voire très petite, quantité. Cela pose le problème de la conservation des traits acquis à la fin de l'expérience d'évolution : il est nécessaire de mettre au point un protocole de conservation des souches (isolation des clones d'intérêt, cryoconservation ; développés dans la partie suivante). Si la population évoluée est replacée dans les conditions stables et non stressantes d'une souchothèque, le phénotype évolué ne sera plus dans les conditions qui lui conféraient un avantage sur les autres sous-populations. Il est tout à fait possible qu'au fil des générations et des repiquages, il diminue progressivement pour devenir à son tour minoritaire. Aussi, le phénotype global de la population peut se transformer, parce que les cellules présentant le phénotype d'intérêt sont de moins en moins nombreuses. En effet, il est probablement impossible de maintenir dans les souchothèques les conditions qui ont permis l'obtention de la souche évoluée en laboratoire (oscillations dynamiques de température et de lumière de grande amplitude dans le cas de mes expériences). Ainsi, la caractérisation, après 3 ans de conservation en souchothèque, d'une souche de *Tisochrysis lutea* obtenue par évolution dirigée par le Dr Bonnefond, n'a pas permis de retrouver le phénotype de fin d'expérience. Il semble donc particulièrement important d'isoler les cellules qui présentent le phénotype d'intérêt à la fin des expériences de sélection, à l'aide d'un cytomètre trieur, de la méthode d'étalement sur gélose ou de la méthode de dilutions en cascade. De cette manière, il est possible de limiter les modifications du phénotype de la population évoluée et isolée dans les premières semaines ou les premiers mois qui suivent la fin de l'expérience d'évolution en laboratoire. Dans le cadre de mes expériences, je souhaitais obtenir un phénotype de lipides polaires modifiés, avec un enrichissement en acides gras polyinsaturés. Le phénotype principal obtenu pour chacune de mes expériences d'évolution dirigée est plutôt celui d'un enrichissement important en lipides totaux. Pour l'isoler, on pourrait utiliser un cytomètre trieur et un marquage au Nile Red par exemple (Garnier et al., 2014 ; Rumin et al., 2015 ; Balduyck et al., 2015). Toutefois, comme le marquage Nile Red marque surtout les globules lipidiques, donc les triglycérides, il faudra vérifier que les cellules isolées grâce au marquage Nile Red présente bien cette augmentation conjointe des trois classes lipidiques, et pas uniquement un enrichissement des lipides neutres.

L'isolement du phénotype est encore plus nécessaire lorsque l'on travaille sur des populations polyclonales. Comparativement à une lignée monoclonale où tous les individus sont identiques, un inoculum polyclonal présente l'avantage d'augmenter la diversité génotypique de départ, et donc de disposer d'une population initiale comportant des cellules avec des caractéristiques variées potentiellement plus intéressantes. Cet avantage n'est effectif seulement si les différents phénotypes

cohabitent dès le départ dans la population. Cela permet donc potentiellement de démultiplier le nombre de sous-populations minoritaires qui coexistent et qui pourraient prendre le pas sur la sous-population majoritaire une fois l'expérience d'évolution en laboratoire terminée.

Il apparaît donc particulièrement intéressant de caractériser le génotype des populations issues d'une expérience d'évolution, et de refaire le test pour quelques années consécutives. Cela permettrait en effet d'évaluer la stabilité du phénotype sélectionné. Pour les microalgues à croissance rapide comme *Tisochrysis lutea*, une caractérisation effectuée immédiatement en fin d'expérience, puis 6 et 12 mois après semble être adéquate pour déceler une éventuelle dérive du phénotype.

### 3.3. La nécessité de « figer » l'évolution

On se rend compte finalement que l'exercice ne s'arrête pas à la fin de l'expérience d'évolution en laboratoire, mais qu'une fois le phénotype d'intérêt obtenu, il faut aussi trouver le moyen de le « figer » pour qu'il n'évolue plus.

Une solution possible a été présentée dans le paragraphe précédent : il s'agit d'isoler les cellules présentant le phénotype d'intérêt. Grâce au tri préalable, la perte du phénotype d'intérêt serait principalement liée à la continuité de l'évolution de la population isolée (cf. paragraphe 4.1.1), avec une perte progressive des mutations qui sont responsables du phénotype. C'est un processus relativement lent mais qui s'effectuera : si le phénotype d'intérêt ne confère pas d'avantages, il sera naturellement éliminé au profit d'un autre, plus avantageux pour les cellules, mais pas pour l'expérimentateur. C'est donc une solution à court terme si elle est considérée seule (Day & Fleck, 2015). Toutefois, elle est peut être intéressante pour conserver des lignées monoclonales.

Une autre possibilité est de conserver la population dans les conditions qui lui ont permis d'évoluer. Ainsi, le phénotype d'intérêt est celui qui confère le meilleur « fitness » aux cellules, et il restera majoritaire. C'est toutefois une solution logistiquement exigeante, qui nécessite d'avoir autant de conditions de conservations qu'il y a eu d'expériences d'évolution au sein du laboratoire, ce qui est difficilement imaginable dès que l'on a plusieurs souches à maintenir. Par contre, si on couple cette solution à la première pour construire un protocole de conservation, il doit être possible d'alléger considérablement la logistique tout en conservant les phénotypes d'intérêt sur le long terme. Ainsi, une population obtenue grâce à une expérience d'évolution en laboratoire serait triée à la fin de l'expérience afin d'isoler les cellules présentant le phénotype d'intérêt. Cette sous-population isolée serait ensuite conservée dans des conditions standards à la souchothèque, en milieu liquide ou sur gélose. Par contre, elle serait régulièrement remise en culture pour un cycle de croissance dans les conditions de son évolution, afin de maintenir l'avantage conféré par le phénotype d'intérêt. Ainsi, la majorité des cultures conservées en souchothèque se développeraient dans des conditions standards, et seule une petite fraction serait maintenue dans des conditions spécifiques que l'on pourrait ajuster selon les populations qui doivent subir leur cycle de stress.

Enfin, la dernière solution permet de « figer » la population au sens propre du terme : il s'agirait de développer un protocole de cryoconservation pour les populations évoluées. Là encore, il semble judicieux d'isoler préalablement les cellules qui présentent le phénotype d'intérêt pour ne conserver que ces dernières, que ce soit sous la forme d'une population ou en créant des lignées monoclonales.

