

Effet du CO₂ sur la croissance et la production de fucoxanthine et d'EPA chez la diatomée d'eau douce *Sellaphora minima*

Auteur : Perez Saura, Pablo

Promoteur(s) : Franck, Fabrice

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9888>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Effet du CO₂ sur la croissance et la production
de fucoxanthine et d'EPA chez la diatomée
d'eau douce *Sellaphora minima*

Promoteur : Fabrice Franck
Co-promoteur : Stéphanie Gérin

Mémoire de fin d'études

présenté par **Pablo Perez Saura** en vue de l'obtention du
grade de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et
Cellulaire, à finalité approfondie



Année académique 2019-2020

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier mon promoteur, le Docteur Fabrice Franck, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Tout au long de la réalisation de ce mémoire, son optimisme et sa tranquillité m'ont toujours réconforté dans les moments de doute.

Un tout grand merci à ma co-promotrice Stéphanie qui a toujours été très présente à mes côtés tant pour me montrer le droit chemin menant la réalisation de ce mémoire que pour égayer mes journées au laboratoire.

Je voudrais particulièrement remercier Amélie pour tous les conseils avisés aussi bien théoriques que pratiques qu'elle a pu me fournir. Merci à elle d'avoir été toujours disponible pour mes questions à toutes heures du jour et de la nuit, mais également pour son aide précieuse relative aux bonnes pratiques de laboratoire et au fonctionnement des divers appareillages.

Je tiens également à remercier Bart et Damien pour leur bonne humeur et leur sympathie à mon égard dans les moments passés ensemble.

Merci à tous ceux qui ont été mes proches tout au long de mes études, que ce soit mes camarades de classe ou les professeurs qui m'ont porté une attention particulière sans qui je ne pourrais pas en être arrivé où j'en suis maintenant.

Je voudrais également remercier mes amis qui m'ont toujours soutenu dans mes choix de vie, tant au niveau de mes études que dans ma vie privée. Un merci particulier à Pablo et Ivan, mes colocataires et amis, qui ont été aux petits soins avec moi lors de la rédaction de ce travail et dans les moments les plus difficiles.

Merci à mes parents, Sabine et Carlos, sans qui je ne pourrais être la personne que je suis aujourd'hui. Chacun d'eux à sa façon m'a inculqué des valeurs et des qualités que je ne dois à personne d'autre et qui me rendent fier d'être leur fils.

Enfin, merci à Pénélope d'avoir cru en moi au quotidien lors de la réalisation de ce mémoire et pour tous les instants privilégiés que je n'aurais jamais vécus si je ne t'avais pas rencontrée.

Résumé

Les diatomées (*Bacillariophyta*) sont des algues unicellulaires capables de synthétiser naturellement divers biocomposants de grande valeur pour l'exploitation humaine. Parmi eux, on retrouve d'une part un pigment, la fucoxanthine, doté de propriétés antioxydantes, antitumorales, ou encore anti-inflammatoires. D'autre part, des acides gras polyinsaturés de la famille des oméga-3, dont l'acide eicosapentaénoïque (EPA), utilisé dans des compléments alimentaires et connu pour ses bienfaits dans la prévention des maladies coronariennes. À l'heure actuelle, l'EPA est essentiellement extrait d'huile de poissons dits « gras », alors que la fucoxanthine provient principalement d'algues brunes marines. Cependant, la surpêche occasionnant des problèmes environnementaux et les algues brunes, généralement cultivées en extérieur, présentant une concentration biomassique en fucoxanthine faible et des conditions de culture difficilement contrôlables, les chercheurs se sont tournés vers l'étude d'alternatives et les diatomées marines ont été largement étudiées comme candidates pour la production de ces composés. Celles-ci, bien que bonnes productrices d'EPA et de fucoxanthine, possèdent néanmoins quelques désavantages dont, principalement, la composition de leur milieu. En effet, la réalisation des milieux marins est coûteuse et laborieuse, notamment, à cause des problèmes de corrosion et de cristallisation du sel. Les chercheurs ont donc judicieusement porté leur attention sur l'étude des diatomées d'eau douce.

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit ce mémoire en faisant suite à une étude préliminaire publiée par Gérin *et al.* [91]. sur la mise au point d'un milieu amélioré pour la culture de diatomées d'eau douce, le FDMed. Nous avons donc utilisé les résultats obtenus pour chercher à améliorer la production d'EPA et de fucoxanthine produits par *Sellaphora minima*, isolée préalablement par le laboratoire de bioénergétique de l'ULiège. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet d'un air enrichi en CO₂ (2% v/v) ainsi que différentes compositions et concentrations en tampon dans le milieu sur la croissance et la production d'EPA et de fucoxanthine de la diatomée d'eau douce en autotrophie. Nous avons constaté que l'enrichissement de l'air avec 2% en CO₂ permet d'accélérer fortement la production de biomasse et d'augmenter la concentration volumique maximale d'EPA et de fucoxanthine chez *S. minima*. L'étude de l'effet des tampons a révélé que certains d'entre eux ont un effet inhibiteur de la croissance cellulaire et une diminution de la productivité d'EPA et de fucoxanthine.

Ce mémoire apporte donc des pistes pour l'optimisation des conditions de culture de *Sellaphora minima* qui pourraient placer la diatomée d'eau douce comme une candidate potentielle pour la production à grande échelle d'EPA et de fucoxanthine

Table des matières

Remerciements	
Résumé	
1. Introduction.....	3
1.1. Les diatomées : généralités.....	3
1.1.1. Morphologie de l'enveloppe	3
1.1.2. Locomotion.....	4
1.1.3. Reproduction.....	4
1.1.4. Ecophysiologie.....	5
1.1.5. Applications commerciales.....	6
1.2. La photosynthèse	7
1.2.1. Généralités	7
1.2.2. Utilisation du CO ₂ par les microalgues.....	8
1.2.3. Pigments photosynthétiques présents chez les diatomées	10
1.3. La fucoxanthine	12
1.3.1. Rôle dans l'appareil photosynthétique	12
1.3.2. Biosynthèse de la fucoxanthine.....	13
1.3.3. Applications de la fucoxanthine	14
1.3.4. Méthodes de production de la fucoxanthine à l'heure actuelle et rendements	16
1.4. L'acide eicosapentaénoïque.....	17
1.4.1. Généralités	17
1.4.2. Biosynthèse de l'EPA chez les diatomées.....	18
1.4.3. Applications de l'EPA.....	19
1.4.4. Méthodes de production de l'EPA à l'heure actuelle et rendements.....	20
2. Objectifs du mémoire.....	21
3. Matériel et méthode	22
3.1. Souche algale.....	22
3.2. Milieux de culture.....	22
3.3. Conditions de culture	24
3.4. Évaluation de la croissance cellulaire.....	25
3.5. Détermination du contenu et de la productivité en fucoxanthine	25
3.6. Détermination du contenu et de productivité en EPA.....	26
3.7. Dosage des nitrates, phosphates et silicates	27

4.	Résultats	29
4.1.	Définition des conditions opératoires pour les cultures d'algues.....	29
4.2.	Croissance.....	30
4.2.1.	Courbes de croissance et influence du pH	30
4.2.2.	Concentrations maximales en biomasse.....	32
4.2.3.	Productivités biomassiques.....	33
4.2.4.	Taux de croissance en phase exponentielle	35
4.2.5.	Microscopie optique.....	36
4.3.	Dosage des nutriments.....	37
4.4.	Production de fucoxanthine	38
4.5.	Production d'acide eicosapentaénoïque (EPA)	42
5.	Discussion :	45
5.1.	Sur les paramètres de croissance.....	46
5.2.	Sur la production de fucoxanthine	48
5.3.	Sur la production d'EPA.....	50
6.	Conclusion et perspectives.....	53
7.	Bibliographie.....	56

1. Introduction

1.1. Les diatomées : généralités

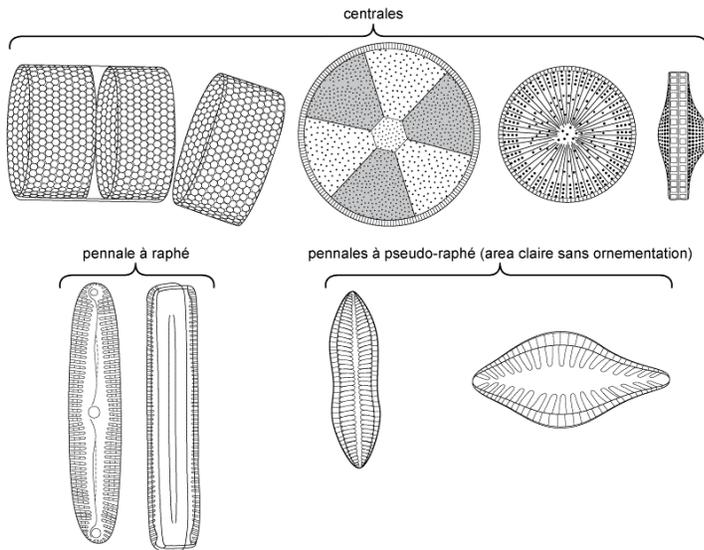


FIGURE 1 : VARIÉTÉ DES FRUSTULES DE DIATOMÉES. ON DISTINGUE AINSI LES CENTRALES, PENNÉES (OU PENNALES) À RAPHE OU PENNÉES À PSEUDO-RAPHE. « MANUEL DE MICROPALÉONTOLOGIE », ALEXANDRE LETHIERS.

Les diatomées ou *Bacillariophyta* sont un embranchement de microalgues unicellulaires individuelles ou coloniales, marines ou dulcicoles, et pouvant être aussi bien benthiques que planctoniques [1]. Elles sont caractérisées par le fait que ce sont les seuls organismes à être dotés d'un squelette externe composé de silice amorphe recouvrant totalement la cellule, nommé frustule. La nomenclature se base d'ailleurs notamment sur l'architecture de cette enveloppe pour en définir l'espèce [2]. Le frustule est composé de deux

thèques emboîtées l'une dans l'autre selon un axe de symétrie précis. Les diatomées sont ainsi divisées en deux groupes et sont dites centriques ou centrales (ordre des *Biddulphiales*), ou pennées (ordre des *Bacillariales*), selon qu'elles soient agencées par rapport à un axe de symétrie radial, ou bilatéral [2](Fig. 1). Les deux groupes basés sur des critères morphologiques sont toutefois des groupes paraphylétiques [3]. Puisque la plupart des diatomées sont photoautotrophes, la frustule est composée de fins pores permettant les échanges gazeux avec l'extérieur afin d'assurer le fonctionnement de l'appareil photosynthétique situé au sein de ses chloroplastes. Le motif de ces pores est généralement propre à l'espèce et peut donc être aussi utilisé comme base pour la classification [4].

1.1.1. Morphologie de l'enveloppe

Les deux thèques, éléments principaux du frustule, s'emboîtent l'une dans l'autre pour former une « boîte » comprenant deux thèques : l'hypothèque (« fond ») et l'épithèque (« couvercle »)(Fig. 2). Chaque thèque est elle-même composée de deux éléments, la valve et le cingulum, pouvant être reliés entre eux par le manteau. On parlera alors d'épivalve ou hypovalve et d'épicingulum ou hypocingulum, selon qu'on retrouve l'élément sur l'épithèque ou sur l'hypothèque [2]. Le cingulum, partie basse de la thèque dirigée vers l'intérieur, est formé d'une couche siliceuse pouvant être agencée de manière plus ou

moins complexe selon les espèces [5,6]. La valve quant à elle constitue la partie haute de la thèque dont la surface est dirigée vers l'extérieur, composée également en grande partie de silice [7].

1.1.2. Locomotion

Une grande partie des diatomées de l'ordre des *Bacillariales* possède une fente, appelée raphé, parcourant une seule ou les deux valves sur une longueur variable et lui permettant de sécréter une substance mucilagineuse utile à sa locomotion [8,9]. Le mécanisme exact permettant un mouvement des diatomées pennées, généralement constaté en direction de la lumière, n'est pas encore totalement compris. Il semblerait cependant qu'il

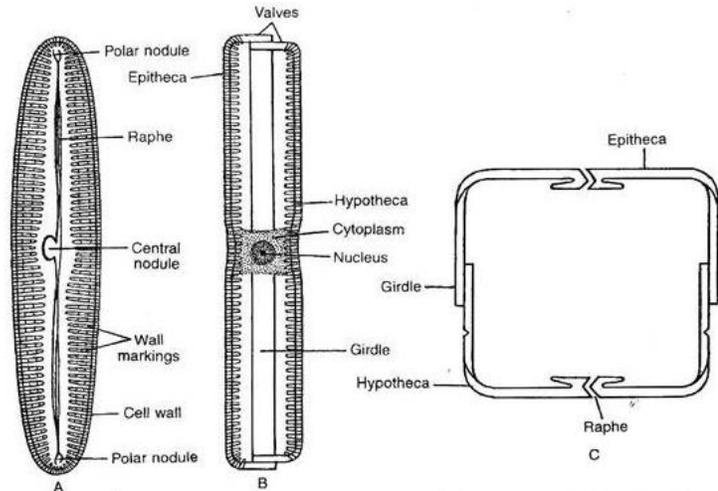


FIGURE 2 : STRUCTURE CELLULAIRE DE LA DIATOMÉE PENNÉE *PINNULARIA VIRIDIS* : A. FRUSTULE VUE DU DESSUS, B. FRUSTULE EN SECTION SAGITTALE, C. FRUSTULE EN SECTION TRANSVERSALE. TIRÉ D'UN ARTICLE DE NEELESH, T SUR BIOLOGYDISCUSSION.COM

s'agit d'une adhérence au substrat du mucilage qui serait sécrété à travers le raphé dans la direction opposée au mouvement, leur permettant ainsi de « glisser » [9]. À l'inverse, les diatomées dites centrales ne possédant par conséquent pas de raphé, sont incapables de locomotion sur un substrat [2]. Il arrive toutefois que les gamètes mâles de ces dernières soient dotés d'un flagelle leur permettant de se déplacer en direction d'un gamète femelle dans un contexte de reproduction sexuée [10,11].

1.1.3. Reproduction

Le mécanisme de reproduction de ces microalgues est le plus souvent asexué et basé sur la scissiparité, on parle alors de reproduction végétative. Chez les diatomées il y a de particulier que chaque cellule fille conserve une des deux thèques, tandis que l'autre est renouvelée, ce qui amène à un dimorphisme au niveau de la taille des cellules filles. Alors que celle héritant de l'épithèque conserve la taille de la diatomée mère, l'autre, conservant l'hypothèque, sera un peu plus petite [11,12](**Fig. 3**). Lors de la division, les deux futures hypocyngulum se forment juste avant la division du noyau et du cytoplasme, suivi par les deux futures hypoalves déjà totalement silicifiées. Une fois les deux nouvelles thèques formées et agencées en frustules, les cellules filles peuvent se séparer [12,13]. Il arrive toutefois que les cellules néoformées restent agrégées chez les espèces formant des colonies [13].

La reproduction asexuée des diatomées, bien qu'efficace sur le court terme, présente néanmoins une faille l'obligeant à avoir recours à un moment donné à une reproduction sexuée. En effet, puisque la taille de l'une des cellules fille est toujours de plus en plus réduite au fur et à mesure des générations, on aboutit à un moment donné à une certaine limite de dimension ne permettant plus la reproduction végétative, avoisinant les 30% de la taille initiale [10]. En vue de recréer une nouvelle génération présentant une taille normale, les microalgues ont recours à la reproduction sexuée entre deux individus. Dans le cas des diatomées centrales, certaines cellules se différencient en gamètes femelles passifs, tandis que d'autres se différencient en gamètes mâles flagellés. Le flagelle leur permet de se mouvoir et ainsi s'introduire dans les diatomées gamètes femelles [10,12]. Chez les diatomées pennées le processus est un peu différent puisque la fécondation se fait par cystogamie. À l'aide du mucilage qu'elles sont capable de sécréter, deux cellules vont dans un premier temps adhérer entre elles suite à quoi l'une va évoluer en gamète mâle (sans flagelle cette fois), alors que l'autre deviendra un gamète femelle. Une fois les rôles déterminés, les cellules vont dans un second temps fusionner pour aboutir à la formation du zygote. Le résultat de la fusion des gamètes se termine dans tous les cas par l'apparition d'une cellule fille premièrement appelée auxospore. Cet auxospore va s'entourer d'une épaisse paroi mucilagineuse et gagner une taille assez importante avant de sécréter les constituants du nouveau frustule et ainsi redevenir une diatomée de taille originelle [10,13,14].

Il est également possible d'observer chez de nombreuses espèces de diatomées, aussi bien pennées que centrales, la formation de spores (appelés hyphospores) lorsque les conditions environnementales leur sont défavorables. Ceux-ci leur permettent de rester en dormance plusieurs semaines durant. Ces spores peuvent se former au sein même du frustule, qui pourra par la suite être réinvesti si les conditions extérieures s'améliorent, ou bien devra être resynthétisé [14].

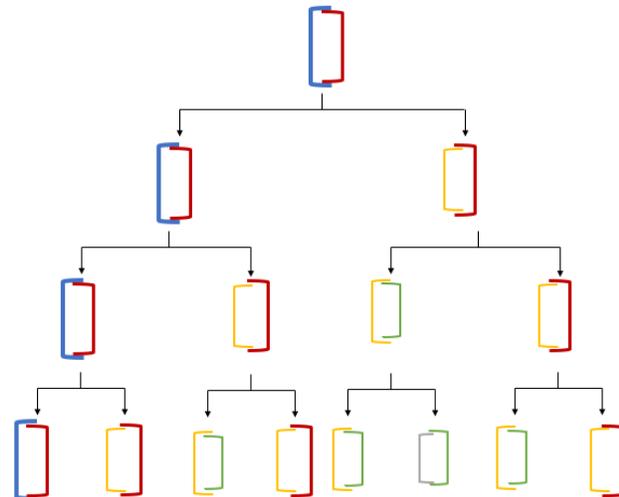


FIGURE 3 : DIAGRAMME DE LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ LES DIATOMÉES REPRÉSENTANT LA RÉDUCTION DE TAILLE DANS LES GÉNÉRATIONS SUCCESSIVES À L'EXCEPTION D'UNE SEULE (À L'EXTRÊME GAUCHE). LES VALVES D'UNE MÊME COULEUR SONT DE TAILLE IDENTIQUE.

1.1.4. Ecophysiologie

On estime que l'ensemble des diatomées est responsable à lui seul de 40% de la production primaire des océans et représente le plus grand groupe d'algues du phytoplancton marin [15]. Cela place les diatomées

à la base de la chaîne alimentaire de nombreuses espèces animales. Par ailleurs, elles sont à l'origine d'une part importante de l'absorption du CO₂ atmosphérique. Les chiffres exacts ne sont pas connus mais on estime qu'elles fixent près de la moitié du dioxyde de carbone atmosphérique [15]. On leur attribue en outre un rôle majeur dans le cycle biogéochimique du silicium dans les mers du globe de par leur métabolisme grandement basé sur leurs besoins en silice [15,16]. De plus, contrairement aux algues vertes et aux plantes supérieures, les diatomées possèdent un cycle ornithine-urée permettant la fixation de carbone inorganique sur des composés azotés. Ce processus essentiel à leur croissance est une de leur contribution à la productivité dans les écosystèmes marins [17]. D'un point de vue écophysiologique, les diatomées sont un excellent bioindicateur de la qualité des cours d'eau utilisé en routine dans de nombreux endroits du globe [18–20]. À titre d'exemple, lorsque la pollution liée aux engrais chimiques et pesticides est trop élevée, celle-ci a tendance à modifier et appauvrir la diversité des populations de diatomées. En conséquence, les principales espèces affectées par les changements des populations de diatomées sont les dinoflagellés qui s'en nourrissent, mais également les vertébrés et invertébrés aquatiques au-dessus de la chaîne alimentaire [19,21,22].

1.1.5. Applications commerciales



FIGURE 4 : CULTURE À CIEL OUVERT D'*ODONTELLA AURITA* (DIATOMÉE MARINE, IMAGE DANS LE COIN SUPÉRIEUR GAUCHE) À BOUIN (VENDÉE) DE LA SOCIÉTÉ INNOVALG: PRODUCTION D'INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES ENRICHIS EN EPA/DHA (OMEGA-3). IMAGE TIRÉE DU SITE BIOENERGIE-PROMOTION.FR

Les diatomées font beaucoup parler d'elles également pour leurs nombreuses applications commerciales et industrielles. On les utilise pour la production de biodiesel, de produits pharmaceutiques, de compléments alimentaires, de diverses biomolécules

ou encore pour leur silice d'une pureté d'un peu plus de 90% [23].

En effet, ces organismes sont riches en composés bioactifs, dont le naviculan étudié pour ses activités antivirales [24], l'acide domoïque qui est un acide aminé neuroexcitateur [25] et une synthèse importante d'adénosine, utilisée pour son activité cytotoxique et inhibitrice de l'activité plaquettaire [26]. En outre, les diatomées synthétisent de nombreux pigments et lipides intéressants pour leur exploitation par l'homme, pour lesquels la biosynthèse peut être partiellement régulée artificiellement en jouant sur les conditions de cultures ou par modification génétique de certaines voies métaboliques. A titre d'exemple

chez la diatomées marine *Phaeodactylum tricornutum*, la surexpression de la $\Delta 5$ désaturase endogène mène à une accumulation de l'EPA, acide gras de la classe des oméga-3 connu pour avoir divers bénéfices pour la santé notamment en tant qu'anti-inflammatoire ou stimulateur de l'activité neuronale [27]. Un autre exemple met en évidence la biosynthèse accrue par la diatomée marine *Odontella aurita* d'une molécule antitumorale et antioxydante, la fucoxanthine, à l'aide d'une faible intensité lumineuse et d'une concentration optimale en azote dans le milieu de culture [28].

1.2. La photosynthèse

1.2.1. Généralités

La photosynthèse est un processus métabolique retrouvé chez de nombreux être vivants visant à transformer l'énergie fournie par la lumière sous forme de photons en énergie chimique assimilable par l'organisme. Cette énergie permet la transformation d'éléments simples (du dioxyde de carbone et de l'eau) en éléments complexes, les glucides. L'ensemble des réactions menant à la formation de ces glucides est réalisable grâce à la réduction du NADP⁺ en NADPH et à la production d'énergie sous forme d'ATP. Ces réactions dépendent elles-mêmes de la photolyse de l'eau, couplée à un dégagement d'oxygène.

L'équation bilan de la photosynthèse se présente comme suit : $6\text{CO}_2 + 12\text{H}_2\text{O} + \text{lumière} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$. La photolyse de l'eau permet l'arrachement de 24 électrons qui permettront la réduction de 6 molécules de CO_2 en une molécule d'hexose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Elle a lieu, chez les organismes eucaryotes, dans les thylakoïdes, eux-mêmes situés dans le stroma des chloroplastes. Le chloroplaste est un organite intracytoplasmique renfermant le stroma (sorte de cytoplasme chloroplastique). Les thylakoïdes forment un réseau membranaire complexe autour du lumen. Ils sont disposés les uns par rapport aux autres sous forme de sacs aplatis pouvant être libres, ou empilés, formant ainsi ce qu'on appelle communément un granum. C'est dans leur membrane que se trouvent les pigments photosynthétiques agencés en antennes collectrices assurant la collecte de l'énergie lumineuse.

La photosynthèse oxygénique, retrouvée chez les plantes, les algues, et les cyanobactéries, est composée de deux phases distinctes. La phase claire, dépendante de l'énergie lumineuse et se déroulant précisément dans la membrane des thylakoïdes, et la phase sombre (cycle de Calvin), prenant place dans le stroma du chloroplaste.

1.2.2. Utilisation du CO₂ par les microalgues

Le cycle de Calvin

Le cycle de Calvin est constitué d'une série de réactions biochimiques impliquant l'ATP et le NADPH créés pendant la phase claire de la photosynthèse (phase photochimique) amenant à la formation de glycéraldéhyde-3-phosphate à partir de CO₂ et d'eau (**Fig. 5**). Le cycle débute par une étape de carboxylation menant à la formation de deux molécules de 3-phosphoglycérate (3C) à partir de ribulose-1,5-biphosphate (5C) auquel sont adjoints une molécule de CO₂ et une molécule d'eau par le complexe enzymatique RubisCO. En présence d'ATP le 3-phosphoglycérate va être phosphorylé pour mener à la formation de 1,3-biphosphoglycérate (3C), qui sous l'action réductrice du NADPH sera réduit en glycéraldéhyde 3-phosphate (3C). Cette étape de réduction permet la libération d'un phosphate inorganique et d'une molécule de NADP⁺ qui pourra être réduite à nouveau par la ferrédoxine durant la phase claire. La dernière étape est la régénération du cycle dans laquelle le glycéraldéhyde 3-phosphate sous l'action de diverses enzymes va être transformé en ribulose 5-phosphate, qui lui-même regagnera un phosphate grâce à l'ATP pour reformer le ribulose 1,5-biphosphate de départ. Environ une molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate sur six est utilisée pour la synthèse d'amidon ou de saccharose, tandis que les 5 autres participeront à la régénération du ribulose biphosphate.

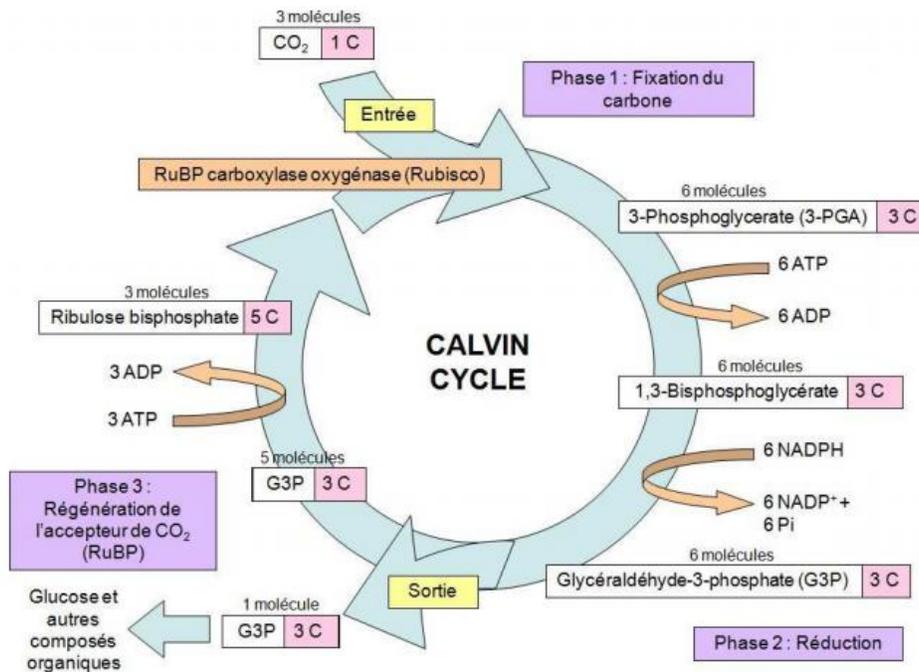


FIGURE 5 : PRINCIPALES ÉTAPES DU CYCLE DE CALVIN (BOYER, 2009. D'APRÈS MAZLIAK, 1974)

La régulation du cycle de Calvin se fait essentiellement au départ de la RubisCO. Ce complexe enzymatique requiert en effet un pH alcalin (pH 8 environ), une molécule de CO₂ (autre que le substrat), un atome de Mg²⁺, et une enzyme particulière (la RubisCO activase) pour être activée. Le transport d'électrons de la phase claire crée un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane thylakoïdale suite au pompage de protons. Ceux-ci ont pour effet de diminuer le pH dans le lumen, et à augmenter celui du stroma où se trouve la RubisCO. Le pH alcalin du stroma va avoir tendance à attirer depuis le lumen du thylakoïde vers le stroma chloroplastique tout un panel de cations désireux de compenser la différence de charge ainsi créée. Parmi ceux-ci on retrouve les ions Mg²⁺ indispensables au fonctionnement de la RubisCO. A ce stade, la RubisCO activase peut permettre la libération du ribulose-1,5-diphosphate alors lié à la RubisCO inactive qui pourra s'activer au contact de CO₂. Il est important de garder à l'esprit qu'une augmentation de la concentration en CO₂ mène à une augmentation de l'activité de la RubisCO, et par conséquent à une production accrue des métabolites dérivés du cycle de Calvin (review de Hügler et Sievert [29], et de Jensen *et al.* [30]).

Cultures de microalgues et fixation du carbone

Le taux de fixation du CO₂ atmosphérique va donc dépendre de l'activité du cycle de Calvin, lui-même régulé par le taux de NADPH et d'ATP dans le stroma du chloroplaste issus de l'activité de l'appareil photosynthétique durant la phase photochimique de la photosynthèse. Cet ensemble de réactions amenant à la production de sucres, il est directement corrélé avec la croissance et la division de la microalgue. En début de culture la concentration en CO₂ dissous d'origine atmosphérique est généralement suffisante, si bien que c'est la lumière (donc la production d'ATP et de NADPH) qui sera le facteur limitant le taux de fixation du CO₂ et donc la croissance. Cependant la densité cellulaire va rapidement augmenter, et si suffisamment de nutriments sont encore présents dans le milieu de culture (nitrates, phosphates, etc..), les algues vont entrer en compétition pour le CO₂ dissous, qui deviendra alors le facteur limitant la croissance plutôt que la lumière.

Une solution pour pallier à ce problème est de leur fournir un air avec un taux de CO₂ supérieur à la normale atmosphérique, menant à des rendements de productivité biomassique accrus. C'est alors que la lumière redevient le facteur limitant. Instinctivement on aurait tendance à penser qu'augmenter l'apport de lumière permettrait aux microalgues de fixer de grandes concentrations en CO₂ et améliorer d'autant plus leur croissance, mais ce n'est pas si simple. Outre les problèmes liés au stress oxydatif que cela peut engendrer, au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente, un phénomène écran se met en place et en moyenne moins de lumière parvient aux algues. Le trajet de la lumière dans une culture d'algue est

un phénomène très complexe à modéliser puisque la pénétration des photons dans le milieu est régie par des phénomènes optiques tels que l'absorption, la diffraction, la diffusion, eux-mêmes dépendants de la longueur d'onde incidente (review de Zhao et Su [31]).

Culture des diatomées sous air enrichi en CO₂ à des fins appliquées

Malgré le fait qu'en théorie un air enrichi en CO₂ aurait pour effet d'augmenter la densité cellulaire d'une culture de diatomée, et donc probablement augmenterait la production de biocomposants par unité de volume, peu d'études ont été menées sur ce sujet. Deux études distinctes portant sur la capacité de production d'EPA pour l'une [32] et de fucoxanthine pour l'autre [28] chez *Odontella aurita*, conduites en photobioréacteurs avec un air enrichi de 1% de CO₂ (v/v), semblent confirmer cette hypothèse. Ces résultats sont malgré tout à prendre avec des pincettes. En effet une review de Kunshan et Douglas [33] traitant de la réponse physiologique des diatomées marines à des niveaux élevés de CO₂ et d'une diminution du pH nous montre en fait que les chiffres reportés dans la littérature sont très variables selon l'espèce étudiée. À titre d'exemple, *P. tricornutum* a montré une augmentation de 16% de sa croissance avec adjonction de CO₂ selon Gao *et al.* [34], *N. palea* une diminution de 67% de sa croissance [35], tandis que de d'autres espèces ne semblent pas en être affectées [36,37].

Au sein du laboratoire de bioénergétique de l'ULiège, un étudiant a réalisé, en 2017, des expériences sur l'impact d'un air enrichi en CO₂ (5% v/v) sur la croissance et la production de fucoxanthine et d'EPA de la diatomée d'eau douce *Sellaphora minima*, dont il sera question dans ce mémoire. Il avait obtenu comme résultats une biomasse plus élevée en fin de phase exponentielle de croissance (de l'ordre de 1,5g.L⁻¹ contre 1g.L⁻¹ sous air atmosphérique), et par conséquent un contenu en biocomposants plus intéressant en termes de masse par unité de volume de culture. À l'inverse, les contenus en fucoxanthine et EPA en termes de mg.DW⁻¹ (DW, Dry Weight = biomasse sèche) étaient plus bas sous CO₂ que sous air. Cela permet donc de confirmer que la production accrue de ces biocomposants était seulement due à l'augmentation de la biomasse. Alors que l'adjonction de CO₂ a tendance à acidifier le milieu tandis que l'activité photosynthétique des microalgues fait plutôt pencher la balance vers une alcalinisation, l'étudiant a pu observer une stabilisation du pH aux alentours de 7 justement suite à la supplémentation en CO₂, ayant pu contribuer à favoriser l'augmentation de la densité cellulaire.

1.2.3. Pigments photosynthétiques présents chez les diatomées

Les organismes photosynthétiques sont capables de synthétiser de nombreux pigments divers et variés absorbant dans une grande gamme de longueurs d'ondes de la lumière visible. Le profil pigmentaire des diatomées est différent de ce que l'on trouve chez la plupart des plantes et algues vertes. La chlorophylle

a (Chl *a*) et la chlorophylle *c* (Chl *c*) sont des constituants avec des caroténoïdes, principalement la fucoxanthine (Fx), des complexes protéiques à fucoxanthine-chlorophylle (FCP) qui remplacent le complexe collecteur de lumière (LHC) des plantes dans le rôle de collecteur de lumière [38]. En revanche le β -carotène, la diadinoxanthine et la diatoxanthine (trois autres caroténoïdes) auraient plutôt un rôle photoprotecteur avec l'aide de la violaxanthine, l'antheraxanthine et la zéaxanthine en tant que constituants du cycle des xanthophylles [39,40].

De manière générale les chlorophylles capturent l'énergie lumineuse provenant des longueurs d'ondes aux alentours du bleu et du rouge [41]. Les chlorophylles sont en fait des molécules chélatant un cation de magnésium au centre d'un tétrapyrrole cyclique contenant un cinquième anneau isocyclique, communément appelé « porphyrine ». Ce macrocycle est relié par une liaison ester à un alcool terpénoïde en C20, le phytol. Ce dernier étant liposoluble, il permet l'ancrage de protéines présentes sur la membrane des thylakoïdes [42].

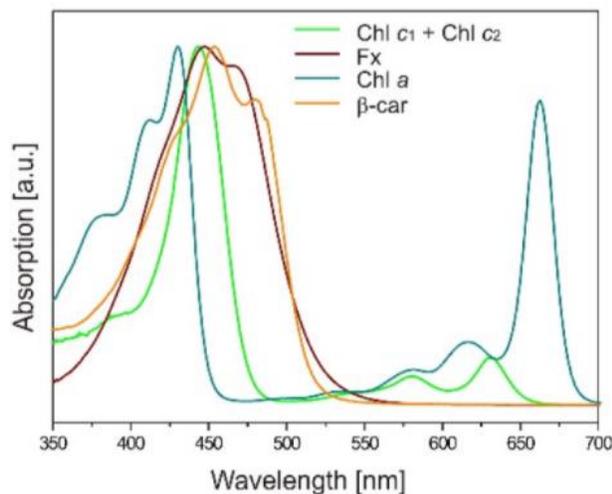


FIGURE 6 : SPECTRE D'ABSORPTION DES PRINCIPAUX PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES MESURÉS PAR HPLC-DAD CHEZ *P. TRICORNUTUM*. LE SPECTRE REPRÉSENTE L'ABSORBANCE DES DIFFÉRENTS PIGMENTS EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE. L'ABSORBANCE A ÉTÉ NORMALISÉE À LA LONGUEUR D'ONDE MAXIMALE. EN VERT : CHLOROPHYLLE C1 ET C2 (CHL C1 + CHL C2) ; EN BORDEAUX : LA FUcoxANTHINE (Fx) ; EN BLEU : LA CHLOROPHYLLE A (CHL A) ; EN ORANGE : LE B-CAROTÈNE (B-CAR). REPRIS DE KUCZYNSKA ET AL. (2015).