La cryoconservation est une technique qui n'est pas encore au point chez toutes les espèces de microalgues (Day, 2007 ; Youn & Hur, 2009, Saadaoui et al., 2015, Stock et al., 2018) : certaines espèces comme *Porphyridium* la supportent très bien et d'autres, comme la majorité des dinoflagellés, pas du tout. Marro et al. (en préparation), Saadaoui et al. (2015) ou Stock et al. (2018) montrent que les taux de survie à la décongélation des espèces qui supportent la cryoconservation sont extrêmement variables. La cryoconservation crée donc, aujourd'hui, une sélection supplémentaire sur la population cryogénisée. Dans le cas de *Tisochrysis lutea*, Marro et al. (en préparation) obtiennent des résultats variables selon la souche. Les pourcentages de viabilité sont très faibles : inférieurs à 5% pour la souche sauvage et 10% pour celle de laboratoire au bout de 24h, et inférieurs à 1% pour la souche sauvage et 2% pour celle de laboratoire au bout de 48h. La souche sauvage n'a pas montré de reprise de croissance, alors que la souche de laboratoire a redémarré après une phase de latence de presque 3 semaines. Ces résultats sont moins bons que ceux obtenus par Kim et al. (2017) sur *Isochrysis galbana*. En effet, Kim et al. (2017) obtiennent des pourcentages de viabilités de 40 à 80% immédiatement après décongélation suivant les protocoles utilisés, et une reprise de la croissance après 6 jours de latence. Rhodes et al. (2006) font aussi état d'une cryoconservation réussie de *I. galbana*. Il s'agit donc d'un champ encore balbutiant mais qui présente un potentiel immense.

### 3.4. Augmenter la diversité génétique de départ ?

A première vue, il peut sembler extrêmement intéressant de disposer d'une population présentant une grande diversité génétique, au début d'une expérience d'évolution en laboratoire. Au sein d'une population polyclonale, les individus possèdent des génotypes légèrement différents qui présentent des potentiels évolutifs différents. En augmentant leur nombre, on augmente donc en théorie la possibilité d'avoir dans la population de départ un ou plusieurs individus au potentiel plus intéressant que les autres.

En pratique, les résultats sont contrastés. En effet, les analyses génomiques de l'expérience d'évolution sous stress thermique montrent que, sur les 12 souches de l'inoculum, l'immense majorité des cellules n'était plus représentée que par 2 souches lorsque les cycles de stress ont été mis en place. Toutes les autres avaient été éliminées pendant la stabilisation des turbidostats. En effet, les 12 souches de *T. lutea* mélangées dans les sélectiostats ont des origines différentes, elles n'avaient donc pas obligatoirement le même taux de croissance dans les conditions de stabilisation du turbidostat. La population des sélectiostats s'est donc enrichie en souches qui poussaient le mieux, tandis que les autres ont été lessivées. Ces résultats sont quand même à nuancer, parce que quelques marqueurs des 10 autres souches ont quand même été identifiés dans la population en cours d'évolution. Cela peut être dû à la présence en minorité des souches lessivées. Une autre possibilité, très spéculative, serait qu'un brassage génétique dû à un ou plusieurs cycles de reproduction sexuée s'est effectué. En effet, la reproduction sexuée a été montrée chez *Tisochrysis lutea* (Carrier et al., 2014) et cela aurait pu permettre l'incorporation d'une partie du génotype des souches éliminées dans la population en cours d'évolution.

## Conclusion

Ces trois ans de travaux ont permis de mettre en lumière plusieurs points. Tout d'abord, l'évolution dirigée en laboratoire est une technique qui fonctionne pour altérer le phénotype de *Tisochrysis lutea*. En effet, il a été possible d'obtenir des populations dont les teneurs en lipides totaux étaient deux fois et cinq fois plus importantes que la population de départ, sans diminuer leur taux de croissance. La méthode d'évolution en laboratoire a donc permis de multiplier par deux et par cinq la productivité lipidique des cellules. C'est un très bon résultat, comparativement aux travaux de Bougaran et al. (2012), Bonnefond (2015) et Bonnefond et al. (2017), qui ont chacun obtenu une multiplication par deux de la productivité lipidique de *Tisochrysis lutea* grâce à une approche de mutation-sélection ou une approche d'évolution en laboratoire par la température. De plus, l'accumulation que nous avons observée concerne toutes les classes lipidiques, contrairement à Bougaran et al. (2012) qui avaient principalement constaté une accumulation de lipides neutres. Ce résultat rend nos populations de *T. lutea* plus intéressantes d'un point de vue nutritionnel pour une utilisation potentielle en alimentation humaine ou animale, parce qu'elles sont plus riches en AGPI (dont les acides gras essentiels) qui se trouvent surtout dans les lipides polaires et peu dans les lipides neutres.

Deuxièmement, les protocoles d'évolution dirigée en laboratoire ne doivent pas permettre une trop bonne acclimatation des cultures à la pression de sélection choisie, sous peine de diminuer son efficacité. Il faut donc construire les protocoles de manière que les cellules s'acclimatent à des conditions moyennes (température, salinité, intensité lumineuse, etc...) qui diffèrent nettement des valeurs appliquées pour stresser les cultures. On sort ainsi de leur zone d'acclimatation et la pression de sélection reste efficace. C'est aussi tout l'intérêt d'appliquer un signal de stress dynamique, en créneau, et non constant. De plus, il faut que l'accroissement de l'intensité du stress ne soit ni trop rapide ni trop lent pour que les cellules qui possèdent les caractéristiques d'intérêt aient le temps de croître et de dominer la culture. Il semble plus efficace de baser l'augmentation du stress à la fois sur un état physiologique (taux de croissance, mesure de rendement quantique maximum, etc...) et sur un nombre minimum de générations. Il pourrait aussi être intéressant de ménager régulièrement des phases de récupération relativement courtes quand le taux de croissance est faible, afin de permettre la multiplication des cellules et aider la propagation du phénotype d'intérêt.

Troisièmement, il est nécessaire de choisir des critères relativement aisés à mesurer, et d'effectuer leur suivi régulier en conditions standards pour différencier les effets de l'acclimatation de celles de l'adaptation. Il sera nécessaire de mettre au point des *proxis* rapides et faciles à mesurer pour permettre la démocratisation de la technique d'évolution dirigée en laboratoire sur les microalgues et la production de souches d'intérêt industriel. En effet, le suivi actuel du profil en acides gras par exemple, nécessite des analyses biochimiques fines et chronophages qui compliquent l'utilisation en routine de cette méthode.

Enfin, il est nécessaire de développer les protocoles de conservation des phénotypes obtenus en bloquant l'évolution des populations ou des souches à la fin des expériences d'évolution. Les protocoles actuels de conservation en souchothèque ne sont pas optimaux puisqu'ils n'empêchent pas la perte des caractères acquis (Day & Fleck, 2015). Leur optimisation pourrait permettre de

réduire le risque de pertes. Le développement de protocoles de cryoconservations encore peu nombreux sur les microalgues, permettra d'ouvrir les possibilités de préservation des phénotypes et, à terme, devrait faciliter l'utilisation industrielle des souches produites par évolution dirigée en laboratoire.



## Chapitre 7 : références bibliographiques

Ackman R., Tocher C., McLachan J., 1968. Marine phytoplankton fatty acids. *J Fish Res Board Can*; 25, 1603-1620.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., 2002. Molecular biology of the cell, 4<sup>th</sup> edition. New York, Garland Science. Chapitre 14 – The genetic systems of mitochondria and plastids.