Parmi les différents types de chlorophylles retrouvées chez les microorganismes photosynthétiques, seules deux formes ont été observées chez les diatomées, la Chl *a* et la Chl *c* [43]. La Chl *a*, comme dans la majorité des organismes photosynthétique, joue un rôle central dans la conversion de l'énergie photochimique. La Chl *c* en revanche, à l'instar de la Chl *b* chez les plantes supérieures et algues vertes, n'est qu'un pigment accessoire qui permet d'élargir le spectre d'absorption de la lumière pour la photosynthèse. Les formes les plus abondantes présentes chez les diatomées sont la Chl *c1* et la Chl *c2*. La structure particulière de la Chl *c* en modifie les propriétés d'absorption par rapport aux autres chlorophylles, laissant apparaître une bande d'absorption intense dans le bleu contre une bande d'absorption réduite dans les tons du rouge [44].

1.3. La fucoxanthine

1.3.1. Rôle dans l'appareil photosynthétique

En plus des chlorophylles, on retrouve des caroténoïdes dans l'appareil photosynthétique de nombreux organismes. A ce jour plus de 700 types de caroténoïdes ont été identifiés dans la nature [45]. Globalement les algues, surtout celles ayant évolué depuis une endosymbiose secondaire, sont capables d'en produire une large gamme [43], dont certains sont uniques en leur genre. On recense parmi ceux-ci la péridinine, la diadinoxanthine ou encore la fucoxanthine [45]. Ces derniers sont les caroténoïdes principaux synthétisés par les diatomées [43,46]. Hormis la péridinine produite par les dinoflagellés, la fucoxanthine est le caroténoïde le plus fréquemment rencontré dans les océans, en tant que constituant du complexe protéique fucoxanthine-chlorophylle (FCP) avec la chlorophylle *a* et la chlorophylle *c* chez les algues brunes et certaines microalgues [43,47]. Ce dernier est très similaire au complexe collecteur de lumière (LHC) des *Chlorophyceae* et des plantes vertes. *In vivo*, la fucoxanthine absorbe les photons des rayons lumineux dans un intervalle de longueur d'onde allant de 500 à 560nm [47], et joue ainsi un rôle d'antenne permettant de transférer l'énergie d'excitation aux chlorophylles voisines dans le complexe pigment-protéine [48].

1.3.2. Biosynthèse de la fucoxanthine

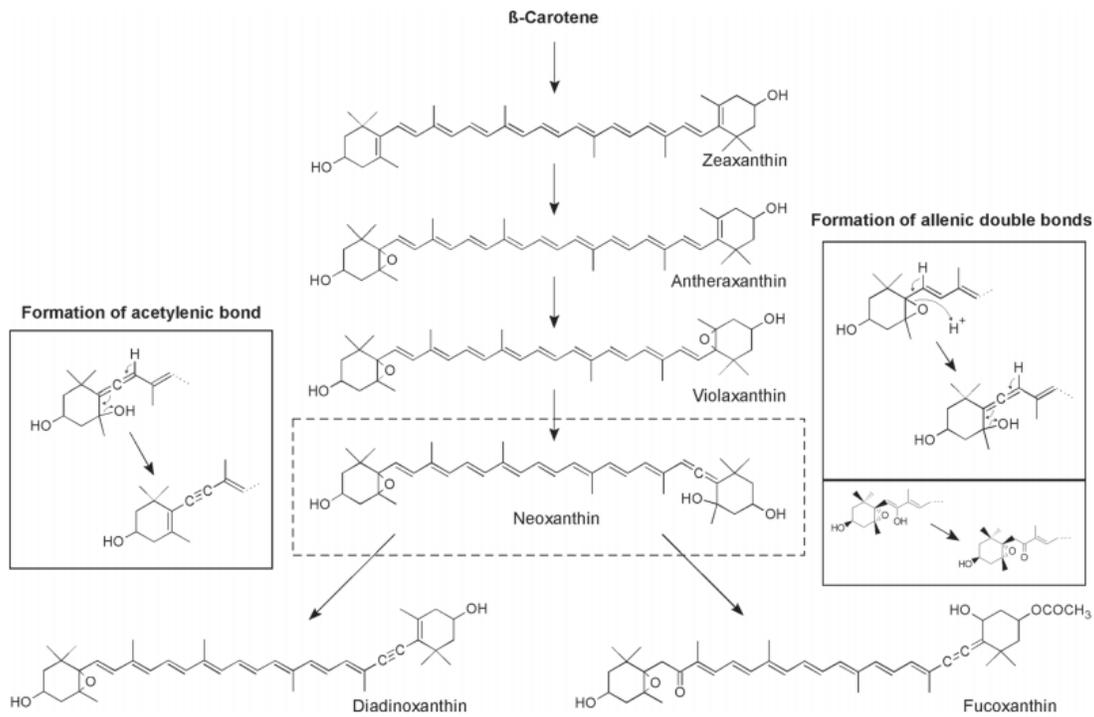


FIGURE 7 : VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA FUcoxANTHINE ET DE LA DIADINOXANTHINE DEPUIS LE β-CAROTÈNE CHEZ *P. TRICORNUTUM* PROPOSÉE PAR DAMBEK ET AL. (2012). LE POINT D'INTERSECTION ENTRE DES DEUX PRODUITS TERMINAUX, LA NÉOXANTHINE, EST ENCADRÉE D'UN TRAIT POINTILLÉ. LES CADRES DONT LE TRAIT EST CONTINU SCHÉMATISENT LE MÉCANISME DE FORMATION DE LA LIAISON ACÉTYLÉNIQUE, DE LA DOUBLE LIAISON ALLÉNIQUE, ET DE LA FORMATION DU GROUPEMENT CÉTONE EN C8.

La voie de biosynthèse de la fucoxanthine est en grande partie commune avec celle d'un autre caroténoïde, la diadinoxanthine [49]. Beaucoup d'auteurs ont à ce jour proposé différentes voies possibles, avec plus ou moins d'étapes manquantes [45,50,51]. L'organisme modèle préférentiellement étudié et dont la voie de biosynthèse de la fucoxanthine sera décrite par la suite, est la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum* dont le génome complet a été séquencé par Bowel *et al.* [52](Fig. 7). La fucoxanthine est formée à partir des xanthophylles, eux-mêmes dérivés du β-carotène, dont la voie de biosynthèse a totalement été confirmée chez *P. tricornutum* à l'exception de la ζ-carotène synthase [53]. Comme chez de nombreux autres organismes, elle démarre du phytoène dont la production est catalysée au départ du géranylgeranyl pyrophosphate par la phytoène synthase. La phytoène désaturase va permettre la formation de deux doubles liaisons supplémentaires pour former le ζ-carotène qui sera converti par la ζ-carotène désaturase en prolycopène. Ce dernier, dont l'enzyme de conversion n'a pas été révélée à ce jour chez la diatomée, va permettre la synthèse de lycopène, lui-même précurseur du β-

carotène dont la formation est catalysée par la lycopène β -cyclase [50,51,54]. Afin d'aboutir sous l'action de la violaxanthine dé-époxydase à la violaxanthine, connue pour être un intermédiaire dans la voie de biosynthèse de la fucoxanthine [40], le β -carotène est d'abord converti par la zéaxanthine époxydase en zeaxanthine puis en anthéroxanthine par la voie de biosynthèse des xanthophylles [40,55]. La néoxanthine synthétisée depuis la violaxanthine par la néoxanthine synthase (une caroténoïde cyclase) constitue le point d'intersection pouvant mener à la fois à la fucoxanthine et à la diadinoxanthine [56], dont les enzymes de conversion ne sont pas encore identifiées. Cette voie menant dans un premier temps à la néoxanthine est commune dans la grande majorité des groupes algaux, y compris les algues vertes et les plantes supérieures [47]. La synthèse de diadinoxanthine est catalysée par une seule et unique réaction dans laquelle une liaison acétylénique est formée à partir d'une double liaison allénique par élimination d'un groupement 5'-OH en eau [53]. Parallèlement, la formation de la fucoxanthine à partir de la néoxanthine quant à elle nécessite deux étapes de modification. D'une part la réaction de formation d'une cétone en C8 et d'autre part une acétylation du groupement -OH du C3' [53] qui conclut la formation du céto-caroténoïde, la fucoxanthine.

1.3.3. Applications de la fucoxanthine

Outre son utilité dans l'appareil photosynthétique de microalgues et algues brunes consommées dans de nombreux pays sous la nomination de « wakame », la fucoxanthine a été dernièrement largement étudiée pour son pouvoir antioxydant mais également pour ses potentielles applications en médecine curative et préventive.

Lorsqu'ingérée la fucoxanthine, de par sa nature hydrophobe tout comme les autres caroténoïdes, est absorbée par l'organisme à l'instar des graisses alimentaires au niveau des bordures en brosse des entérocytes dans l'intestin grêle. Avant cela dans le tractus gastrointestinal, la fucoxanthine va être hydrolysée en fucoxanthinol, à l'aide d'enzymes digestives telles que des lipases ou cholestérol estérases, puis absorbée et redirigée vers le foie où elle va être convertie en amarouciaxanthine A [57,58]

Bien que peu de publications aient été rédigées sur les effets métaboliques de l'amarouciaxanthine A sur les cellules cancéreuses, on ressent déjà une large gamme de bénéfices liés à l'administration de fucoxanthine et fucoxanthinol pour la prévention de divers cancers dont notamment le cancer du poumon, de la prostate, du sein ou encore du colon [59–64]. Une revue de Kumar *et al.* [65] met en avant tous les mécanismes élucidés à ce jour expliquant l'influence anti-tumorale et antiproliférative de la fucoxanthine grâce à son action sur de multiples voies métaboliques impliquées notamment dans l'apoptose, l'arrêt du

cycle cellulaire, ou encore l'apparition de métastases. L'action du pigment sur la prévention cancéreuse peut également être expliquée par ses fonctions anti-angiogéniques [66], menant à un appauvrissement en oxygène et nutriments de l'environnement tumoral. Puisque les études sur la toxicité et la mutagénicité potentielles sur la souris ont montré que son administration par voie orale ne présentait aucun danger [57,67], la fucoxanthine et ses métabolites connus méritent d'être mieux étudiés en vue d'une possible exploitation future comme traitement préventif ou thérapeutique contre le cancer.

Le pigment et ses métabolites semblent avoir également des propriétés anti-inflammatoires. Une étude de Kim *et al.* [68] a démontré *in vivo* et *in vitro* une diminution de l'activité inflammatoire causée par les LPS chez la souris suite à l'injection préventive de fucoxanthine. Les LPS, provenant de bactéries à Gram négatif, sont connus pour induire une forte activité pro-inflammatoire [69]. Les chercheurs précédemment cités ont notamment pu prévenir l'apparition d'une uvéite induite artificiellement et constaté une baisse importante de la concentration en macrophages, en PGE2, en oxyde nitrique et du facteur de nécrose tumorale (TNF- α) dans l'humeur aqueuse. De plus, il a été démontré ultérieurement que la fucoxanthine avait une activité inhibitrice significative sur la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , et IL-6, par des macrophages RAW 264.7 *in vitro* stimulé par la présence de LPS dans le milieu. Ces mêmes chercheurs ont montré également une activité réduite de la MAP Kinase et du facteur de transcription NF- κ B, deux acteurs principaux dans le processus inflammatoire [70].

En plus de cela, la fucoxanthine a été étudiée pour ses propriétés anti-obésité, qui proviendraient de sa capacité à promouvoir l'expression de la protéine UCP1, connue pour réduire la masse graisseuse abdominale [71]. Cette protéine montre une expression accrue et en conséquence un taux de tissus adipeux blanc réduit chez les rats et souris dont le régime était complété par de la fucoxanthine provenant d'une algue brune, *Undaria pinnatifida*, par rapport au groupe contrôle nourri de glycolipides seuls [72].

Des extraits de fucoxanthine provenant aussi de *Undaria pinnatifida* ont également permis de mettre en évidence une réduction du développement de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinisme chez des souris diabétiques et obèses [73]. En jouant en amont sur la voie de signalisation de l'insuline, le pigment favoriserait l'expression et la translocation du cytosol vers la membrane plasmique des protéines GLUT4, transporteur prédominant du glucose dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux, permettant ainsi de réguler le taux de sucre dans le sang et améliorer la santé de ces rongeurs [74,75].

De nombreuses études se sont penchées sur le pouvoir antioxydant de la fucoxanthine provenant aussi bien d'algues brunes que de diatomées. Á titre d'exemple, la méthode d'évaluation de la capacité d'une molécule antioxydante à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a permis de démontrer que la fucoxanthine était le composé actif majoritaire des algues brunes *Undaria pinnatifida* et *Hijikia fusiformis* [76]. Toujours sur base de la même méthode au DPPH°, il a été démontré que la fucoxanthine a un pouvoir d'extinction des radicaux libres en anoxie plus puissant que d'autres caroténoïdes tels que le β -carotène, la zéaxanthine, le lycopène et la lutéine [77]. Dans la même lignée, l'activité antioxydante de la fucoxanthine provenant de la diatomée marine *Odontella aurita* a pu être démontrée toujours à l'aide du DPPH° radicalaire et avec encore de meilleurs résultats sur le radical cationique ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) [28]. En outre, des tests de l'activité d'extinction de radicaux hydroxyles mesurés aussi bien par chimiluminescence que par la technique ESR (Electron Spin Resonance) ont eux aussi montré la capacité antioxydante de la fucoxanthine, et ce en la comparant avec d'autres molécules connues pour ces propriétés comme l' α -tocophérol (vitamine E) [78].

En plus d'être un pigment de la famille des caroténoïdes utilisé par certaines microalgues et algues brunes au niveau des antennes collectrices de lumière pour l'absorption de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique, la fucoxanthine a prouvé qu'elle avait des effets thérapeutiques notoires. Tant en termes de prévention contre divers types de cancers, de maladies chroniques comme l'obésité ou le diabète, que comme antioxydant ou anti-inflammatoire naturel, la fucoxanthine semble bien au fur et à mesure des études receler bien des secrets. Bien que les algues brunes contiennent également de la fucoxanthine, il s'avère que les diatomées contiennent en terme de mg.g^{-1} de masse sèche environ quatre fois plus que les algues brunes multicellulaires [79]. C'est l'une des raisons pour lesquelles il semble utile d'approfondir la recherche sur les diatomées et leurs multiples biocomposants non négligeables pour l'activité humaine.

1.3.4. Méthodes de production de la fucoxanthine à l'heure actuelle et rendements

La production de fucoxanthine à grande échelle est principalement destinée à la production de compléments alimentaires réalisés à base d'extraits purifiés d'algues brunes marines (*Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Nizamuddiniana zanardinii*, *Cystoseira indica*). La concentration en fucoxanthine répertoriée dans la littérature pour ces espèces est généralement comprise entre 0,1 et 5 mg.gDW^{-1} [80–82]. Les diatomées marines ont déjà cependant démontré qu'elles étaient capables de synthétiser des

concentrations en fucoxanthine bien plus élevées. Lorsque les conditions de culture sont optimisées, des espèces comme *Odontella aurita*, *Nitzschia laevis* et *Phaeodactylum tricornutum* en possèdent un taux pouvant aller de 15 à 20mg.gDW⁻¹ [28,32,83,84].

Les espèces d'algues brunes et aussi de diatomées utilisées actuellement pour leur contenu en fucoxanthine étant marines, cela peut poser des problèmes pour leur culture. D'une part en extérieur il est quasiment impossible de contrôler les conditions de culture et on peut être sujet à de multiples contaminations. D'autre part, bien qu'un fermenteur permette de pallier ces problèmes, la corrosion liée à la forte concentration en sels, la cristallisation de ce dernier, et le coût élevé de ce type de milieu peuvent compliquer la culture des microalgues marines [85,86].

Jusqu'ici les diatomées d'eau douce, bien que riches en biocomposants de première importance commerciale, ne disposaient pas d'un milieu de culture leur permettant d'atteindre des biomasses suffisantes pour que leur exploitation soit sérieusement envisagée. Ces diatomées d'eau douce étaient globalement étudiées seulement dans un but écophysologique notamment comme un indicateur de pollution.

Néanmoins, Gérin *et al.* [87] ont récemment mis au point un milieu de culture, le FDMed, permettant d'atteindre en culture batch des taux de biomasse jusqu'alors insoupçonnés pour une souche de diatomée d'eau douce productrice de fucoxanthine, *Sellaphora minima*. Grâce à ce nouveau milieu, ils ont pu atteindre des biomasses de 1,71 g.L⁻¹ et un contenu en fucoxanthine de 7,6mg.gDW⁻¹ contre 0,37 g.L⁻¹ et 4,0mg.gDW⁻¹ respectivement pour le milieu optimisé conventionnel, le MCOMBO.

1.4. L'acide eicosapentaénoïque

1.4.1. Généralités

Un autre produit d'une grande importance commerciale, l'acide eicosapentaénoïque (EPA), s'avère être dans certains cas synthétisé en grande quantité chez les microalgues et diatomées. L'EPA est un acide gras polyinsaturé de la famille des oméga-3, connus pour jouer un important rôle dans la prévention de nombreuses maladies chez l'homme.