Alkhamis Y., Qin J.G., 2013. Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Biomed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/983465>

Almeida A.C., Gomes T., Langford K., Thomas K.V., Tollefsen K.E., 2017. Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquat Toxicol*; 189, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.014>

Anandarajah K., Mahendrapuram G., Sommerfeld M., Hu Q., 2015. Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Appl Energy*; 96, 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.02.057>

Andersen R., 1992. Diversity of Eukaryotic algae. *Biodivers Conserv*; 1, 267-292. <https://doi.org/10.1007/BF00693765>

Aoki M., Sato N., Meguro A., Tsuzuki M., 2004. Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur J Biochem*; 271, 685-693. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03970.x>

Arad S., Levy-Ontman O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr Opin Biotechnol*; 21, 1-7.

Awai K., Watanabe H., Benning C., Nishida I., 2007. Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol*; 48, 1517–1523. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm134>

Azma M., Mohamed M.S., Mohamad R., Rahim R.A., Ariff A.B., 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochem Eng J*; 53,187–195. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.010>

Babuskin S., Radhakrishnan K., Babu P.A.S., Sivarajan M., Sukumar M., 2014. Effect of photoperiod, light intensity and carbon source on biomass and lipid productivities of *Isochrysis galbana*. *Biotechnol Lett*; 36, 1653-1660. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1517-2>

Badel S., Laroche C., Gardarin C., Bernardi T., Michaud P., 2008. New method showing the influence of matrix components in *Leuconostoc mesenteroides* biofilm formation. *Appl Biochem Biotechnol* ; 151, 364-370. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8199-y>

- Badel S., Callet F., Laroche C., Gardarin C., Petit E., El Alaoui H., Bernardi T., Michaud P., 2011. A new tool to detect high viscous exopolymers from microalgae. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 38, 319-326. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0775-9>
- Badger M., von Caemmerer S., Ruuska S., Nakano H., 2000. Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Phil Trans R Soc Lond*; 355, 1433-1446. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0704>
- Baldi F., Minacci A., Saliot A., Mejanelle L., Mozetci P., Turk V., Malej A., 1997. Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Mar Ecol Prog Ser*; 153, 45-57.
- Balduyck L., Veryser C., Goiris K., Bruneel C., Muylaert K., Foubert I., 2015. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. *J Microbiol Methods*; 118, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.009>
- Banks J.G., Board R.G., Carter J., Dodge A.D., 1985. The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by Rose Bengal. *J Appl Bacteriol*; 58, 391-400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb01478.x>
- Bashir K.M.I., Mansoor S., Kim N-R., Grohmann F.R., Shah A.A., Cho M-G., 2019. Effect of organic carbon sources and environmental factors on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Ann Microbiol*; 69, 353-368. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1423-2>
- Becker K., 1996. Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. *Microb Ecol*; 32, 23-33. <https://doi.org/10.1007/BF00170104>
- Bellou S., Baeshen M.N., Elazzazy A.M., Aggeli D., Sayegh F., Aggeli G., 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv*; 32, 1476-1493. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Bendif E., Probert I., Schroeder D.C., de Vargaas C., 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. No. and *Isochrysis nuda* sp. Nov. in Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *J Appl Phycol*; 25, 1763-1776. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0037-0>
- Bernaerts T.M.M., Gheysen L., Kyomugasho C., Jamsazzadeh Kermani Z., Vandionant S., Foubert I., Hendrickx M.E., Van Loey A.M., 2018. Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Res*; 32, 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.017>
- Berthelie J., Casse N., Daccord N., Jamilloux V., Saint-Jean B., Carrier G., 2018. A transposable element annotation pipeline and expressino analysis reveal potentially active elements in the microalga *Tisochrysis lutea*. *BMC Genomics*; 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4763-1>
- Bishop W.M., Zubeck H.M., 2012. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *J Nutrition Food Sci*; 2. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>

- Bligh E.G., Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* ; 37, 911-917. <https://doi.org/10.1139/y59-099>
- Bonnefond H., 2015. Amélioration de microalgues à vocation énergétique par pression de sélection continue.
- Bonnefond H., Moelants N., Talec A., Bernard O., Sciandra A., 2016. Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of *Dunaliella salina*. *Algal Res* ; 14, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.018>
- Bonnefond H., Grimaud G., Rumin J., Bougaran G., Talec A., Gachelin M., Boutoute M., Pruvost E., Bernard O., Sciandra A., 2017. Continuous selection pressure to improve temperature acclimation of *Tisochrysis lutea*. *PLoS ONE*; 12 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183547>
- Borowitzka M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J Appl Phycol*; 9, 393-401. <https://doi.org/10.1023/A:1007921728300>
- Bougaran G., Rouxel C., Dubois N., Kaas R., Grouas S., Lukomska E., Le Coz J.R., Cadoret J-P., 2012. Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnol Bioeng*; 109, 2737-2745. <https://doi.org/10.1002/bit.24560>
- Boussiba S., Bing W., Yuan J-P., Zarka A., Chen F., 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett*; 21, 601-604. <https://doi.org/10.1023/A:1005507514694>
- Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., Kovar K., 2011. Best practices in heterotrophic high-cell density microalgal processes achievements, potential and possible limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*; 91, 31-46. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3311-6>
- Burch A.R., Frank A.K., 2016. Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxyde treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresour Technol*; 219, 559-565. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.010>
- Burgess J., 1985. An introduction to plant cell development. Cambridge ed. Pages 52 à 55.
- Carrier G., Garnier M., Le Cunff L., Bougaran G., Probert I., De Vargas C., Corre E., Cadoret J-P., Saint-Jean B., 2014. Comparative Transcriptome of Wild Type and Selected Strains of the Microalgae *Tisochrysis lutea* Provides Insights into the Genetic Basis, Lipid Metabolism and the Life Cycle. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086889>
- Carrier G., Baroukh C., Rouxel C., Duboscq-Bidot L., Schreiber N., Bougaran G., 2018. Draft genomes and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. Towards the production of domestical strains with high added value. *Algal Res* ; 29, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.017>
- Carroll L., 1865. Les aventures d'Alice au pays des merveilles
- Charusanti P., Fong N.L., Nagarajan H., Pereira A.R., Li H.J., Abate E.A., Su Y., Gerwick W.H., Palsson B.O., 2012. Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS One*; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033727>