1.4.2. Biosynthèse de l'EPA chez les diatomées

La voie de biosynthèse des oméga-3 a déjà été décrite chez de nombreux organismes comme les poissons gras [88], les plantes supérieures [89], ou encore les cyanobactéries [90]. Chez les diatomées cette voie a également été décrite notamment pour les diatomées marines *Chaetoceros gracilis* [91] et *Phaeodactylum tricornutum* [27] et semble impliquer la même cascade de réactions enzymatiques dans les deux cas. Il existe en réalité différentes voies possibles menant à la formation d'EPA chez les diatomées, toutes basées sur diverses réactions enzymatiques utilisant comme acide gras primaire l'acide oléique. Il ne sera détaillé ici que la voie majoritairement active chez *Phaeodactylum tricornutum* selon Arao et Yamada [27], sur base d'une article de Domergue *et al.* [92](**Fig. 8**). Chez cette espèce, l'EPA est le plus abondant des acides gras polyinsaturés synthétisés [93,94].

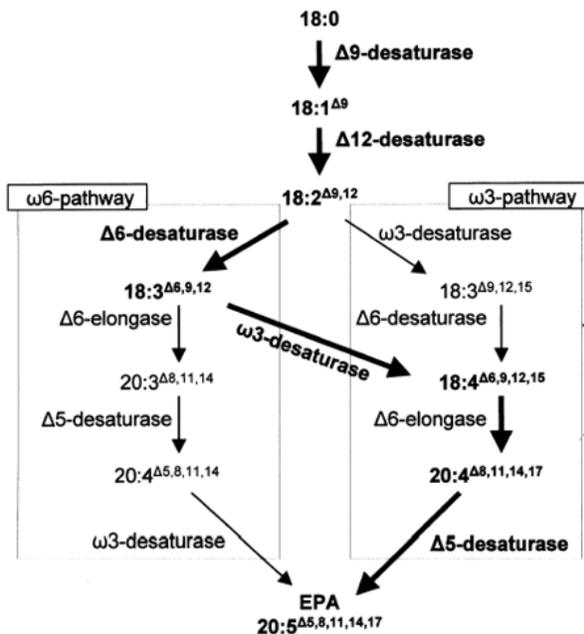


FIGURE 8 : VOIE BIOSYNTHESE DE L'ACIDE EICOSAPENTAÉNOÏQUE DEPUIS L'ACIDE STÉARIQUE (18 :0) CHEZ *P. TRICORNUTUM* PAR DOMERGUE ET AL. (2002). LES VOIES DE BIOSYNTHESE CLASSIQUES DES Ω6 ET DES Ω3 SONT ENCADRÉES EN GRIS. LES FLÈCHES ET LE TEXTE EN GRAS REPRÉSENTENT LA ROUTE LA PLUS ACTIVE SELON ARAO ET YAMADA (1994).

L'acide oléique (18 :1^{Δ9}), dont l'insaturation sur le 9^e atome de carbone voit le jour depuis l'acide stéarique (18 :0) par une Δ9-désaturase, est le précurseur de l'acide linoléique (18 :2^{Δ8,12}), oméga-6 qui constitue le point de départ des voies de biosynthèse des autres acides gras oméga-6 et des oméga-3. Malgré la nature oméga-3 de l'EPA, sa biosynthèse chez *P. tricornutum* se poursuit par la formation d'un autre oméga-6, l'acide γ-linolénique (18 :3^{Δ6,9,12}), suite à l'insaturation de la liaison carbone-carbone en 6^e position par une Δ6-désaturase. Ensuite l'acide stéaridonique (18 :4^{Δ6,9,12,15}), intermédiaire dans la voie de biosynthèse des oméga-3, va subir une désaturation par une ω3-désaturase avant d'être allongé de 2 atomes de carbone du côté de la fonction acide carboxylique par une Δ6-élongase amenant à l'acide eicosatétraénoïque (20 :4^{Δ8,11,14,17}). Enfin, l'acide eicosapentaénoïque (20 :5^{Δ5,8,11,14,17}) naîtra d'une ultime désaturation médiée par la Δ5-désaturase. Malgré que nombreuses microalgues utiliseront l'EPA comme précurseur de l'acide docosahexaénoïque (DHA ; 20 :5^{Δ4,7,10,13,16,19}), il semble que ça ne soit pas le cas des diatomées [94].

1.4.3. Applications de l'EPA

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont d'un grand intérêt nutritif pour garantir une bonne santé chez l'homme et un développement normal chez l'enfant [95,96]. L'importance d'une alimentation riche en acides gras de la famille des oméga-3, dont l'EPA fait partie, a été documentée à de nombreuses reprises [97]. Alors que la proportion ingérée d'oméga-6 et d'oméga-3 devrait être de 1/1, comme c'est le cas pour les mammifères sauvages ou devrait l'être pour l'Homme, le régime alimentaire occidental moderne mène à un ratio oméga-6/oméga-3 élevé, de l'ordre de 15-20/1. Ce déséquilibre s'avère être à l'origine de nombreux problèmes de santé chez l'adulte, et de croissance chez le nouveau-né et l'embryon [97–99]. Outre l'utilité de complément alimentaire que l'on peut attribuer à l'EPA pour abaisser le ratio précédemment cité, certaines applications médicales ou pharmaceutiques étudiées lui sont propres.

Dyerberg *et al.* [100] avaient déjà rapporté par le passé les effets bénéfiques de l'EPA sur les maladies coronariennes en prévenant l'apparition de thrombus et de plaques d'athérome. Ils se sont basés sur la prévalence très faible des cas d'infarctus du myocarde chez les Eskimos groenlandais, dont le régime est très riche en oméga-3, pour rechercher plus précisément le rôle de l'EPA dans ces bienfaits. Ils ont découvert que, contrairement à l'acide oméga-6 eicosatétraénoïque (ETA) qui induit l'agrégation plaquettaire dans le plasma sanguin, l'EPA aurait la propriété inverse d'anti-agrégant. Alors que ces deux acides gras peuvent être utilisés par les cellules endothéliales pour la synthèse de prostacyclines aux effets antithrombotiques (PGI_2 et la PGI_3 pour l'ETA et l'EPA respectivement), seul l'ETA peut être utilisé par les thrombocytes activés (plaquettes) pour la formation d'une cytokine prothrombotique, le thromboxane- A_2 . En réalité l'EPA peut également être assimilé par les plaquettes mais mène à la formation d'un thromboxane inactif, le thromboxane- A_3 [101,102]. Il semblerait donc qu'un régime conséquent en EPA pourrait faire pencher la complexe balance homéostatique régulant l'agrégation plaquettaire vers un état antithrombotique protégeant de certaines maladies cardiovasculaires.

De nombreuses études ont également appuyé les effets anti-inflammatoires de l'EPA [103–106]. À titre d'exemple, Mullen *et al.* [105] ont démontré que des macrophages préalablement cultivés en présence d'EPA en concentration de 25mM avaient une activité inflammatoire réduite lorsqu'on les activait avec des LPS d'une concentration allant de 0 à 1 mg.mL⁻¹. Les chercheurs ont en effet confirmé que l'EPA génère une diminution significative de la sécrétion du facteur de nécrose tumorale TNF- α , tel que décrit précédemment [107,108], mais aussi d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-6. En outre, ils ont démontré qu'il avait une action inhibitrice sur la voie d'activation du facteur de transcription NF- κ B impliqué dans de nombreux processus de la réponse immunitaires tel que la phagocytose [109].

D'un point de vue neurologique, un apport alimentaire en acides gras oméga-3 polyinsaturés à longue chaîne a révélé être efficace pour combattre la dépression. En ce sens, une méta-analyse en double aveugle a permis de dévoiler l'efficacité de l'EPA dans la diminution des symptômes de la dépression par rapport au DHA [110], auquel il est souvent associé notamment dans les compléments alimentaires à base d'huile de poisson [88]. Toujours dans le même registre, il a été suggéré qu'un apport en EPA de 1g par jour pouvait permettre de diminuer la fréquence d'apparition de la phase dépressive chez des patients atteints de troubles bipolaires, tout en diminuant son intensité lorsqu'elle survenait [111,112].

En plus de contribuer à la baisse du ratio oméga-6/oméga-3 chez l'homme, l'EPA est à même d'apporter à la santé humaine des bénéfices qui lui sont propres. Il est donc aisé de comprendre l'intérêt de lui trouver des méthodes de production qui seraient facilement réalisables à grande échelle et durables. Les diatomées, excellentes productrices d'oméga-3 et cultivables en photobioréacteur, semblent donc avoir un avenir prometteur dans l'industrie pharmaceutique et comme productrices de compléments alimentaires.

1.4.4. Méthodes de production de l'EPA à l'heure actuelle et rendements

Actuellement la source principale d'EPA commerciale est l'huile de certains poissons marins (poissons gras comme le saumon, le thon, le maquereau,...)[88]. Cependant en plus du fait que les huiles de poisson sont souvent contaminées par des métaux lourds toxiques pour l'homme tel que le méthylmercure, la demande croissante en oméga-3 engendre des problèmes de surpêche écologiquement questionnables [113]. C'est pourquoi dans les dernières décennies l'attention des scientifiques vers une technique de production de l'EPA durable. Plusieurs études rapportent que les microalgues et notamment les diatomées sont des productrices efficaces d'oméga-3. On recense par exemple chez les diatomées marines *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia laevis*, *Odontella aurita* des taux de production d'EPA allant de 10 à 50 mg.gDW⁻¹ [32,114–117].

Une fois de plus, l'exploitation se base essentiellement sur des espèces marines malgré les contraintes liées à ces conditions de culture. Toujours grâce au milieu FDMed, Gérin *et al.* [87] ont pourtant montré que la tendance pourrait basculer à l'avenir vers la production de biocomposants à partir d'espèces d'algues d'eau douce. La souche isolée par le laboratoire de *Sellaphora minima* avait un contenu en EPA de 5,6mg.gDW⁻¹, et ce seulement dans une étude préliminaire où les conditions de culture n'avaient pas été optimisées.

2. Objectifs du mémoire

Au vu des contraintes liées à la production de fucoxanthine et d'EPA à l'heure actuelle, il semble indispensable de trouver une alternative durable et lucrative d'un point de vue commercial. Les microalgues et diatomées marines ont déjà démontré leur capacité à satisfaire la demande grandissante pour ces biocomposants, mais la culture en milieu marin restant laborieuse et coûteuse, l'étude d'espèces d'eau douce pourrait être prometteuse.

Ce mémoire faisant suite à l'étude préliminaire de Gérin *et al.* [87] sur la mise au point d'un milieu amélioré pour la culture de diatomées d'eau douce, le FDMed, nous avons utilisé les résultats obtenus alors pour tenter d'améliorer la production d'EPA et de fucoxanthine par *Sellaphora minima*.

D'une part, nous avons voulu essayer de réguler le pH en modifiant la composition et la concentration du tampon présent dans le milieu. C'est en effet l'un des paramètres qui avait le plus été affecté dans les résultats de Gérin *et al.* [87] probablement à cause de l'activité photosynthétique ayant tendance à alcaliniser le milieu.

D'autre part, bien que la littérature référence des observations très variables à ce sujet selon les espèces de diatomées, nous avons voulu tester l'effet d'un air enrichi en CO₂ (2% v/v) sur la croissance et la production d'EPA et fucoxanthine sur *S. minima*. Cette expérience ayant déjà été partiellement réalisée au laboratoire par un étudiant en stage avec un air enrichi à 5% de CO₂ (v/v), nous avons trouvé judicieux de comparer les résultats précédemment obtenus en diminuant la concentration en dioxyde de carbone tout en prolongeant le temps de culture.

Les pH et les nutriments en solution ont été prélevés régulièrement et dosés afin d'apprécier les changements s'opérant dans la composition du milieu et leur impact sur la croissance cellulaire et la production des métabolites d'intérêts. De plus, le profil pigmentaire ainsi que le contenu en acides gras ont été évalués au cours du temps, ce qui nous permettra de déterminer si les changements opérés dans les conditions de culture auront eu un impact sur la production d'EPA et de fucoxanthine.

Enfin, les résultats ont été discutés afin de les comparer à la littérature déjà existante sur le sujet, mais aussi d'évaluer quelles pourraient être les perspectives d'avenir suite à la réalisation de ce mémoire.

3. Matériel et méthode

3.1. Souche algale

La souche de *Sellaphora minima* dont il sera question dans ce mémoire a été isolée par le laboratoire lors d'une étude précédente [87]. La souche axénique a été identifiée en amplifiant et en séquençant la sous-région V4 de l'ARNr 18S selon la méthode de Zimmermann *et al.* (Amorces PCR D512for 18S et D978rev 18S)[118].

3.2. Milieux de culture

Avant leur mise en culture liquide, les souches ont été maintenues en boîtes de Pétri sur du milieu WC solidifié à l'aide d'agar 1,5% sous une faible luminosité constante ($50\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) à 25°C. Le milieu WC a été préparé tel que décrit par Guillard et Lorenzen [119]. Le milieu FDMed (Fresh Diatom Medium) dont la composition est reprise dans le **Tableau 1**, a été élaboré par Gérin *et al.* [87] En vue d'une amélioration sur la stabilité du pH de ce milieu, deux variations concernant uniquement les tampons utilisés ont été élaborées et mises en pratique. L'un des deux milieu ayant déjà été expérimenté au laboratoire et qui fera dans ce cas office de contrôle, que l'on nommera FDMed-T, a été tamponné avec du Tris-HCl 10mM à pH 7.5. L'autre milieu FDMed, que l'on nommera FDMed-P, a été tamponné avec à la fois du Tris-HCl 20mM et du PIPES 20mM. Ce dernier étant peu soluble dans l'eau, la solution stock de 200mM a dû être réalisée en dissolvant le PIPES en poudre dans du KOH 5M avant que le pH ne soit ajusté à 7.2 avec du HCl 10M. Le milieu ne contenait pas de vitamine ajoutée. Il a été stérilisé par filtration sur des membranes de 0.22 μm en polyethersulfone (PES)(PALL Corporation) et placé dans des bouteilles en polycarbonate autoclavées (121°C ; 15min) au préalable. Le verre peut réagir chimiquement avec la silice indispensable au développement des diatomées, c'est pourquoi ont été utilisées ces bouteilles faites d'un plastique doté d'une grande résistance thermique, le polycarbonate. Les éléments métalliques en solution stock concentrée 5000X et préalablement autoclavée (121°C ; 15min) ont été ajoutés sous hotte à flux laminaire après la filtration du milieu.

TABLEAU 1 : COMPOSITION DES VARIANTES DU MILIEU FDMED DU GÉRIN ET AL [87]. LA DIFFÉRENCE ENTRE LE FDMED-T ET LE FDMED-P RÉSIDE DANS LE TAMPON UTILISÉ POUR STABILISER LE PH DU MILIEU. FDMED-T : TRIS 10mM ; FDMED-P : TRIS 20mM + PIPES 20mM

Composé	Concentration mère	Volume pour 1L de milieu		Concentration finale	
		FDMed-T	FDMed-P	FDMed-T	FDMed-P
Eau distillée	-	750mL	550mL	-	-
Tris-HCL pH 7.5	1M	10mL	20mL	10mM	20mM
PIPES pH 7.2	100mM	-	200mL	-	20mM
NaNO ₃	1M	5mL		5mM	
Na ₂ SiO ₃	4,5M (Merck 105621)	1,184mL		5,33mM	
K ₂ HPO ₄	100mM	3,333mL		0,33mM	
NaHCO ₃	100mM	20mL		2mM	
H ₃ BO ₃	1mM	10mL		0,01mM	
CaCl ₂ .2H ₂ O	100mM	2,5mL		0,25mM	
MgSO ₄ .7H ₂ O	100mM	10mL		1mM	
Metals trace 5000X		200µL		1X	
MnCl ₂ .4H ₂ O	900mg.L ⁻¹				
CuSO ₄ .5H ₂ O	12,5mg.L ⁻¹				
ZnSO ₄ .7H ₂ O	110mg.L ⁻¹				
CoCl ₂ .6H ₂ O	50mg.L ⁻¹				
NaMoO ₄ .2H ₂ O	31,5mg.L ⁻¹				
Na ₃ VO ₄	90mg.L ⁻¹				
FeCl ₃ .6H ₂ O	15,75g.L ⁻¹				
Na ₂ EDTA	21,8g.L ⁻¹				
<p><i>La préparation des milieux a été réalisée sous agitation magnétique constante dans un Berlin en plastique et selon l'ordre d'ajout décrit ci-dessus.</i></p> <p><i>Le pH des milieux a été ajusté à 7,5 avec du HCl 1N.</i></p> <p><i>Le volume de 1L a été obtenu en complétant les volumes mentionnés avec de l'eau distillée.</i></p> <p><i>Le milieu a été stérilisé par filtration sur membrane de 0,22µm en PES avant l'ajout des éléments métalliques sous forme de trace préalablement autoclavés à 121°C pendant 15 minutes.</i></p> <p><i>Les solutions mères et les milieux sont conservés à température ambiante.</i></p> <p><i>La concentration molaire des métaux est reprise dans Gérin et al. [87]</i></p>					

3.3. Conditions de culture

Les diatomées ont été cultivées dans des erlenmeyers en polycarbonate contenant 100mL de milieu de culture. Elles ont été soumises constamment à une intensité lumineuse de $100\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (néons fluorescents ; Philips TL5 HO 54W/840 (MASTER)), à une température de 25°C ainsi qu’une agitation orbitale de 110rpm. Deux des quatre conditions de culture comportaient une atmosphère riche en CO₂ à hauteur de 2%. La préculture de *Sellaphora minima* a été inoculée sous hotte à flux laminaire dans du FDMed-T à l’aide d’une oëse en plastique stérile, à partir d’une culture en boîte de Pétri sur milieu WC solide. Après 14 jours de croissance pour une DO⁷⁵⁰ de 1,65, 6,25mL de la préculture ont été ajoutés aux milieux de culture liquide pour un volume total de 100mL en vue d’obtenir comme concentration de départ une DO⁷⁵⁰ de 0,1. Les deux milieux de cultures dans lesquelles les diatomées ont été inoculées sont d’une part le FDMed-T et d’autre part le FDMed-P. En tout, quatre conditions de culture différentes ont pu être appréciées, avec trois répliques biologiques indépendants pour chacune d’elles, pour un total de douze erlenmeyers. Pour résumer, il s’agissait soit d’un milieu FDMed-T, soit d’un milieu FDMed-P, avec une atmosphère enrichie en CO₂, ou non (**Tableau 2**). Toutes les cultures ont été stoppées après 15 jours, même dans le cas où la phase plateau n’a pas été atteinte (malheureusement la culture a dû être interrompue prématurément à cause du début du confinement lors de la pandémie du SARS-CoV2).

TABLEAU 2 : CONDITIONS DE CULTURE EXPÉRIMENTALES DIVERGEANT D’UNE PART PAR LE TAMPON UTILISÉ POUR LA STABILITÉ DU MILIEU, D’AUTRE PART PAR SI L’AIR A ÉTÉ ENRICHI EN CO₂. A (BLEU) : FDMED-T (TRIS 10MM) / AIR ; B (ORANGE) : FDMED-P (TRIS 20MM + PIPES 20MM) / AIR ; C (JAUNE) FDMED-T (TRIS 10MM) / CO₂ 2% (v/v) ; D (VERT) FDMED-P (TRIS 20MM + PIPES 20MM) / CO₂ 2% (v/v).

		Tampon du milieu FDMed	
		Tris 10mM	Tris 20mM + PIPES 20mM
Gaz	Air	A	B
	2%CO2	C	D

3.4. Évaluation de la croissance cellulaire

L'absorbance des cultures à 750nm a été mesurée quotidiennement au spectrophotomètre UV-visible (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) dans des cuvettes avec un trajet optique de 1 cm pour la détermination de la DO^{750} . Des dilutions ont parfois été réalisées afin que les valeurs d'absorbance mesurées à 750nm soient comprises entre 0,05 et 0,3 pour garantir la linéarité de la loi de Beer-Lambert. Quand la DO^{750} a atteint une valeur d'absorbance d'environ 2, la concentration en biomasse sèche a été déterminée. Cette mesure a permis d'établir un ratio $R = \text{biomasse}/A^{750}$ qui a pu être utilisé pour convertir les valeurs d'absorbance en biomasse sèche durant les 15 jours de culture à l'aide de l'équation suivante :

$$R \cdot A750 \text{ (mesurée)} = \text{biomasse sèche (g.L}^{-1}\text{)}$$

Pour déterminer la concentration en biomasse sèche, 25mL de culture ont été prélevés dans des Falcon™ de 50mL. Les échantillons ont été centrifugés à 3000g pendant 3 minutes avant d'être lavés dans de l'eau distillée puis centrifugés à nouveau dans les mêmes conditions. L'étape de lavage avait pour but d'éliminer les sels et les éventuels produits de sécrétion des algues présents dans le milieu de culture. Le surnageant a alors été éliminé et le culot resuspendu dans 1 mL d'eau distillée puis séché à 70°C pendant 24h dans une coupelle en aluminium préalablement tarée. Les productivités en termes de biomasse sèche par unité de volume et par jour ($\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$) ont été calculées de deux manières différentes : soit comme la pente des graphiques depuis le jour 0 jusqu'au jour où le taux maximal de biomasse a été atteint ; soit comme le gain de biomasse d'un jour par rapport au précédent, et ce tout au long de la culture, selon le calcul suivant :

$$V_{max} = \frac{\text{Biomasse2}(\frac{\text{g}}{\text{L}}) - \text{Biomasse1}(\frac{\text{g}}{\text{L}})}{\text{Jour2} - \text{Jour1}}$$

3.5. Détermination du contenu et de la productivité en fucoxanthine

À partir du premier jour, 2mL de chaque culture ont été prélevés dans des tubes Eppendorf deux fois par semaine avant d'être centrifugés à 16000g pendant 4 minutes et de stocker le culot d'algues à -20°C. Ils ont ensuite été décongelés puis resuspendus dans 500µL d'éthanol absolu avant d'être soumis à une agitation horizontale intense de 25Hz pendant 15 minutes (Tissue Lyser II, Qiagen) en présence de billes de verre de 0,75 à 1mm de diamètre dans le but de casser les cellules. Les échantillons ont été transvasés dans un nouveau tube (élimination des billes) et centrifugés à 16000g pendant 3 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Les pigments extraits ont été filtrés sur une membrane en PTFE de 0,22µm (VWR) permettant d'écartier les éventuels fragments insolubles restants. La concentration en fucoxanthine a été évaluée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Shimadzu) en phase inverse (C18)

(Nova-Pak silica column, 3.9 x 150 mm, 4µm particle size, Waters) couplée à un détecteur à photodiodes (PDA, Shimadzu). Les analyses ont été réalisées à 25°C avec un débit de 1mL.min⁻¹ pour un volume d'injection de 30µL, d'après un protocole en mode gradient précédemment décrit dans la littérature et impliquant trois solvants : A (méthanol 80%, CH₃COONH₄ 100mM), B (acétonitrile 90%) et C (acétate d'éthyle 100%)[87,120]. Le dosage quantitatif de la fucoxanthine a été réalisé en mesurant l'absorbance de l'éluat à 430nm grâce à un standard de calibration commercial de DHI Lab Products (référence PPS-FUCO). Les résultats ont permis de déterminer la concentration en fucoxanthine dans les cultures (mg_{fucoxanthine}.L⁻¹), ainsi que la teneur des algues en biomasse sèche (mg_{fucoxanthine}.gDW⁻¹). Les productivités volumétriques de fucoxanthine (mg_{fucoxanthine}.L⁻¹.j⁻¹) comme le gain de fucoxanthine d'un jour par rapport au précédent, et ce tout au long de la culture, ont été déterminées selon le calcul suivant :

$$\frac{Fucoxanthine_2\left(\frac{mg}{L}\right) - Fucoxanthine_1\left(\frac{mg}{L}\right)}{Jour_2 - Jour_1}$$

3.6. Détermination du contenu et de productivité en EPA

L'extraction des lipides a été réalisée suivant une méthode élaborée par Bligh et Dyer [121] à laquelle ont été apportées certaines modifications. À partir du premier jour, 2mL de chaque culture ont été prélevés dans des tubes Eppendorf deux fois par semaine puis centrifugés à 16000g pendant 4 minutes avant d'en stocker le culot à -20°C. La technique d'extraction consistait à décongeler et resuspendre les culots dans 500µL d'une solution de chloroforme-méthanol 2 :1 servant de solvant d'extraction. Ils ont été agités vigoureusement et horizontalement à 25Hz pendant 5 minutes (Tissue Lyser II, Quiagen) en présence de billes de verre de 0,75 à 1mm de diamètre dans le but de casser les cellules. Suite à cela, ils ont été vortexés pendant 15 minutes, transvasés dans de nouveaux tubes pour éliminer les billes, et centrifugés à 16000g pendant 3 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. 300µL d'extraits lipidiques ont été adjoints à 700µL de NaCl 0,9% et vigoureusement vortexés. Après une étape supplémentaire de centrifugation à 16000g pendant 3 minutes, la phase la moins dense constituée d'un mélange méthanol-eau a été écartée. La phase la plus dense contenant le chloroforme et les lipides a été transvasée dans des vials en verre et laissés à bouchon ouvert sous une hotte chimique et à température ambiante jusqu'à son évaporation totale. Cette étape nous permet d'obtenir un extrait sec des lipides. Les acides gras ont été transestérifiés en les mettant en présence de 1mL de réactif de méthylation (HCl 3N méthanolique 33%, méthanol 67%, hydroxytoluène butylé 10µg.mL⁻¹) pendant 1 heure à 70°C dans le but de générer des esters méthyliques d'acides gras (FAMES, Fatty Acid Methyl Esters). Les composés insolubles résiduels ont été ôtés du mélange grâce à une étape de centrifugation à 16000g pendant 3 minutes après laquelle seul a été

récupéré le surnageant. 200µL d'une solution d'heptane ont été ajoutés aux échantillons contenant les FAMES qui ont ensuite été vigoureusement vortexés pendant 3 minutes puis centrifugés à nouveau pendant 3 minutes à 16000g. La phase liquide la moins dense contenant l'heptane et les FAMES a été gardée dans de nouveaux tubes. La procédure d'extraction à l'heptane précédemment décrite a été répétée une fois avec la phase la plus dense contenant le réactif de méthylation pour une récupération optimale des FAMES. La concentration en EPA méthylé a été obtenue par séparation en chromatographie en phase gazeuse avec une colonne SGE (30m x 0,25mm (ID : BPX70 x 0.25µm) en utilisant un gradient de température de 120 à 240 °C d'un débit de 4°C/min et avec de l'hélium comme gaz porteur. Lors de l'analyse, l'échantillon a été injecté en mode split : 1 µL d'échantillon est injecté et le ratio de split est de 10. L'appareillage GC est pourvu d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'aire du pic d'EPA de chaque échantillon a été utilisée pour calculer la concentration en EPA à l'aide d'un standard de calibration commercial de Sigma-Aldrich (Supelco 37 component FAMES mix). Les données fournies par les chromatogrammes ont chaque fois permis de déterminer la concentration en EPA par rapport à la biomasse mais également en termes de productivité volumétrique, à l'instar de la fucoxanthine, comme expliqué au point précédent.

3.7. Dosage des nitrates, phosphates et silicates

2mL de chaque culture ont été prélevés dans des tubes Eppendorf deux fois par semaine puis centrifugés à 16000g pendant 4 minutes et le surnageant a ensuite été stocké à -20°C. Les échantillons ont été décongelés et filtrés sur une membrane en PES de 0,22µm afin d'éliminer les éventuels débris cellulaires insolubles.

Le dosage colorimétrique des nitrates est basé sur une méthode élaborée par Cataldo *et al.* [122,123] et réalisé sur plaque 96 puits. 10µL de milieu de culture ont été incubés 20 minutes avec 20µL d'acide salicylique 2,5% dissouts dans de l'H₂SO₄ 98%, avant d'être neutralisés par 250µL d'une solution de NaOH 3,8M. L'absorbance a été mesurée à 405nm avec un lecteur de microplaques 96 puits Synergy MX (BioTek). Des solutions standards comprises dans un intervalle de concentration allant de 0,5mM à 3,0mM ont permis de tracer la courbe de calibration.

Le dosage colorimétrique des phosphates et des silicates ont quant à eux été adaptés d'après une méthode décrite par Galhardo et Masini [124] pour une utilisation sur plaque 96 puits mettant en œuvre les réactifs suivants : le réactif A ((NH₄)₂MoO₄ 10mM dans du HNO₃ 200mM), le réactif B (acide ascorbique 2% et

tartrate d'antimoine et de potassium $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), le réactif C ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 5mM et acide oxalique 0,25% dans du HNO_3 200mM) et le réactif D (acide oxalique 10%).

Les phosphates tout comme les silicates présentent des propriétés chimiques assez similaires rendant leur dosage relativement complexe lorsqu'ils se trouvent ensemble en solution. La méthode utilisée se base sur leur réactivité commune à former avec le molybdate d'ammonium du phosphomolybdate et du silicomolybdate (12MoVI), tous deux de couleur jaune. En présence d'acide ascorbique et de tartrate d'antimoine et de potassium permettant d'accélérer la réaction, ces composés seront alors réduits les amenant à colorer la solution mesurable au spectrophotomètre en bleu. Le problème réside dans le fait que si l'on veut mesurer seulement les phosphates il faut annihiler les interférences du silicate et vice-versa.

Expérimentalement pour le dosage des phosphates, $62,5\mu\text{L}$ de milieu de culture filtrés ont été ajouté à $125\mu\text{L}$ de réactif B et $125\mu\text{L}$ de réactif C. La courbe de calibration a été tracée à l'aide de solutions standards de K_2HPO_4 de concentrations allant de $0,01\text{mM}$ à $0,35\text{mM}$. Dans ce cas, le fait de travailler à pH acide (HNO_3 en forte concentration) confère une certaine instabilité au silicomolybdate affectant sa cinétique de formation. De plus, l'ajout d'acides organiques en faible concentration dès le départ (acide oxalique, acide tartrique) permettent une séquestration du MoVI causant également un ralentissement de la cinétique de formation du silicomolybdate. Si le dosage est effectué rapidement (endéans 30 minutes après l'ajout du dernier réactif), la concentration en silicomolybdate dans le milieu peut être considérée comme négligeable, ce qui permet un dosage uniquement des phosphates.

Pour le dosage des silicates, $15\mu\text{L}$ d'échantillon ont été premièrement incubés pendant 5 minutes avec $26\mu\text{L}$ de réactif A avant d'ajouter au total $62\mu\text{L}$ de réactif D pour une deuxième incubation de 5 minutes. Après ces deux étapes d'incubation, $103\mu\text{L}$ de réactif B furent ajoutés au tout. Des solutions standards de Na_2SiO_3 de concentrations comprises entre $0,05\text{mM}$ et $1,5\text{mM}$ ont servis à tracer la courbe de calibration. Ici le silicomolybdate et le phosphomolybdate apparaissent en même temps avec l'ajout de molybdate d'ammonium. Cependant une forte concentration d'acide oxalique va mener à la dégradation du phosphomolybdate en phosphate et molybdooxalate, et ce sans affecter le silicomolybdate, permettant un dosage de ce dernier sans interférence.

Les valeurs d'absorbance pour les dosages du phosphate et du silicate ont été dans les deux cas mesurées à 660nm par le lecteur de microplaques Synergy MX (BioTek).

4. Résultats

4.1. Définition des conditions opératoires pour les cultures d'algues

Nous avons étudié les paramètres de croissance, de production de fucoxanthine et d'EPA, et de consommation en nutriments chez la diatomée d'eau douce *Sellaphora minima* dans 4 conditions distinctes, listées dans le **Tableau 2** (section 3. matériel et méthode). Comme indiqué dans ce dernier, nous avons caractérisé ces paramètres en modulant d'une part la concentration en CO₂, et d'autre part la nature et la concentration du/des tampon(s) utilisé(s) pour limiter les fluctuations de pH au cours des cultures. Quatre conditions ont ainsi été testées, étiquetées A à D selon la combinaison CO₂-tampon.

L'influence de la concentration en CO₂ (concentration atmosphérique ou 2%, connue pour saturer la photosynthèse) a été étudiée dans l'hypothèse, plus que pertinente au vu de l'état de l'art dans le domaine [28,31–33], où l'adjonction de CO₂ saturant permettrait d'accélérer la croissance algale en évitant toute limitation en carbone inorganique au cours de la culture.

L'influence de deux « conditions tampons » (Tris 10 mM seul ou Tris 20 mM + PIPES 20 mM) a, quant à elle, été caractérisée afin d'en évaluer l'efficacité respective sur la limitation des fluctuations de pH. Dans des cultures de microalgues conduites sous air, il est classique d'observer une alcalinisation de la culture au fil du temps pouvant s'avérer délétère pour la croissance des diatomées [125,126], raison pour laquelle le Tris (pKa=8,3) a dans tous les cas été employé pour tamponner le milieu de culture (pH=7,5 initialement) et éviter que des valeurs de pH trop élevées que pour être tolérées ne soient atteintes. Le PIPES (pKa=6,8) a, quant à lui, été additionné au Tris de manière à limiter l'acidification du milieu qui survient classiquement suite à l'adjonction de CO₂ saturant dans les cultures. Des résultats préliminaires conduits au laboratoire sous CO₂ 5% avaient déjà indiqué que l'acidification du milieu concomitante serait un facteur qui limiterait significativement l'accumulation de biomasse. Au vu de l'influence majeure du pH sur la croissance algale, il nous a semblé intéressant de modifier non seulement la nature de la solution tampon utilisée, mais également d'accroître la concentration de ses constituants de manière à stabiliser au maximum le pH au cours de nos cultures batch.

4.2. Croissance

4.2.1. Courbes de croissance et influence du pH

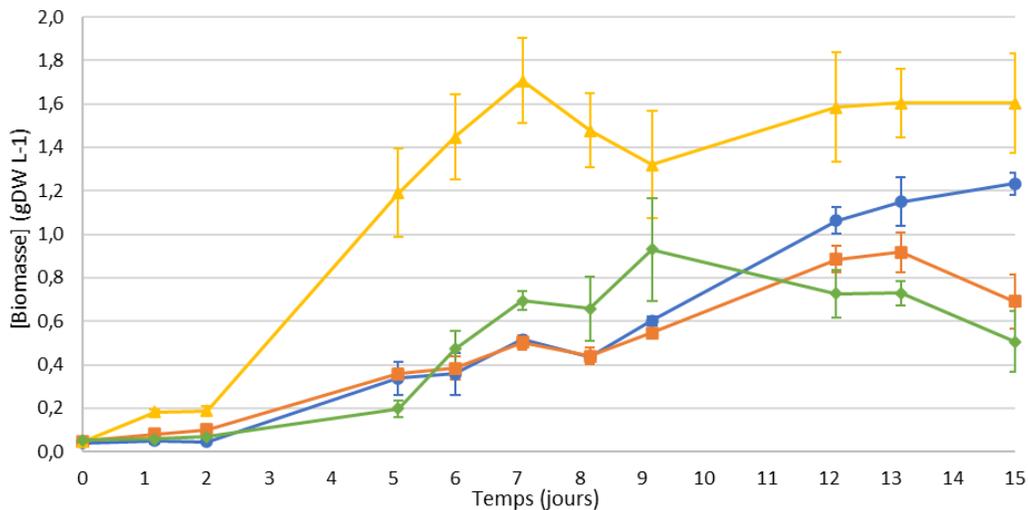


FIGURE 9 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DANS LES CULTURES (MG L⁻¹) DE *S. MINIMA* EN FONCTION DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). DW (DRY WEIGHT), MASSE SÈCHE. VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

Dans toutes les cultures (**Fig. 9**), d'une durée totale de 15 jours, on observe une phase de latence d'au moins 48h avant le début de la phase exponentielle. S'ensuivent une phase linéaire de croissance puis une phase plateau, voire de déclin plus ou moins précoce selon la condition étudiée, et qui n'a pas pu être observée pour la condition A (Air / Tris 10 mM). Même si dans ce dernier cas la croissance semblait continuer, la culture a dû être arrêtée à cause du début du confinement survenu lors de l'épidémie du Sars-CoV2. Cependant, il est possible d'extrapoler la tendance que cette courbe aurait pu avoir par la suite, puisque cette condition utilisée ici en guise de contrôle est la même que celle étudiée dans l'étude de Gérin *et al.* [87] sur une durée de 21 jours.