- Chairsilp B., Torpee S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour Technol*; 110, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>
- Chen C., Yang Z., Kong F., Zhang M., Yu Y., Shi X., 2016. Growth, physiochemical and antioxidant response of overwintering benthic cyanobacteria to hydrogen peroxide. *Environmental pollution* ; 219, 649-655. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.043>
- Chu F-L.E., Webb K.L., 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids*; 19, 815-820. <https://doi.org/10.1007/BF02534509>
- Coleman R.A., Lee D.P., 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*; 43, 134–176. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00051-1)
- Combe C., Hartmann P., Rabouille S., Talec A., Bernard O., Sciandra A., 2015. Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. *Biotech Bioeng*; 112. <https://doi.org/10.1002/bit.25526>
- Cooksey K.E., Guckert J.B., Thoms R., 1987. Triglyceride accumulation and the cell cycle in microalgae. *Aquatic Species Program: Annual Report*; 135-154.
- Cooper W.J., Ezpp R.G., 1990. Hydrogen peroxide decay in waters with suspended soils: evidence for biologically mediated processes. *Can J Fish Aquat Sci*; 47, 888-893. <https://doi.org/10.1139/f90-102>
- Corpas F.J., Barroso J.B., del Rio L.A., 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci*; 6, 145-150. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01898-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01898-2)
- Costas E., Baselga-Cervera B., Garcia-Balboa C., Lopes-Rodas V., 2014. Estimating the genetic capability of different phytoplankton organisms to adapt to climate warming. *Oceanogr* ; 2. DOI: 10.4172/2332-~2632.1000123
- Cuvelier C., Cabaraux J-F., Dufrasne I., Hornick J-L., Istasse L., 2004. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire*.
- D'Alessandro E., Antoniosi Filho N.R., 2016. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: a review. *Renew Sust Energy Rev*; 58, 832-841. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Da Costa F., Le Grand F., Quéré C., Bougaran G., Cadoret, J-P., Robert R., Soudant P., 2017. Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*. *Algal Res* ; 27, 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.003>
- Da Costa F., Petton B., Mingant C., Bougaran G., Rouxel C., Quéré C., Wikfors G.H., Soudant P., Robert R., 2016. Influence of one selected *Tisochrysis lutea* strain rich in lipids on *Crassostrea gigas* larval development and biochemical composition. *Aquac Nutr* ; 22, 813-836. <https://doi.org/10.1111/anu.12301>
- Darienko T., Gustavs L., Eggert A., Wolf W., Pröschold T., 2015. Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA

barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *Plos One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127838>

Davis M., Fiehn O., Durnford D.G., 2013. Metabolic acclimation to excess light intensity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plan, Cell Environ*; 36. <https://doi.org/10.1111/pce.12071>

Davison I. R., 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J Phycol* ; 27, 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x>

Day J.G., 2007. Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria. In: Day J.G., Stacey G.N. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*; 368. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_10)

Day J., Fleck R.A., 2015. Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of microalgae. *Microalgae Biotechnology*; 1, 1-11. <https://doi.org/10.1515/micbi-2015-0001>

De Jesus Raposo M.F., Santos Costa de Morais R.M., Bernardo de Morais A.M., 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci*; 93, 479-486. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>

Del Pilar Sanchez-Saavedra M., Maeda-Martinez A.N., Acosta-Galindo S., 2015. Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol*; 28, 839-847. <http://doi.org-443.webvpn.fjmu.edu.cn/10.1007/s10811-015-0656-8>

Di Pippo F., Ellwood N.T.W., Gismondi A., Bruno L., Rossi F., Magni P., De Philippis R., 2013. Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. *J Appl Phycol*; 25, 2697-1708. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0028-1>

Drabkova M., Admiraal W., Marsalek B., 2007. Combined exposure to hydrogen peroxide and light – selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environ Sci Technol* ; 41, 309-314. <https://doi.org/10.1021/es060746j>

Dragosits M., Mattanovich D., 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact* ; 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>

Endo H., Hanawa Y., Araie H., Suzuki I., Shiraiwa Y., 2018. Overexpression of *Tisochrysis lutea* Akd1 identifies a key cold-induced alkenone desaturase enzyme. *Sci Rep*; 8, 11230. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29482-8>

Fan J., Andre C., Xu C., 2011. A chloroplast pathway for the *de novo* biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*; 1958-1991. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>

FAO, 2017. The future of food and agriculture – trends and challenges. Rome.

Fernandes H.L., Lupi F., Tomé F., Sa-Correia I., Novais J.M., 1991. Rheological behaviour of the culture medium during growth of the microalga *Botryococcus braunii*. *Biores Technol* ; 38,133–136. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90144-9)

Forti G., Furia A., Bombelli P., Finazzi G., 2003. In vivo changes of the oxidation-reduction state of NADP and of the ATP/ADP cellular ratio linked to the photosynthetic activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* ; 132, 1464-1474. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018861>

Franklin D.J., Brussaard C.P.D., Berges J.A., 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *Eur J Phycol* ; 41, 1–14.  
<https://doi.org/10.1080/09670260500505433>

Fredriksson A., Nyström T., 2006. Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol*; 9, 612-618. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.010>

Fu W., Gudmundsson O., Feist A.M., Herjolfsson G., Brynjolfsson S., Palsson B.O., 2012. Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *J Biotechnol*; 161, 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.004>

Fu W., Gudmundsson O., Paglia G., Herjolfsson G., Andresson O.S., Palsson B., Brynjolfsson S., 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl Microbiol Biotechnol* ; 97, 2395-2403.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5>

Fukuzawa K., Matsuura K., Tokumura A., Suzuki A., Terao J., 1997. Kinetics and dynamics of singlet oxygen scavenging by alpha-tocopherol in phospholipid model membrane. *Free Radic Bio Med*; 22, 923-930. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00485-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00485-6)

Gachelin M., Boutoute M., Carrier G., Talec A., Guihéneuf F., Bernard O., Sciandra A., 2020. Production of an improved *Tisochrysis lutea* population enriched in PUFA-rich polar lipids using adaptive laboratory evolution and thermal stress. Soumis à *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Gaignard C., Laroche C., Pierre G., Dubessay P., Delattre C., Gardarin C., Gourvil P., Probert I., Dubuffet A., Michaud P., 2019. Screening of marine microalgae: investigation of new exopolysaccharide producers. *Algal Res*; 44. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101711>

Garnier M., Carrier G., Rogniaux H., Nicolau E., Bougaran G., Saint-Jean B., Cadoret J-P., 2014. Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *J Proteomics*; 105, 107-120.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.022>

Garnier M., Bougaran G., Pavlovic M., Berard J-B., Carrier G., Charrier A., Le Grand F., Lukomska E., Rouxel C., Schreiber N., Cadoret J-P., Rogniaux H., Saint-Jean B., 2016. Use of a lipid rich strain reveals mechanisms of nitrogen limitation and carbon partitioning in the haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Algal Res* ; 20, 229-248. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.017>

Garozzo D., Impallomeni G., Spina E., Sturiale L., 1998. The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. *Carbohydr Res* ; 307:113–124.