Le pH des conditions A et B (algues cultivées sous air) augmente graduellement au cours de la culture, comme classiquement observé en l'absence d'adjonction de CO₂, et ce de manière plus marquée en présence de Tris 10 mM que de Tris 20 mM + PIPES 20 mM (**Fig. 10**). Ce résultat était attendu dans la mesure où l'accroissement de la concentration en Tris (pKa = 8,3) s'accompagne d'une augmentation du pouvoir tampon dans la zone de pH proche du pKa, qui est précisément celle où se situent les cultures d'algues. Malgré l'écart de pH important entre les deux conditions (en fin de culture, pH=8,8 sous Tris 10 mM, conformément à ce qui avait été observé par Gérin *et al.* [87], et 8,1 sous Tris 20 mM + PIPES 20 mM),

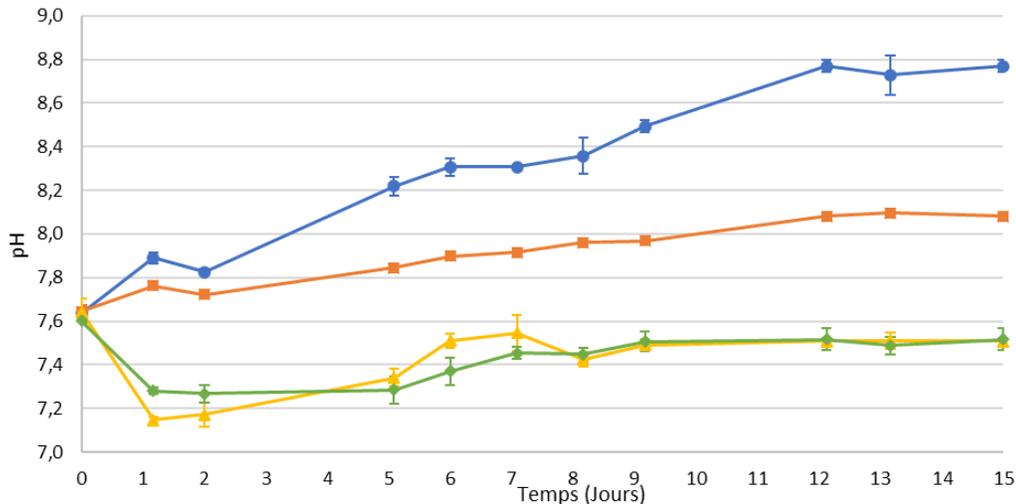


FIGURE 10 : ÉVOLUTION DU pH DANS LES CULTURES DE *S. MINIMA* EN FONCTION DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

les courbes de croissance se superposent jusqu'au jour 8, à partir duquel un ralentissement, puis un déclin de croissance sont observés en présence de Tris 20 mM + PIPES 20 mM, peut-être causés par un effet inhibiteur lié aux fortes concentrations en tampon utilisées. Il est peu plausible que ce ralentissement et ce déclin soient un effet délétère du pH en lui-même, ce dernier se rapprochant à ce stade de plus en plus de la valeur optimale de 8,5 qui caractérise les diatomées [125,126]. A noter qu'il pourrait être intéressant, pour la culture de *S. minima* sous air, de tester le Tris 20 mM (sans PIPES) en guise de tampon de manière à limiter davantage que sous Tris 10 mM la montée de pH, la montée de ce dernier aux alentours de 9 ayant pour effet de fortement diminuer les rendements de croissance [125,126].

Quant au pH des conditions C et D (algues cultivées sous CO₂ 2%), il reste relativement constant tout au long de l'expérience (entre 7,2 et 7,5 si l'on excepte le point zéro de lancement des cultures) et ne varie pas selon la solution tampon. On peut émettre l'hypothèse qu'en présence de CO₂ 2%, la concentration en CO₂ dissout n'est pas suffisamment élevée que pour induire la nécessité d'ajouter au Tris un autre tampon, en l'occurrence du PIPES 20 mM, dont le pKa (6,8) se situe davantage dans la zone de pH qui caractérise les cultures sous CO₂ 2%. Les résultats suggèrent que le Tris, dont le pKa (8,3) est certes plus éloigné de cette zone de pH, suffit, à hauteur de 10 mM, à limiter la descente de pH consécutive à l'adjonction du CO₂. Ces résultats varient sensiblement par rapport aux expériences préliminaires qui avaient été menées sous CO₂ 5% : la descente de pH consécutive à l'adjonction de CO₂ était alors plus forte en présence de Tris 10 mM qu'en présence de Tris 20 mM + PIPES 20 mM (pH autour de 6,5 contre 7,0, respectivement). Réduire la teneur en CO₂ de 5 à 2% (une concentration qui reste saturante pour la

photosynthèse) nous paraît donc une stratégie efficace pour limiter la baisse de pH même en présence de Tris 10 mM seul.

Si elle ne montre pas d'influence sur le pH, la composition du tampon exerce un effet très marqué sur la croissance dans les cultures sous CO₂ 2% (croissance nettement amoindrie en présence de Tris 20 mM + PIPES 20 mM), suggérant, de façon encore plus évidente que pour les cultures sous air, un possible effet inhibiteur de ce cocktail de tampons sur la croissance algale.

4.2.2. Concentrations maximales en biomasse

Pour *S. minima* exactement dans les mêmes conditions que la culture A, après 21 jours, alors que la phase plateau ne semblait pas encore atteinte, Gérin *et al.* [87] étaient arrivés à une concentration en biomasse sèche de 1,71g.L⁻¹. Dans cette même étude ils mesuraient après 15 jours de croissance une concentration en biomasse sèche d'environ 1,3g.L⁻¹, tandis que dans le cadre de ce mémoire en fin de culture, nous obtenions une concentration de 1,23g.L⁻¹. Contrairement aux autres cultures, nous étions donc loin d'être parvenus à la densité cellulaire maximale atteignable sous ces conditions (Tris 10mM ; Air).

Pour les conditions B et D, toutes deux tamponnées par la combinaison Tris 20 mM + PIPES 20 mM, les concentrations maximales en biomasse sèche sont similaires et s'élèvent à 0,93g.L⁻¹. La différence réside dans le fait que dans la condition D (CO₂ 2%), ce maximum est atteint quatre jours plus tôt que dans la condition B (Air)(jour 9 d'une part et jour 13 d'autre part). Le résultat obtenu reste néanmoins, dans ces conditions, significativement moindre que dans la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM), révélant un possible effet d'inhibition de la solution tampon sur la croissance comme déjà mis en évidence chez plusieurs microalgues [127,128], et notamment et chez la diatomée marine *Skeletonema costatum* cultivée en présence de Tris 20mM [129]. Il reste néanmoins difficile de se prononcer, sur base de ces seuls résultats, sur la cause précise de cet apparent effet néfaste du tampon.

La condition C (CO₂ 2% / Tris 10 mM), quant à elle, est celle qui génère la plus importante accumulation de biomasse (maximum de 1,71g.L⁻¹ atteint au jour 7 soit plus de 3-fois la valeur du contrôle au même moment) Il est intéressant de noter que cette valeur correspond à celle retrouvée dans l'étude de Gérin *et al.* [87] après 21 jours de culture dans la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM). Nos résultats indiquent donc que, lorsque le milieu est tamponné avec du Tris 10 mM, une concentration maximale en biomasse d'environ 1,7 g.L⁻¹ est atteinte trois fois plus vite sous CO₂ 2% que sous air.

En regard de ces différents résultats, il apparaît que l'adjonction de CO₂ 2% permet d'atteindre la concentration maximale en biomasse plus rapidement, et ce quelles que soient les conditions tampon.

4.2.3. Productivités biomassiques

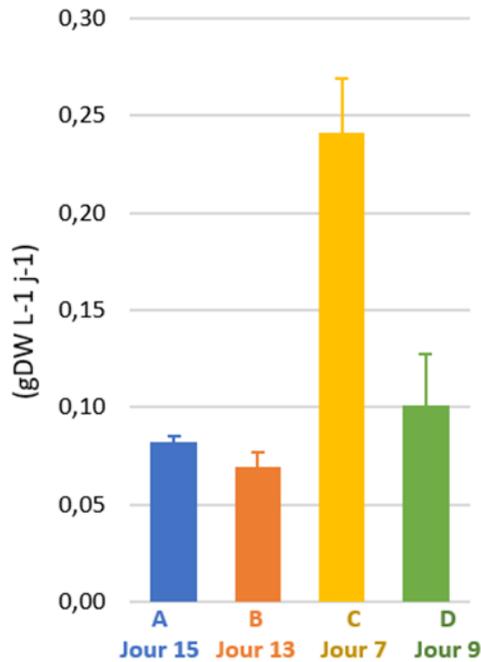


FIGURE 11 : PRODUCTIVITÉ CALCULÉE COMME LA BIOMASSE SÈCHE MAXIMALE OBSERVÉE DANS LA CULTURE DIVISÉE PAR LE NOMBRE DE JOURS ENTRE L'OBSERVATION ET LE DÉBUT DE LA CULTURE (EXPRIMÉ DANS LES BULLES ATTACHÉES AUX BARRES DE L'HISTOGRAMME)(gDW L⁻¹ j⁻¹). VALABLE POUR *S. MINIMA* SELON QUATRE CONDITIONS ; A (BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). DW (DRY WEIGHT), MASSE SÈCHE. VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

Comme expliqué dans la section « matériel et méthode », la productivité biomassique a été calculée de deux manières différentes. Si l'on définit cette dernière comme le quotient entre la concentration maximale en biomasse et le nombre de jours mis pour l'atteindre (**Fig. 11**), c'est dans la condition C qu'elle est la plus élevée (0,241 ± 0,028 g.L⁻¹.j⁻¹). Le fait que les autres conditions obtiennent des productivités environ 2,5-fois moindres n'est pas étonnant en regard des résultats de

croissance énoncés ci-dessus. Il faut préciser que ce paramètre n'est pas représentatif de la productivité « en direct » dans la culture, mais constitue un bilan global (en d'autres termes, une sorte de moyenne) de la concentration en biomasse qui a pu être accumulée par unité de temps au cours de la culture. Puisque nous travaillons en système batch, ce paramètre est susceptible de dépendre directement de limitations en nutriments qui peuvent survenir et générer l'arrêt de la croissance, un point qui sera discuté en détails ci-dessous. Il ne nous semble donc que modérément informatif puisqu'il n'apporte aucune information nouvelle par rapport à celles déjà illustrées dans la **Figure 9**.

Bien que cette donnée soit (étonnamment) moins répandue dans la littérature, il nous paraît intéressant et bien plus représentatif de relater la productivité « en direct » dans la culture, définie comme la fluctuation de la concentration en biomasse sèche en fonction du temps (soit la dérivée de la **Figure 9**) (**Fig. 12**). Il est ainsi possible de caractériser la productivité maximale (que nous appellerons V_{max}) dans chacune des conditions testées, ainsi que le moment où celle-ci est atteinte. Cette valeur est une donnée particulièrement importante, puisqu'elle pourrait servir de base à des expériences visant à conserver (dans un contexte de système continu) les cultures dans des conditions opératoires optimales de manière à maintenir V_{max} sur un laps de temps substantiel (et non plus ponctuel comme ici).

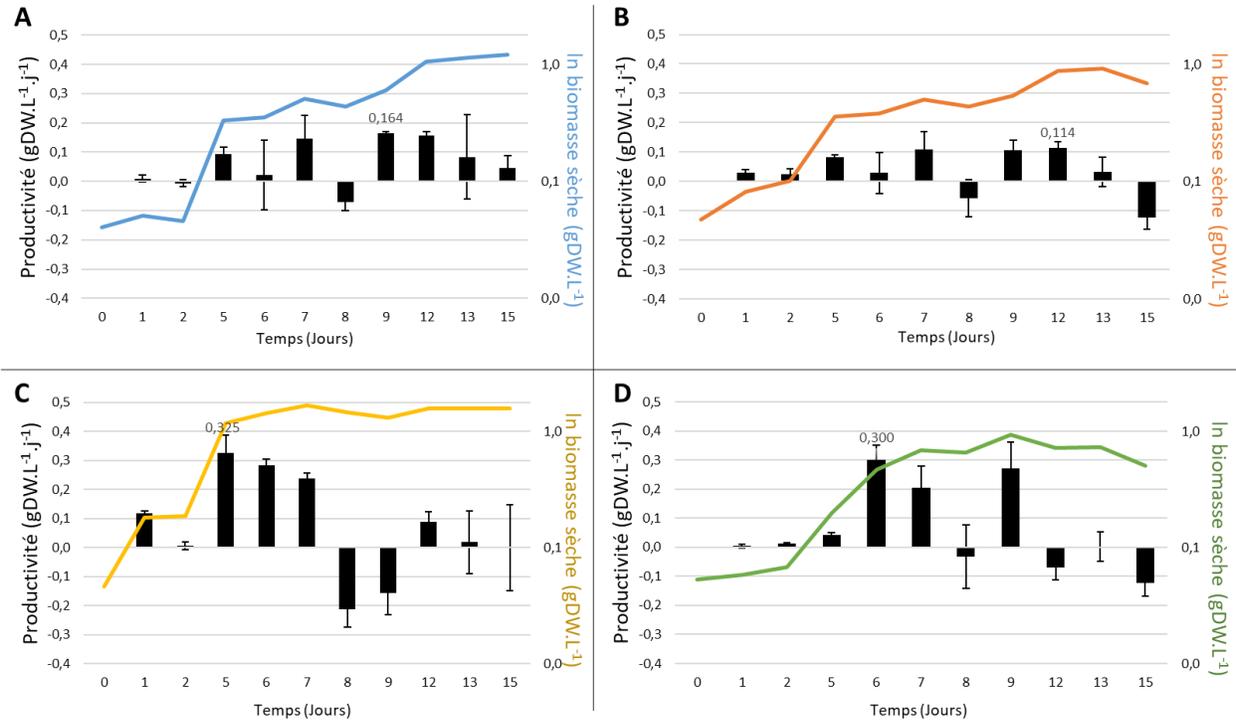


FIGURE 12 : AXE PRINCIPAL : FLUCTUATION DE LA BIOMASSE SÈCHE EN FONCTION DU TEMPS (BARRES NOIRES)(gDW L⁻¹ j⁻¹). AXE SECONDAIRE : LOGARITHME NÉPÉRIEN DE LA BIOMASSE SÈCHE (TRAITS PLEINS COLORÉS)(gDW L⁻¹). VALABLE POUR *S. MINIMA* SELON QUATRE CONDITIONS ; A (BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). POUR CHAQUE CONDITION (A, B, C, D) LA VALEUR AFFICHÉE EN NOIR AFFICHE LA VALEUR MAXIMALE OBSERVÉE (V_{MAX}). DW (DRY WEIGHT), MASSE SÈCHE. VALEURS ET BARRES D'ERREURS DE L'AXE PRINCIPALE, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3). VALEURS ET BARRES D'ERREURS DE L'AXE SECONDAIRE, LOGARITHME NÉPÉRIEN DES MOYENNES (N=3).

Sur le graphique (Fig. 12), on s'aperçoit que V_{max} est plus élevée et plus rapidement atteinte dans les conditions C et D enrichies en CO₂. Les valeurs respectives sont $0,325 \pm 0,061 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ entre les jours 2 et 5 pour la condition C (Tris 10 mM), et $0,300 \pm 0,051 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ entre les jours 5 et 6 pour la condition D (Tris 20 mM + PIPES 20 mM). Ces moyennes significativement différentes ($p < 0,01$) indiquent, comme déjà évoqué précédemment, une vitesse de croissance accrue en présence de Tris 10mM plutôt qu'en présence de Tris 20mM + PIPES 20mM.

Dans les conditions A et B (algues cultivées sous air), la productivité est relativement constante entre les jours 5 et 12 et atteint des maximaux aux jours 9 et 12, respectivement. La condition A (contrôle, Tris 10 mM) montre un V_{max} de $0,164 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et la condition B (Tris 20 mM + PIPES 20 mM) un V_{max} de $0,114 \pm 0,020 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (différence significative, $p < 0,01$). En comparant le résultat de productivité obtenu dans la condition A avec ce que Gérin *et al.* [87] avaient observé (V_{max} de $0,147 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ au 12^e jour), on se rend compte que le maximum arrive plus tôt dans notre cas, mais aussi qu'il est légèrement plus élevé.