Garrison E., Marth G., 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing.  
<https://arxiv.org/abs/1207.3907>

- Gastineau R., Davidovich N.A., Hallegraef G.M., 2014. Reproduction in microalgae. *Reproductive biology of plants*, chapitre 1.
- Ghosh A., Khanra S., Mondal M., Halder G., Tiwari O.N., Saini O.N., Supreet B., Tridib K., Gayen, K., 2016. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: a review. *Energy Conversion and Management*; 113, 104-118. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.01.050>
- Gibellini F., Smith T.K., 2010. The Kennedy Pathway - *de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*; 62, 414-428. <https://doi.org/10.1002/iub.337>
- Gim G.H., Ryu J., Kim M.J., Kim P.I., Kim S.W., 2016. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* ; 43, 605-616. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1741-y>
- Glynn J.M., Miyagishima S-Y., Yoder D.W., Osteryoung K.W., Vitha S., 2007. Chloroplast division. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00545.x>
- Goss R., Lohr M., Latowski D., Grzyb J., Vieler A., Wilhelm C., Strzalka K., 2005. Role of hexagonal structure-forming lipids in diadinoxanthin and violaxanthin solubilisation and de-epoxidation. *Biochemistry*; 44, 4028-4036. <https://doi.org/10.1021/bi047464k>
- Green D.R., Reed J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*; 281, 1309-1312.
- Gresham D., Hong J., 2015. The functional basis of adaptive evolution in chemostats. *FEMS Microbiol Rev*; 39, 2-16. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12082>
- Griffiths M.J., Harrison S.T., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol*; 21, 493-507. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9392-7>
- Guidi L., Tattini M., Landi M., 2017. Does chloroplast protect chlorophyll against excessive light ? DOI: 10.5772/67887
- Guihéneuf F., Mimouni V., Ulmann L., Tremblin G., 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J Exp Mar Bio Ecol*; 369, 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.11.009>
- Guihéneuf F., Stengel D., 2013. LC-PUFA-Enriched Oil Production by Microalgae: Accumulation of Lipid and Triacylglycerols Containing n-3 LC-PUFA Is Triggered by Nitrogen Limitation and Inorganic Carbon Availability in the Marine Haptophyte *Pavlova lutheri*. *Mar Drugs*; 11, 4246-4266. <https://doi.org/10.3390/md11114246>
- Guillard, R. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. New York: W.L. Smith, M.H. Chanley, Plenum Press, pp. 29-60.
- Guschina I.A., Harwood J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*; 45, 160-186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>

Hamed S.M., Selim S., Klöck G., AbdElgawad H., 2017. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: growth, oxidative and antioxidant analyses. *Ecotoxicol Environ Saf*; 144, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.048>

Hashimoto H., Possingham J.V., 1989. Effect of light on the chloroplast division cycle and DNA synthesis in cultured leaf discs of Spinach. *Plant Physiol*; 89, 1178. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1178>

Hass J.W., 2000. The Reverend Dr William Henry Dallinger, F.R.S. (1839–1909). *Notes and Records*; 54, 53–65. doi:10.1098/rsnr.2000.0096

Harwood J.L., Guschina I.A., 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*; 91, 679-684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004>

Hemaiswarya R., Raja R., Ravi Kumar R., Ganesan V., Anbazhagan C., 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*; 27, 1737-1746. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0632-z>

Heydarizadeh P., Poirier I., Loizeau D., Ulmann L., Mimouni V., Schoefs B., Bertrand M., 2013. Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids. *Mar Drugs*; 11, 3425-3471. <https://doi.org/10.3390/md11093425>

Hlavova M., Turoczy Z., Bisova K., 2015. Improving microalgae for biotechnology - From genetics to synthetic biology. *Biotechnol Adv*; 33, 1194-1203. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.009>

Hu H., Ma L-L., Shen X-F., Li J-Y., Wang H-F., Zeng R-J., 2018. Effect of the cultivation mode on the production of docosahexaenoic acid by *Tisochrysis lutea*. *AMB express*; 8. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0580-9>

Hu Z., Zeng X., Wang A., Shi C., Duan D., 2004. An efficient method for DNA isolation from red algae. *J Appl Phycol* ; 16, 161-166.

Huang B., Marchand J., Thiriet-Rupert S., Carrier G., Saint-Jean B., Lukomska E., Moreau B., Morant-Marceau A., Bougaran G., Mimouni V., 2019. Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea*. *Algal Research*; 40. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>

Huerlimann R., de Nys R., Heimann K., 2010. Growth, lipid content, productivity and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and bioengineering*; 107, 245-257.

Ivanov A.G., Hendrickson L., Krol M., Selstam E., Öquist G., Hurry V., Huner N.P.A., 2006. Digalactosyl-Diacylglycerol Deficiency Impairs the Capacity for Photosynthetic Intersystem Electron Transport and State Transitions in *Arabidopsis thaliana* Due to Photosystem I Acceptor-Side Limitations. *Plant and Cell Physiology*; 47, 1146–1157, <https://doi.org/10.1093/pcp/pci089>

Ivanov B., Kozuleva M., Mubarakshina M., 2012. Oxygen metabolism in chloroplast. DOI: 10.5772/27922

- Jackowski S., 1996. Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *The journal of biological chemistry*; 271, 20219-20222.
- Jagadevan S., Banerjee A., Banerjee C., Guria C., Tiwari R., Baweja M., Shukla P., 2018. Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*; 11.
- Jeong H-G., Choi M-S., 2016. Design and properties of porphyrin-based singlet oxygen generator. *Israel journal of chemistry*; 56, 110-118.
- Jordan R.W., Chamberlain A.H.L., 1997. Biodiversity among haptophyte algae. *Biodiversity and Conservation*; 6, 131-152.
- Kang N.K., Lee B., Choi G-G., Moon M., Park M.S., Lim J., Yang J-Y., 2014. Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Korean J Chem Eng*; 31, 861-867. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0258-6>
- Kari S., Rebours C., Lindblad P., 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in biotechnology* ; 33, 172-215.
- Khanra S., Mondal M., Halder G., Tiwari O., Gayen K., Kumar Bhowmick T., 2018. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: a review. *Food and bioproducts processing*; 110, 60-84.
- Kim E., Archibald J.M., 2009. Diversity and Evolution of Plastids and Their Genomes. In: Sandelius A.S., Aronsson H. (eds) *The Chloroplast. Plant Cell Monographs*, vol 13. Springer, Berlin, Heidelberg
- Kim H.J., Koo B-W., Kim D., Seo Y.S., Nam Y.K., 2017. Effect of marine-derived ice-binding proteins on the cryopreservation of marine microalgae. *Mar Drugs*; 15, 372. <https://doi.org/10.3390/md15120372>
- Kobayashi K., Kondo M., Fukuda H., Nishimura M., Ohta H., 2007. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *PNAS*; 104, 17216-17221. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704680104>
- Koller M., Muhr A., Braunegg G., 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*; 6, 52-63.
- Krasovec M., Sanchez-Brosseau S., Piganeau G., 2019. First estimation of the spontaneous mutation rate in diatoms. *Genome Biology and Evolution*; 11, 1829-1837. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz130>
- Ksas B., Becuwe N., Chevalier A., Havaux M., 2015. Plant tolerance to excess light energy and photooxidative damage relies on plastoquinone biosynthesis. *Scientific reports*. DOI: 10.1038/srep10919
- Kumar K.S., Dahms H-U., Won E-J., Lee J-S., Shin K-H., 2015. Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 113, 329-352.