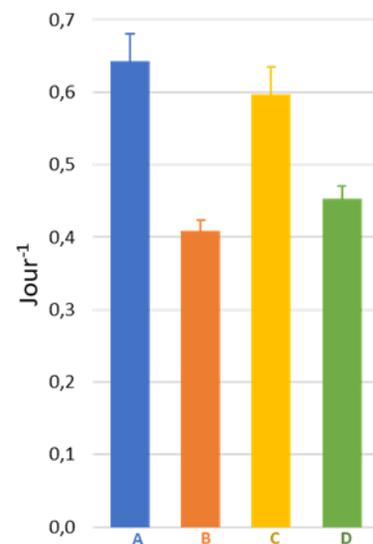
Malgré tout cette différence n'est pas très marquée, surtout sachant que les expériences ont été réalisées par deux opérateurs différents à deux ans d'intervalle.

En résumé, c'est dans les cultures supplémentées en CO₂ 2% que les valeurs de V_{max} sont les plus élevées et atteintes le plus rapidement. Quelle que soit la concentration en CO₂, ce V_{max} s'avère plus faible en présence de Tris 20 mM + PIPES 20 mM par rapport au Tris 10 mM seul.

4.2.4. Taux de croissance en phase exponentielle

FIGURE 13 : TAUX DE CROISSANCE (μ) CALCULÉ COMME LA PENTE DU LOGARITHME NÉPÉRIEN DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE ENTRE LES JOURS 2 ET 5 (J^{-1}). VALABLE POUR *S. MINIMA* SELON QUATRE CONDITIONS ; A (BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). DW (DRY WEIGHT), MASSE SÈCHE. VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES \pm ÉCARTS-TYPES (N=3).

Dans chaque condition expérimentale, le graphique du logarithme népérien de la concentration en biomasse en fonction du temps a été dressé de manière à repérer la phase exponentielle de croissance (zone linéaire du graphique)(Fig. 12). Cette dernière semble être localisée entre les jours 2 et 5 pour toutes les conditions, conformément à ce qui avait été établi pour la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM) par Gérin *et al.* [87] (même si, dans cette étude, elle semblait tout de



même se prolonger jusqu'au jour 7). Il est à noter que l'absence de points expérimentaux entre les jours 2 et 5 est à déplorer, manquement qui aurait pu être pallié par la collecte de données additionnelles si la crise sanitaire n'avait pas limité l'accès aux laboratoires. Le caractère linéaire de la zone située entre les jours 2 et 5 aurait ainsi pu être rigoureusement confirmée, ce qui n'a malheureusement pas pu être fait.

Malgré la durée très limitée de la phase exponentielle par rapport à l'ensemble de l'expérience (15 jours), il nous semble opportun de détailler les taux de croissance (μ) comme classiquement dans les publications portant sur l'étude de la croissance des microalgues (Fig. 13). Ce paramètre a été calculé comme la pente du graphique entre les jours 2 et 5. Les résultats montrent une valeur proche de $0,6j^{-1}$ pour les conditions A et C (cultures tamponnées par du Tris 10 mM) et de $0,4j^{-1}$ pour les conditions B et D (cultures tamponnées par du Tris 20 mM + PIPES 20 mM). Le taux de croissance obtenu pour la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM) concorde avec celui rapporté par Gérin *et al.* [87] ($0,55j^{-1}$). D'après ces résultats, il semble que le taux de croissance en phase exponentielle dépende uniquement de la nature du tampon, mais pas de la teneur en CO₂. Ceci suggère de nouveau un effet inhibiteur du Tris 20 mM + PIPES 20 mM sur la croissance

algale, effet dont les causes ne peuvent être élucidées sur base de ces seuls résultats. Ils valident également le fait qu'en début de culture (lorsque la densité cellulaire est encore faible), le CO₂ n'est pas limitant pour la croissance. Si tel avait été le cas, des taux de croissances significativement différents auraient été mesurés selon que les algues sont cultivées sous air ou sous CO₂ 2%.

4.2.5. Microscopie optique

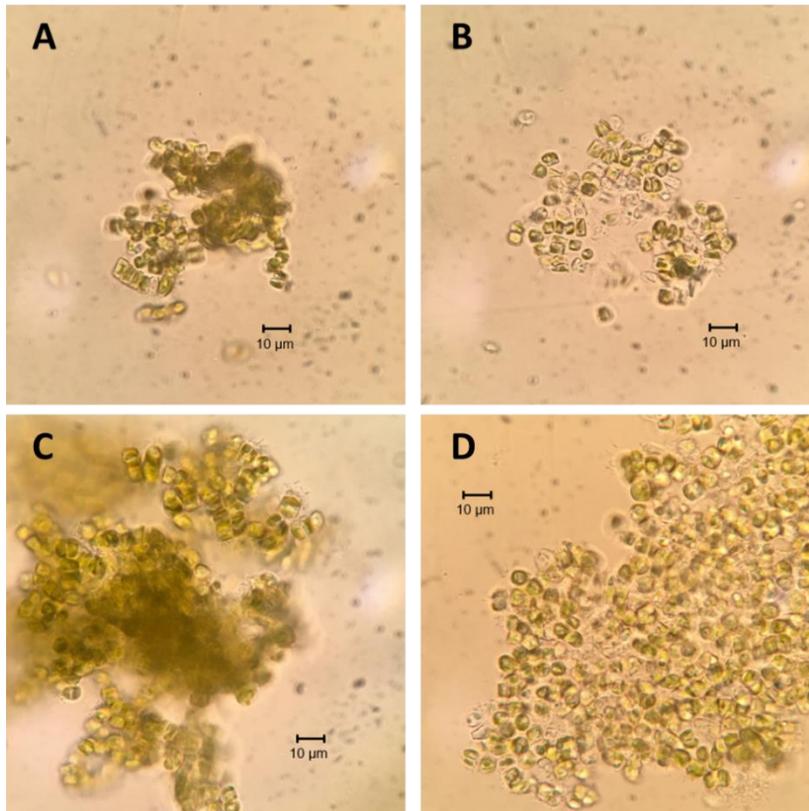


FIGURE 14 : PHOTOS DE *SELLAPHORA MINIMA* AU MICROSCOPE OPTIQUE SELON QUATRE CONDITIONS ; A : TRIS 10MM / AIR, B : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). NIVEAU DE ZOOM DU MICROSCOPE, 100X. PRISE DES PHOTOS AU 7^E JOUR DE CULTURE.

Les cultures ont été observées au microscope optique en début de phase linéaire de croissance (jour 7) (**Fig. 14**). Il est intéressant de constater que les algues paraissent présenter des propriétés d'agrégation, des morphologies et des teneurs en pigments (se traduisant par une fluctuation de la coloration) distinctes selon les

conditions expérimentales. En particulier, l'agrégation semble davantage prononcée dans la condition C (CO₂ 2% / Tris 10 mM) par rapport aux trois autres. Cette observation concorde avec la mise en évidence, au cours de ce mémoire, de propriétés de diffraction de la lumière sensiblement différentes dans cette condition (rapport biomasse / absorbance à 750 nm de 1,250 dans la condition C contre 0,399, 0,589 et 0,335 dans les conditions A, B et D). Il est à noter que la quantité de cellules présentes sur l'image n'est pas à prendre en considération comme facteur de comparaison, la concentration algale chargée dans le microscope n'ayant pas été standardisée entre les différentes conditions. En complément des résultats de croissance, ces résultats démontrent la grande influence qu'exercent les conditions testées, et en particulier la teneur en CO₂, sur la physiologie cellulaire des diatomées.

4.3. Dosage des nutriments

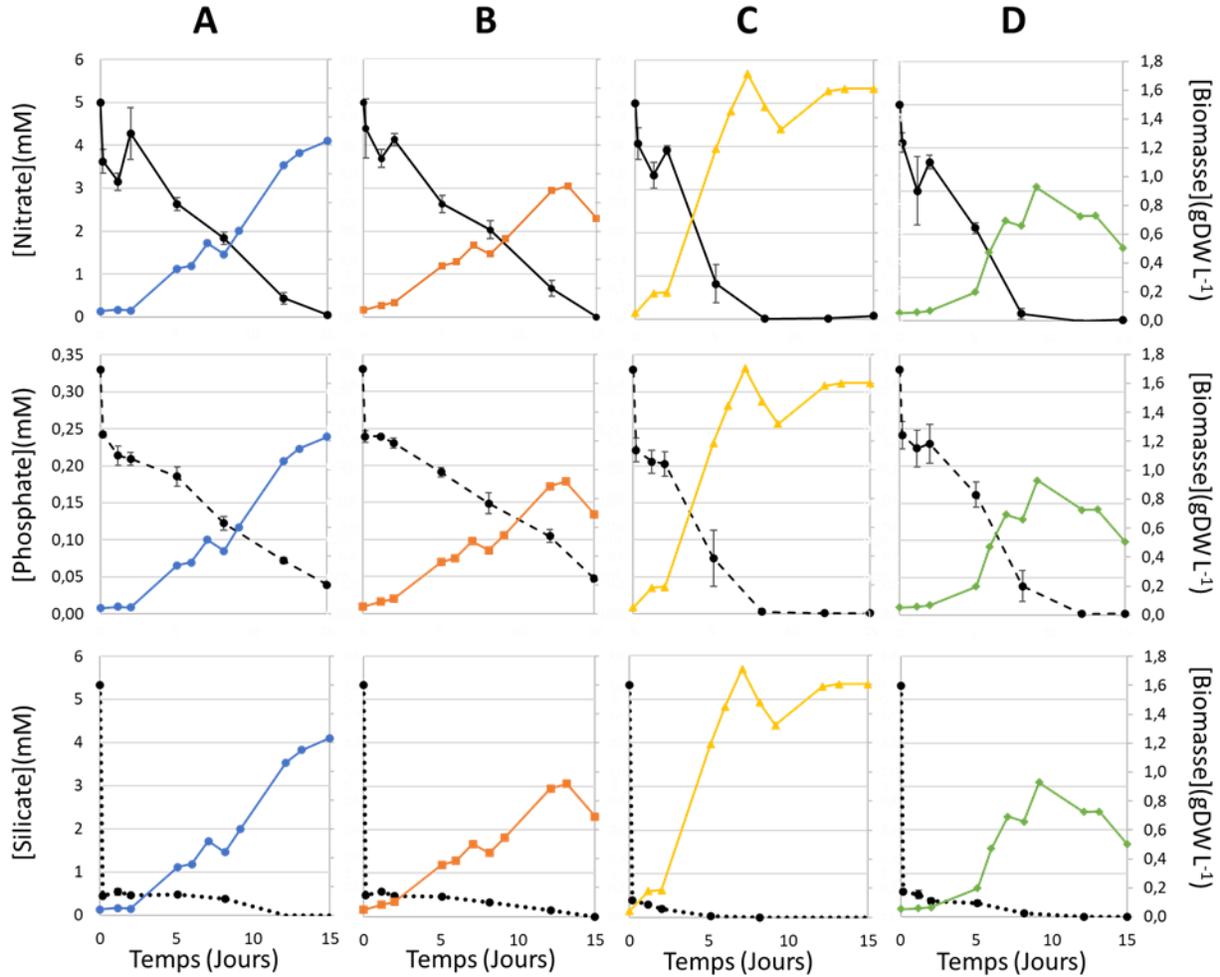


FIGURE 15 : AXE PRINCIPAL : CONCENTRATION EN NITRATE, PHOSPHATE ET SILICATE DANS LE MILIEU (mM) AU COURS DU TEMPS (JOURS) POUR QUATRE CONDITIONS DE CULTURE DE *SELLAPHORA MINIMA* (TRAITS NOIRS). CONCENTRATION EN BIOMASSE (g L^{-1}) AU COURS DU TEMPS DANS LE MILIEU POUR *S. MINIMA* POUR QUATRE CONDITIONS DE CULTURE DIFFÉRENTES (TRAITS PLEINS COLORÉS). A (ROND BLEU) : TRIS 10mM / Air, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20mM + PIPES 20mM / Air, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10mM / CO_2 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20mM + PIPES 20mM / CO_2 2% (v/v). DW (DRY WEIGHT), MASSE SÈCHE. VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES \pm ÉCARTS-TYPES (N=3).

La concentration en nutriments dans le milieu a été suivie tout au long de l'expérience afin d'évaluer la relation entre la croissance cellulaire et la consommation du nitrate, du phosphate et du silicate, trois macroéléments indispensables à la croissance des diatomées (Fig. 15). Les concentrations en nitrate et en phosphate baissent progressivement dans toutes les conditions tandis que la concentration en biomasse augmente, jusqu'à observer un ralentissement (condition A) ou un arrêt (conditions B, C et D) de la croissance lorsque ces deux nutriments sont épuisés. Ainsi, la déplétion en nitrate et en phosphate survient plus tôt dans les cultures sous CO_2 2% (conditions C et D), la croissance étant plus rapide et la

concentration maximale en biomasse plus précocement atteinte que dans les cultures sous air, conformément aux résultats décrits au point 4.2.

En ce qui concerne le silicate (5,33 mM initialement), on remarque une très nette chute de concentration dès les premières heures de culture. Ce phénomène a déjà été rapporté par Gérin *et al.* pour *S. minima* [87], et a été référencé pour des espèces de diatomées marines [117]. Il paraît d'ailleurs s'intensifier quand les algues proviennent de précultures où tout le silicate avait été consommé [16,130,131]. Étant donné que la préculture avait été maintenue 15 jours dans du milieu FDMed, il est fort probable que tout le silicate y était épuisé, incitant les algues placées dans du milieu frais à créer des réserves (pool de silicate intracellulaire) qu'elles dépenseront lors de la croissance cellulaire [16].

Puisque ces trois nutriments sont essentiels à la croissance des diatomées, il est positif de voir que dans le milieu utilisé (FDMed), les nutriments semblent bien équilibrés en termes de concentration les uns par rapport aux autres puisqu'ils arrivent tous à épuisement à quelques heures d'intervalle. Le fait que la croissance s'arrête une fois les nutriments totalement consommés nous conforte dans l'idée qu'en rajouter à un moment déterminant (expérience de fed-batch) pourrait permettre d'atteindre des concentrations en biomasse plus importantes encore que celles mesurées lors de cette expérience, en évitant que ne s'arrête brutalement la croissance pour cause de déplétion du milieu.

4.4. Production de fucoxanthine

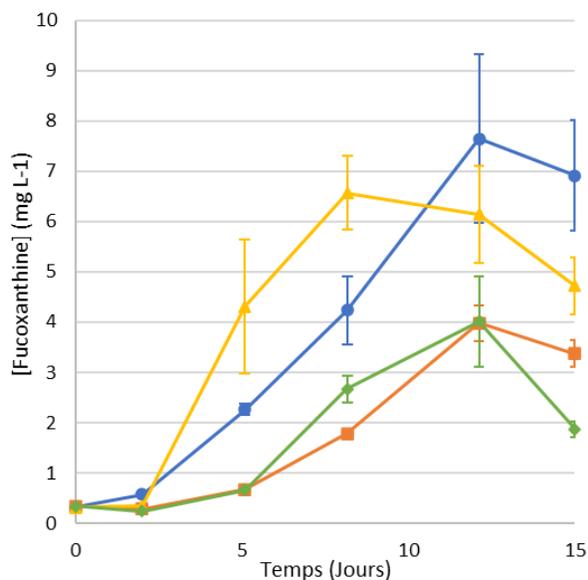


FIGURE 16 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN FUCOXANTHINE DANS LES CULTURES (MG L⁻¹) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

La concentration en fucoxanthine dans les cultures a été mesurée tout au long de l'expérience (Fig. 16). Comme attendu, l'aspect général des graphiques est similaire à celui des courbes de croissance (Fig. 9).

On remarque que les conditions B et D (toutes deux tamponnées par du Tris 20 mM et PIPES 20 mM)

suivent une tendance commune où la concentration en fucoxanthine dans le milieu commence à s'élever au jour 5 pour atteindre un maximum d'environ 4 mg.L⁻¹ au jour 12, avant de redescendre par la suite de

façon plus marquée pour la condition D (CO₂ 2%). C'est lorsque le milieu est tamponné avec du Tris 10 mM (conditions A et C) que les concentrations en fucoxanthine les plus élevées sont observées ($7,6 \pm 0,7$ et $6,6 \pm 1,7$ mg.L⁻¹, respectivement, valeurs qui ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$)). Il n'en reste pas moins que dans la condition C (CO₂ 2%), ce plafond est atteint en huit jours contre douze pour la condition A (Air). Un test t de Student a permis de confirmer que les valeurs maximales obtenues dans ces conditions sont significativement supérieures à celles des conditions B et D (cultures tamponnées par du Tris 20 mM + PIPES 20 mM) ($p < 0,02$).

En termes de productivité, les meilleurs résultats sont, comme pour la croissance, observés chez les algues tamponnées par du Tris 10 mM : $V_{max} = 1,29 \pm 0,42$ mg_{fuco}.L⁻¹.j⁻¹ dans la condition C (CO₂ 2%) et $0,86 \pm 0,29$ mg_{fuco}.L⁻¹.j⁻¹ dans la condition A (Air) (Fig. 17). Même si ces valeurs ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,2$), il faut noter que V_{max} est atteint bien plus rapidement (jour 5) dans la condition C que dans la condition A (jour 12). Chez les algues tamponnées par du Tris 20 mM + PIPES 20 mM, les valeurs de V_{max} sont moindres ($0,86 \pm 0,29$ et $0,55 \pm 0,10$ mg_{fuco}.L⁻¹.j⁻¹ sous air et sous CO₂ 2%, respectivement) et pas statistiquement différentes.