- Latowski D., Kruk J., Burda K., Skrzynecka-Jaskier M., Kostecka-Gugala A., Strzalka K., 2005. Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *European Journal of biochemistry*; 269.
- Le Goff M., Le Ferrec E., Mayer C., Momouni V., Lagadic-Gossmann D., Schoefs B., Ulmann L., 2019. Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention. *Biochimie*; 167, 106-118.
- Lee R.E., 2018. Phycology, Fifth edition. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lesser M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments. *Annual review of physiology*; 68, 253-278.
- Li D., Wang L., Zhao Q., Wei W., Sin Y., 2015. Improving high carbon dioxide tolerance and carbon dioxide fixation capability of *Chlorella* sp. by adaptive evolution. *Bioresour Technol* ; 185, 269-275.
- Li L., Cui J., Liu Q., Ding Y., Liu J., 2015. Screening and phylogenetic analysis of lipid-rich microalgae. *Algal Research*; 11, 381-386.
- Limoli D.H., Jones C.J., Wozniak D.J., 2015. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr*; 3. DOI [10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014)
- Liu C-P., Lin L-P., 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP 1324. *Botanical Bulletin - Academia Sinica Taipei*; 42, 207-214.
- Liu S., Zhao Y., Liu L., Ao X., Ma L., Wu M., Ma F., 2015. Improving cell growth and lipid accumulation in green microalgae *Chlorella* sp. via UV irradiation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*; 175, 3507-3518.
- Liu J., Sommerfeld M., Hu Q., 2013. Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*; 97, 4785-4798.
- Mackey K.R.M., Paytan A., Caldeira K., Grossman A.R., Moran D., McIlvin M., Saito M. A., 2013. Effect of temperature on photosynthesis and growth in marine *Synechococcus* spp. *Plant Physiol*; 163, 815-829.
- Manirafasha E., Ndikubwimaa T., Zeng X., Lu Y., Jing K., 2016. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical engineering journal*; 109, 282-296.
- Marlowe J.T., Green J.C., Neal A.C., Brassell S.C., Eglinton G., Course P.A., 1984. Long chain ( $n$ -C<sub>37</sub>-C<sub>39</sub>) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. 203-213. <https://doi.org/10.1080/00071618400650221>
- Marchetti J., Da Costa F., Bougaran G., Quéré C., Soudant P., Robert R., 2018. The combined effects of blue light and dilution rate on lipid class and fatty acid composition of *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol*; 30, 1483-1494.
- Marshall J-A., de Salas M., Oda T., Hallegraeff G., 2005a. Superoxide production by marine microalgae - I. Survey of 37 species from 6 classes. *Marine Biology*; 147, 533-540.

Marshall J-A., Ross T., Pyecroft S., Hallegraef G., 2005b. Superoxide production by marine microalgae - II. Towards understanding ecological consequences and possible functions. *Marine Biology* ; 147, 541-549.

Masmoudi S., Nguyen-Deroche N., Caruso A., Ayadi H., Morant-Manceau A., Tremblin G., 2013. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms : from Heaven to Hell – a review. *Cryptogamie, Algologie*; 34,:185-225 (2013). <https://doi.org/10.7872/crya.v34.iss2.2013.185>

Mastusako T., Toya Y., Yoshikawa K., Shimizu H., 2017. Identification of alcohol stress tolerance genes of *Synechocystis* sp. PCC6803 using adaptive laboratory evolution. *Biotechnology for biofuels*; 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0996-5>

Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*; 14, 217-232.

Matringe M., Scala R., 1988. Studies on the mode of ocation of acifluorfen-methyl in nonchlorophylous soybean cells. *Plant Physiology*; 86, 619-622.

Michelet L., Zaffagnini M., Morisse S., Sparla F., Pérez-Pérez M.E., Francia F., Danon A., Marchand C.H., Fermani S., Trost P., Lemaire S.D., 2013. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle : something old, something new. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>

Minhas A.K., Hodgson P., Barrow C.J., Sashidhar B., Adholeya A., 2016. The isolation and identification of microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. *Bioresource Technology*; 211, 556-565. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.121>

Mittler R., Tel-Or E., 1991. Oxidative response and shock proteins in the unicellular cyaobacterium *Synechococcus* R2 (PCC-7942). *Archives of microbiology*; 155, 125-130.

Mobin S., Alam F., 2017. Some promising microalgal species for commercial applications: a review. 1st International Conference on Energy and Power, ICEP2016, (510-517). Melbourne, Australia.

Moller I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress : electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*; 52, 561-591.

Monod J., 1950. La technique de culture continue, théorie et applications. *Ann Inst Pasteur*; 79, 390-401.

Morrison W.R., Smith L.M., 1964. Preparation of fatty methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res*; 5, 600-608.

Mortensen S., Borsheim K., Rainuzzo J., Knutsen G., 1998. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J Exp Mar Biol Ecol*; 122, 173-185.

Mühlroth A., Li K., Rokke G., Winge P., Olsen Y., Hofmann-Marriott M.F., Vadstein O., Bones, A. M. (2013). Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and

candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Marine Drugs*; 11, 4662-4697.

Nakamura H., Sawada K., Araie H., Shiratori T., Ishida K-I., Suzuki I., Shiraiwa Y., 2016. Composition of long chain alkenones and alkenoates as a function of growth temperature in marine haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Organic Geochemistry*; 99, 78-89.

Naylor R.L., Hardy R.W., Bureau D.P., Chiu A., Elliott M., Farrel A.P., Forster I., Gatlin D.M., Goldberg R.J., Hua K., Nichols P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 106, 15103-15110.

Nedbalova L., Strizk A., Sigler K., Rezanka T., 2016. Effect of salinity on the fatty acid and triacylglycerol composition of five haptophyte algae from the genera Coccolithophora, Isochrysis and Prymnesium determined by LC-MS/ECPI. *Phytochemistry*; 130, 64-76.

Neofotis P., Huang A., Sury K., Chang W., Joseph F., Gabr A., Twary S., Qiu W., Holguin O., Polle J.E.W., 2016. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*; 15, 164-178.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.007>

Ness R.W., Moran A.D., Colegrave N., Keightley P.D., 2012. Estimate of the spontaneous mutation rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*; 192, 1447-1454. DOI [10.1534/genetics.112.145078](https://doi.org/10.1534/genetics.112.145078)

Nguyen-Deroche T.L.N., Caruso A., Le T.T., Bui T.V., Schoefs B., Tremblin G., Morant-Manceau A., 2012. Zinc affects differently growth, photosynthesis, antioxidant enzyme activities and phytochelatin synthase expression in four marine diatoms. *The scientific world journal*; 2012.  
<https://doi.org/10.1100/2012/982957>.

Novick A., Szilard L., 1950. Description of the chemostat. *Science*; 112, 715-716.

Nyström T., 2004. Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol*; 58, 161-181. DOI [10.1146/annurev.micro.58.030603.123818](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123818)

Ogawa K., Arai M., Naganawa H., Ikeda Y., Kondo S., 2001/ A new β-D-Galactan having 3-O-methyl-D-galactose from *Chlorella vulgaris*. *J Appl Glycosci* ; 48, 325-330.

Oide S., Gunji W., Moteki Y., Yamamoto S., Suda M., Jojima T., Yukawa H., Inui M., 2015. Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.03973-14>

Pancha I., Chokshi K., Maurya R., Trivedi K., Patidar S. K., Ghosh A., Mishra S., 2015. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*; 189, 341-348.

Patterson G.W., Tsitsa-Tsardi E., Wikforst G.H., Gladu P.K., Chitwoods D.J., Harrison D., 1994. Sterols and alkenones of *Isochrysis*. *Phytochemistry*; 35, 1233-1236.

Perrineau M-M., Zelzion E., Gross J., Price D.C., Boyd J., Bhattacharya D., 2013. Evolution of salt tolerance in a laboratory reared population of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Microbiol*; 16.

- Petasne R.G., Zika R.G., 1997. Hydrogen peroxide lifetimes in south Florida coastal and offshore waters. *Marine Chemistry*; 56, 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(96\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(96)00072-2)
- Priyadarshani I., Rath B., 2012. Commercial and industrial applications of microalgae - A review. *J Algal Biomass Utiln*; 3, 89-100.
- Pulz O., Gross W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 65, 635-648.
- Radek A., Tenhaef N., Müller M.F., Brüsseler C., Wiechert W., Marienhagen J., Polen T., Noack S., 2017. Miniaturized and automated adaptive laboratory evolution: Evolving *Corynebacterium glutamicum* towards an improved D-xylose utilization. *Bioresource Technology*; 245, 1377-1385.
- Ras M., Steyer J-P., Bernard O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*; 12, 153-164. DOI: 10.1007/s11157-013-9310-6
- Rasdi N., Qin J., 2015. Effects of N:P ratio on the growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol*; 27, 2221-2230.
- Ren L-J., Sun X-M., Ji X-J., Chen S-L., Guo D-S., Huang H., 2017. Enhancement of docosahexaenoic acid synthesis by manipulation of antioxidant capacity and prevention of oxidative damage in *Schizochytrium* sp. *Bioresource Technology*; 223, 141-148.
- Renaud S.M., Thinh L-V., Lambrinidis G., Parry D.L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*; 211, 195-214.
- Renaud S.M., Zhou H., Parry D., Thinh L-V., Woo K., 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *J Appl Phycol*; 7, 595-602.
- Reyes L.H., Gomez J.M., Kao K.C., 2014. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metabolic engineering*; 21, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.002>
- Rhodes L., Smith J., Tervit R., Roberts R., Adamson J., Adams S., Decker M., 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae and Rhodophyceae. *Cryobiology*; 52, 152-156.
- Rego-Costa A., Debarre F., Chevin L.M., 2018. Chaos and the (un) predictability of evolution in a changing environment. *Evolution* ; 72, 375-385.
- Richmond, A., 2004. Handbook of Microalgal Culture : Biotechnology and Applied Phycology. Oxford, UK: Blackwell Science.

- Rico-Villa B., Le Coz J., Mingant C., Robert R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*; 256, 377-388.
- Roach T., Chae Sun N., Krieger-Liszkay A., 2015. High light-induced hydrogen peroxyde production in *Chlamydomonas reinhardtii* is increased by high CO<sub>2</sub> availability. *The plant journal*; 81, 759-766.
- Roberty S., Bailleul B., Berne N., Franck F., Cardol P., 2014. PSI Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians. *New Phytol*; 204, 81–91.
- Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondo N., Bonini G., Trecci M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*; 102, 100-112.
- Roe K.L., Schneider R.J., Hansel C.M., Voelker B.M., 2016. Measurement of dark, particle-generated superoxide and hydrogen peroxide production and decay in the subtropical and temperate North Pacific Ocean. Deep. Res. Part I. *Oceanogr Res Pap*; 107, 59–69.
- Roeselers G., van Loosdrecht M.C.M., Muyzer G., 2008. Phototrophic biofilms and their potential applications. *J Appl Phycol*; 20, 227-235.
- Roleda M.Y., Slocombe S.P., Leakey R.J., Day J.G., Bell E.M., Stanley M.S., 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour Technol* ; 129, 439-449.
- Rumin J., Bonnefond H., Saint-Jean B., Rouxel C., Sciandra A., Bernard O., Cadoret J-P., Bougaran G., 2015. The use of fluorescent Nile Red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol Biofuels* ; 8,42. DOI [10.1186/s13068-015-0220-4](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0220-4)
- Saadaoui I., Al Emadi M., Bounnit T., Schipper K., Al Jabri H., 2016. Cryopreservation of microalgae from desert environments of Qatar. *J Appl Phycol* ; 28, 2233–2240 <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0743-x>
- Sabatini S.E., Juarez A.B., Eppis M.R., Bianchi L., Luquet C.M., Del Carmen Rios de Molina M., 2009. Oxidative stress and antioxidant defences in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 72, 1200-1206.
- Santos-Sanchez N., Valadez-Blanco R., Hernandez-Carlos B., Torres-Ariño A., Guadarrama-Mendoza P., Slals-Coronado R., 2016. Lipids rich in  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*; 100, 8667-8684.
- Sato N., Tsuzuki M., Kawaguchi A., 2003. Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h: - I Existence of a eukaryotic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*; 1633, 27-34.
- Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd-Allah E.F., 2019. Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*; 26, 709-722.

- Schäfer L., Vioque A., Sandmann G., 2004. Functional in situ evaluation of photosynthesis-protecting carotenoids in mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of photochemistry and photobiology*; 78, 195-201.
- Schnurr P.J., Allen D.G., 2015. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*; 52, 418-429.
- Shaish A., Avron M., Pick U., 1993. Are oxygen species involved in induction of beta-carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta*; 190, 363-368.
- Shen Y., Zhang H., Xu X., Lin X., 2014. Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*; 38, 481-488.
- Shen P.L., Wang H.T., Pan Y.F., Meng Y.Y., Wu P.C., Xue S., 2016. Identification of Characteristic Fatty Acids to Quantify Triacylglycerols in Microalgae. *Front Plant Sci* ; 7:162. DOI 10.3389/fpls.2016.00162
- Sialve B., Steyer J-P., 2013. Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques* ; 26, 25-39.
- Sigamani S., Ramamurthy D., Natarajan H., 2016. A review on potential biotechnological application of microalgae. *Journal of applied pharmaceutical science*; 6, 179-184.
- Sivaramakrishnan R., Incharoensakdi A., 2017. Enhancement of lipid production in *Scenedesmus* sp. by UV mutagenesis and hydrogen peroxide treatment. *Bioresource Technology*; 235, 366-370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.102>
- Spector D., 1984. Dinoflagellates. Academic Press Inc, United Kingdom Editions.
- Spicer A., Molnar A., 2018. Gene editing of microalgae : scientific progress and regulatory challenges in Europe. *Biology*; 7.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*; 101, 87-96.
- Stavis R.L., n.d. The effect of azide on phototaxis in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proceedings of the national academy of sciences*; 71, 1824-1827.
- Stock W., Pinseel E., De Decker S., Sefton J., Blommaert L., Chepurnova O., Sabbe K., Vyverman W., 2018. Expanding the toolbox for cryopreservation of marine and freshwater diatoms. *Scientific Reports*; 8. DOI 10.1038/s41598-018-22460-0
- Sun H., Meng X., Han J., Zhang Z., Wang B., Bai X., Zhang X., 2013. Anti-cancer activity of DHA on gastric cancer - an *in vitro* and *in vivo* study. *Tumour Biology : the journal of the International Society for oncology and experimental biology and medicine*; 34, 3791-3800.
- Sun X-M., Ren L-J., Zhao Q-Y., Ji X-J., Huang H., 2018. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for biofuels*; 11, 272-288.

- Thompson P.A., Guo M-X., Harrison P.J., Whyte J.N., 1992. Effects of variation in temperature. II. on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol*; 28, 488-497.
- Tirichine L., Bowler C., 2011. Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth. *The plant journal*; 66, 45-47.
- Tonon T., Harvey D., Larson T.R., Graham I.A., 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*; 61, 15-24.
- Trabelsi L., M'sakni N.H., Ben Ouada H., Bacha H., Roudesli S., 2009. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnol Bioproc Eng* ; 14, 27–31.
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A., 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol Letters*; 287-292.
- Venkataramanaiah V., Sudhir P., Murthy S.D.S., 2003. Effect of high temperature on photosynthetic electron transport activities of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Photosynthetica*; 41, 331-334.
- Vilchez C., Forjan E., Cuaresma M., Bédmar F., Garbayo I., Vega J.M., 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*; 9, 319-333.
- Volkman J., Jeffrey S., Nichols P., Rogers G., Garland C., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol*; 128, 219-240.
- Vorbeck M.L., Marinetti G., 1965. Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography. *J Lipid Res*; 6, 1-6.
- Wahidin S., Idris A., Shaleh S.R.M., 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol*; 129, 7-11.
- Walne P.R., 1974. *Culture of bivalve molluscs*. England Fishing News Books Ltd WAL.
- Walne P., 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Fishery Investigations*; 2, 1-53.
- Wang D., Ju X., Zhou D., Wei G., 2014. Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour Technol*; 164, 12-19.
- Wang L., Xue C., Wang L., Zhao Q., Wei W., Sun Y., 2016. Strain improvement of *Chlorella* sp. for phenol biodegradation by adaptive laboratory evolution. *Bioresour Technol*; 205, 264-268.
- Waring J., Klenell M., Bechtold U., Underwood G.J.C., Baker N.R., 2010. Light-induced responses of oxygen photoreduction, reactive oxygen species production and scavenging in two diatom species. *J Phycol*; 46, 1206–1217.
- Wijffels R.H., Barbosa M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*; 329, 796-799. DOI: 10.1126/science.1189003

Xenopoulos M.A., Bird D.F., 1997. Effect of acute exposure to hydrogen peroxide on the production of phytoplankton and bacterioplankton in a mesohumic lake. *Photochemistry and Photobiology*; 66, 471-478.

Xiao R., Zheng Y., 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances and their applications. *Biotechnology advances*; 34, 1225-1244.

Yang C., Hua Q., Shimizu K., 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical engineering Journal*; 6, 87-102.

Yang L., Chen J., Qin S., Zeng M., Jiang Y., Hu J., Hu L., Xiao P., Hao W., Hu Z., Lei A., Wang J., 2018. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for biofuels*; 11.

Yeh K.L., Chen C.Y., Chang J.S., 2012. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochem Eng J*; 64, 1-7.

Yilancioglu K., Cokol M., Pastirmaci I., Erman B., Cetiner S., 2014. Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS One*; 9. DOI [10.1371/journal.pone.0091957](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091957)

Youn J.-Y., Hur, S.B., 2009. Cryopreserved marine microalgae grown using different freezing methods. *Algae*; 24, 257-265. DOI [10.4490/ALGAE.2009.24.4.257](https://doi.org/10.4490/ALGAE.2009.24.4.257)

Yuan J., Shiller A. M., 2004. Hydrogen peroxide in deep waters of the North Pacific Ocean. *Geophys Res Lett*; 31.

Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Poliner E., Pulman J.A., Du Z.-Y., Stefano G., Tsai C.-H., Horn P., Feussner I., Farre E.M., Childs K.L., Brandizzi F., Benning C., 2020. The microalga *Nannochloropsis* during transition from quiescence to autotrophy in response to nitrogen availability. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00854>

Zimmer C., 2011. Losos, Johnathon (ed.). Darwin Under the Microscope: Witnessing Evolution in Microbes

Zhu L., Li Z., Hiltunen E., 2016. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. *Biomed Res Int*.

United Nations population prospects: <https://population.un.org/wpp/DataQuery/>

[http://envlit.ifremer.fr/mobile/glossaire/o/oxygene\\_dissous](http://envlit.ifremer.fr/mobile/glossaire/o/oxygene_dissous)

Code de l'Environnement, Livre V, Titre III, Articles L531-1, -2, -3, -4 et -5 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?idArticle=LEGIARTI000019070468&idSectionTA=LEGISCTA000006159282&cidTexte=LEGITEXT000006074220&dateTexte=20191030>

Code de l'Environnement, Livre V, Titre III, Article D531-2 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do;jsessionid=A8F816C01C657DEF26F6F8315082E>

[90B.tplgfr28s\\_2?cidTexte=LEGITEXT000006074220&idArticle=LEGIARTI000006839046&dateTexte=20191030&categorieLien=cid#LEGIARTI000006839046](http://90B.tplgfr28s_2?cidTexte=LEGITEXT000006074220&idArticle=LEGIARTI000006839046&dateTexte=20191030&categorieLien=cid#LEGIARTI000006839046)

## **Annexe 1: Listes des techniques considérées comme ne produisant pas d'organismes génétiquement modifiés**

Code de l'environnement, Livre V, Titre III, Article D531-2

*« 1° A condition qu'elles ne fassent pas appel aux techniques de recombinaison de l'acide nucléique recombinant ou à des organismes génétiquement modifiés :*

*a) La fécondation in vitro ; b) Les processus naturels tels que la conjugaison, la transduction, la transformation ou l'infection virale ; c) L'induction polyploïde ;*

*2° A condition qu'elles n'impliquent pas l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés en tant qu'organismes récepteurs ou parentaux :*

*a) La mutagenèse ;*

*b) La fusion cellulaire, y compris la fusion de protoplastes, de cellules de n'importe quelle espèce eucaryote, y compris d'hybridomes, et les fusions de cellules végétales d'organismes qui peuvent échanger du matériel génétique par des méthodes de sélection traditionnelles ;*

*c) L'infection de cellules vivantes par les virus, viroïdes ou prions ;*

*d) L'autoclonage, qui consiste en la suppression de séquences de l'acide nucléique dans une cellule d'un organisme, suivie ou non de la réinsertion de tout ou partie de cet acide nucléique ou d'un équivalent synthétique, avec ou sans étapes mécaniques ou enzymatiques préalables, dans des cellules de la même espèce ou dans des cellules d'espèces étroitement liées du point de vue phylogénétique qui peuvent échanger du matériel génétique par le biais de processus physiologiques naturels, si le micro-organisme qui en résulte ne risque pas de causer des maladies pouvant affecter l'homme, les animaux ou les végétaux et s'il est utilisé en milieu confiné. L'autoclonage peut comporter l'utilisation des vecteurs recombinants dont une longue expérience a montré que leur utilisation dans les micro-organismes concernés était sans danger. »*