Il est intéressant de noter que les algues, selon qu'elles sont cultivées sous air ou sous CO₂ 2%, présentent un pattern d'évolution de la productivité en fucoxanthine relativement similaire (bien que d'amplitude variable) quel que soit la solution tampon utilisée. Dans les cultures sous air (conditions A et B), la productivité augmente graduellement jusqu'au jour 8 avant de décroître. Dans les cultures sous CO₂ 2% (conditions C et D), la productivité augmente pour atteindre V_{max} plus précocement (aux jours 5 et 8, respectivement) et ensuite décroître jusqu'à la fin de la culture, atteignant même des valeurs négatives à partir du jour 12.

Les résultats obtenus pour la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM) sont similaires à ceux déjà rapportés par Gérin *et al.* [87] (évolution semblable de la productivité en fonction du temps, et V_{max} de $0,86$ mg_{fuco}.L⁻¹.j⁻¹ observé au jour 12).

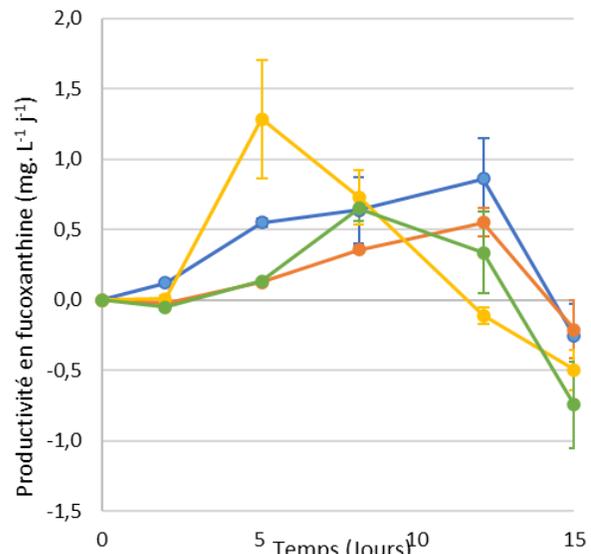


FIGURE 17 : ÉVOLUTION DE LA PRODUCTIVITÉ EN FUCOXANTHINE DANS LES CULTURES (MG L⁻¹.J⁻¹) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

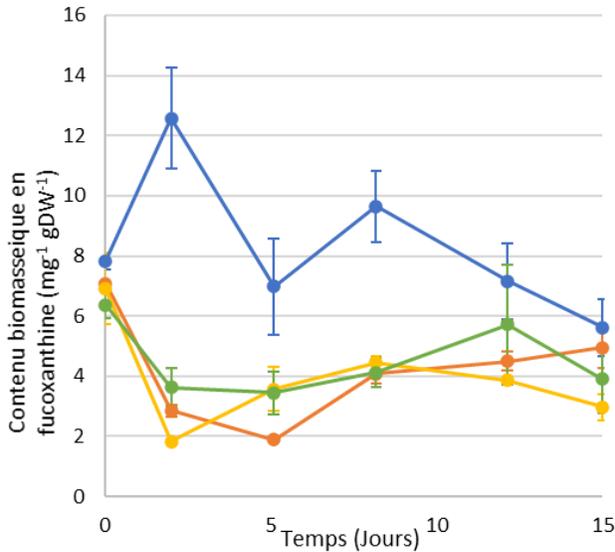


FIGURE 18 : ÉVOLUTION DU CONTENU BIOMASSIQUE EN FUCOXANTHINE (MG GDW⁻¹) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

La **Figure 18** illustre l'évolution au cours du temps du contenu massique en fucoxanthine dans la biomasse algale. C'est dans la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM) que la teneur en fucoxanthine est la plus élevée tout au long de l'expérience. Initialement située vers 8

mg_{fuco}.gDW⁻¹, elle accuse ensuite une légère tendance à la décroissance pour atteindre 6 mg_{fuco}.gDW⁻¹ après 15 jours de culture. Ces résultats se situent dans le même ordre de grandeur que celui rapporté par Gérin *et al.* [87], dont les travaux avaient mis en exergue une teneur en fucoxanthine relativement stable située autour de 7,5 mg_{fuco}.gDW⁻¹.

Dans les trois autres conditions (B, C et D), le contenu de la biomasse en fucoxanthine est bien moindre par rapport à la condition A. Si l'on excepte l'évolution entre les jours 0 et 2 qui correspond à une phase d'adaptation des algues à leur nouveau milieu, la teneur initiale en fucoxanthine (2-4 mg_{fuco}.gDW⁻¹ au jour 2) tend à augmenter légèrement au cours du temps pour atteindre 3-5 mg_{fuco}.gDW⁻¹ au terme de l'expérience.

Si l'on se concentre sur les cultures tamponnées par du Tris 10 mM (conditions A et C, les plus prometteuses en termes de croissance), il est intéressant de comparer l'aspect des courbes de croissance (**Fig. 9**) et de l'évolution de la concentration en fucoxanthine (**Fig. 16**). On note que l'écart important qui était observé entre les deux conditions (Air et CO₂ 2%) sur les courbes de croissance s'est nettement amenuisé sur les courbes d'accumulation de la fucoxanthine, la condition A (Air) allant jusqu'à surpasser la condition C (CO₂ 2%) en termes de concentration maximale en fucoxanthine alors que ce n'était pas le cas pour la croissance (condition C toujours supérieure à la condition A). Cette observation est, plus que vraisemblablement, une conséquence du contenu accru en fucoxanthine dans la biomasse des algues cultivées sous air par rapport à celles cultivées sous CO₂, comme indiqué sur le graphique (**Fig. 18**)

Les contenus biomassiques en Chl α et Chl c_2 , pigments majoritaires chez les diatomées, ont un profil d'évolution au cours du temps très similaire à celui de la fucoxanthine dans toutes les conditions (**Fig. 19**). Nous pourrions émettre l'hypothèse que la variation de la teneur en fucoxanthine se fait ici concomitamment à celle des autres pigments, et que l'ensemble des variations pigmentaires observées

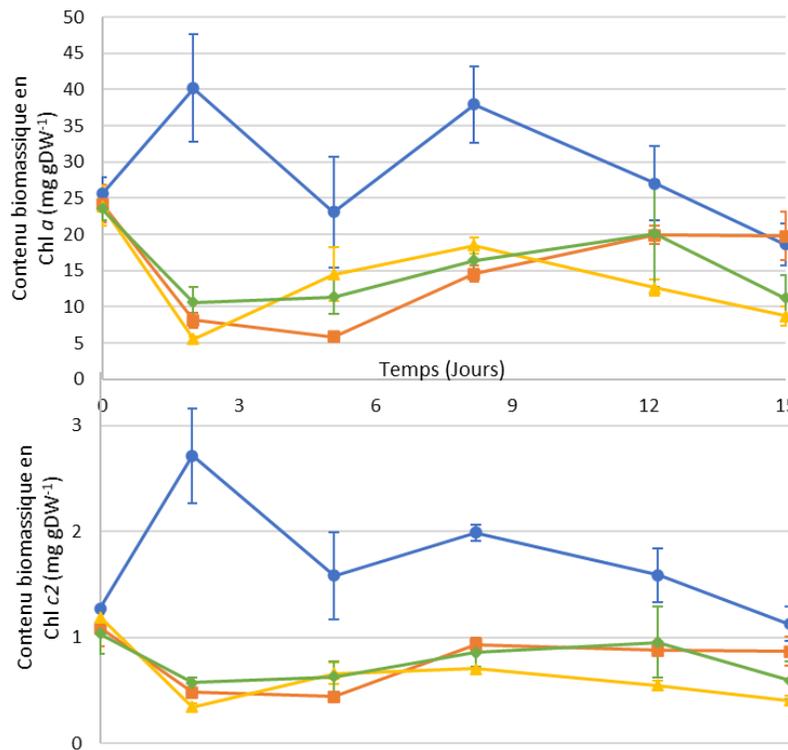


FIGURE 19 : ÉVOLUTION DU CONTENU BIOMASSIQUE EN CHLOROPHYLLE A (CHL A, GRAPHIQUE DU HAUT) ET EN CHLOROPHYLLE C2 (CHL C2, GRAPHIQUE DU BAS)(MG GDW⁻¹) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

est une conséquence des fluctuations environnementales (modification de la disponibilité en nutriments, augmentation de la densité cellulaire) qui opèrent au fil de la culture.

Ces différents résultats mettent en exergue la complexité d'optimiser les conditions opératoires à des fins de production de composés à haute valeur ajoutée telle la fucoxanthine. Si la condition C (Tris 10 mM / CO₂ 2%) donne les meilleurs résultats en termes de

croissance (l'accumulation de biomasse étant un paramètre déterminant dans tout processus bioindustriel), la teneur biomassique en fucoxanthine y

est bien moindre que dans la condition A (Tris 10 mM / Air) qui accuse, quant à elle, une plus lente accumulation de biomasse au cours du temps. Nous proposerons, dans la section 6. **Perspectives**, une stratégie dérivée de nos résultats qui permettrait de combiner l'une et l'autre condition (Air et CO₂ 2%) de manière à atteindre l'objectif ultime d'accroître la production de fucoxanthine par rapport aux rendements dont nous disposons déjà.

4.5. Production d'acide eicosapentaénoïque (EPA)

En préambule, il faut préciser que la sensibilité de la plateforme GC était trop faible que pour permettre l'analyse du contenu en EPA avant le jour 5. D'autre part, à cause d'un problème informatique majeur de l'appareillage GC, il n'y a qu'un seul réplica qui ait pu être analysé aux jours 8, 12 et 15.

Dans l'étude de Gérin *et al.* [87] antérieure à ce mémoire, deux souches de diatomées d'eau douce avaient été cultivées pour la production de biocomposants. Alors que *Sellaphora minima* s'était avérée la plus efficace pour la production de fucoxanthine, l'autre souche, *Nitzschia palea* (qui n'a pas pu être étudiée ici par manque de temps), s'était montrée meilleure productrice d'EPA que sa consœur (concentration de 15 mg.L⁻¹ pour un contenu cellulaire de 12,6 mg.gDW⁻¹ et un Vmax de 2,1 g.L⁻¹.j⁻¹). Bien que plus faibles, les valeurs obtenues pour *S. minima* s'étaient avérées malgré tout intéressantes en regard des données disponibles dans la littérature pour les diatomées marines (concentration en EPA de 12 g.L⁻¹ pour un contenu cellulaire de 5,6 mg.gGW⁻¹ et un Vmax de 1,5 g.L⁻¹.j⁻¹) [32,114,116,117]. Ces différents résultats avaient été obtenus dans les conditions A (Air / Tris 10 mM).

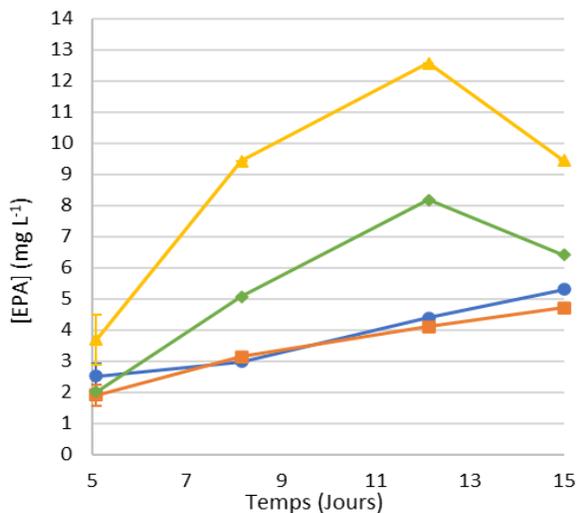


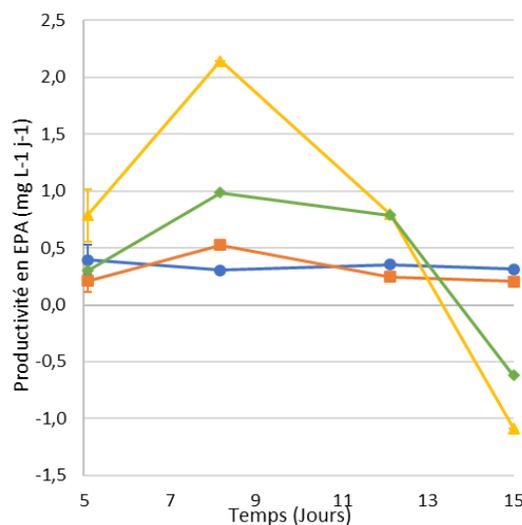
FIGURE 20 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN EPA DANS LES CULTURES (MG L⁻¹) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS DU JOUR 5, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

Dans la même condition, nous obtenons, comme illustré sur la (Fig. 20), une concentration en EPA de 5,3 mg.L⁻¹ après 15 jours contre 8 mg.L⁻¹ dans l'étude de Gérin *et al.* [87]. Cette petite différence s'explique probablement par un léger décalage dans le timing des cultures, une valeur similaire à celle observée ici ayant été monitorée au jour 12 dans cette précédente étude (d'une durée de 21 jours). Il est notable que sous air, l'évolution de la concentration en EPA dans la culture ne dépend pas de la solution tampon puisque les courbes obtenues en présence de Tris 10 mM et de Tris 20 mM + PIPES 20 mM se superposent presque parfaitement.

La vitesse et l'amplitude de l'accroissement de la concentration en EPA est bien supérieure chez les algues cultivées sous CO₂ 2%, avec des maxima de 12,6 mg.L⁻¹ et 8,2 mg.L⁻¹ au jour 12 pour les conditions C (Tris 10 mM) et D (Tris 20 mM + PIPES 20 mM), respectivement. En particulier, la valeur obtenue ici avec *S.*

minima pour la condition C se rapproche du maximum (15 mg.L^{-1}) rapporté par Gérin *et al.* [87] pour *N. palea* dans la condition A (Air / Tris 10 mM). En présence de CO_2 2%, il est notable la solution tampon exerce une influence marquée sur l'accumulation d'EPA : bien que les courbes présentent un aspect général similaire, l'accumulation d'EPA est bien moins efficace en vitesse et en amplitude dans les cultures tamponnées par du Tris 20 mM + PIPES 20 mM. Un parallélisme peut être fait entre cette différence et celle qui caractérise les vitesses de croissance des algues dans ces deux conditions (**Fig. 9**). Il est néanmoins notable que les maxima de concentration en EPA soient ici observés au jour 12 alors que les maxima de concentration en biomasse ont été enregistrés aux jour 7 et 9 pour les conditions C et D, respectivement. Des éléments d'explication seront apportés ci-dessous.

FIGURE 21 : ÉVOLUTION DE LA PRODUCTIVITÉ EN EPA DANS LES CULTURES ($\text{MG L}^{-1}\text{J}^{-1}$) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO_2 2% (V/V), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO_2 2% (V/V). VALEURS ET BARRES D'ERREURS DU JOUR 5, MOYENNES \pm ÉCARTS-TYPES (N=3).



Tout comme c'était le cas pour la fucoxanthine, les courbes de productivité en EPA s'avèrent très stables au cours du temps ($0,25-0,5 \text{ mg.L}^{-1}\text{.j}^{-1}$) et quasiment superposables chez les algues cultivées sous air (conditions A et B)(**Fig. 21**). Le constat est tout autre chez

les algues cultivées sous CO_2 2%, pour lesquelles des fluctuations notables de la productivité surviennent au cours du temps avec, à l'évidence, une importante influence de la solution tampon sur le profil des courbes. Dans les deux cas, la productivité en EPA maximale est observée au jour 8, avec une valeur bien supérieure pour les cultures tamponnées par du Tris 10 mM (condition C : $2,2 \text{ mg.L}^{-1}\text{.j}^{-1}$) que pour celles tamponnées par du Tris 20 mM + PIPES 20 mM (condition D : $1 \text{ mg.L}^{-1}\text{.j}^{-1}$). Les données de productivités en EPA enregistrées pour la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM) sont inférieures à celles rapportées par Gérin *et al.* [87], pour une raison que nous ne pouvons expliquer sur base de ces seules données. Il n'en demeure pas moins que même si nous avons obtenu, pour *S. minima*, des résultats similaires à ceux de cette précédente étude (V_{max} de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}\text{.j}^{-1}$ en EPA), la valeur de $2,2 \text{ mg.L}^{-1}\text{.j}^{-1}$ rapportée ici pour la condition C (CO_2 2% / Tris 10 mM) se serait de toute façon avérée plus élevée. Il est intéressant de noter que dans cette condition, la productivité maximale en EPA est similaire à celle qui avait été monitorée pour *N. palea* dans la condition A par Gérin *et al.* [87] (V_{max} de $2,1 \text{ mg.L}^{-1}\text{.j}^{-1}$), à la différence qu'elle survient plus tôt dans la culture (jour 8 dans la présente étude contre jour 11 chez Gérin *et al.*).

Les données sur la teneur en EPA de la biomasse (**Fig. 22**) sont intéressantes, car elles indiquent de nouveau que sous air, ce paramètre reste très stable tout au long de la culture (de 5-8 mg.gDW⁻¹ au jour 5 à 4-6 mg.gDW⁻¹ au jour 15) sans que la solution tampon ne semble exercer d'influence notable. Chez les algues cultivées sous CO₂, on note au cours du temps une fluctuation de la teneur en EPA de la biomasse avec des tendances bien distinctes dans les conditions C (Tris 10 mM) et D (Tris 20 mM + PIPES 20 mM), avec un V_{max} de 10 mg.L⁻¹.j⁻¹ au jour 12 dans la condition C et de 14 mg.L⁻¹.j⁻¹ au jour 15 dans la condition D. Ces valeurs sont sensiblement supérieures à celle qui avait été obtenue par Gérin *et al.* [87] dans la condition A (2,1 mg.L⁻¹.j⁻¹). Dans la condition C, la teneur biomassique en EPA ne semble pas avoir atteint de plateau au jour 15, aussi peut-on émettre l'hypothèse qu'elle aurait éventuellement pu continuer à s'accroître encore davantage si l'expérience n'avait pas dû être stoppée.

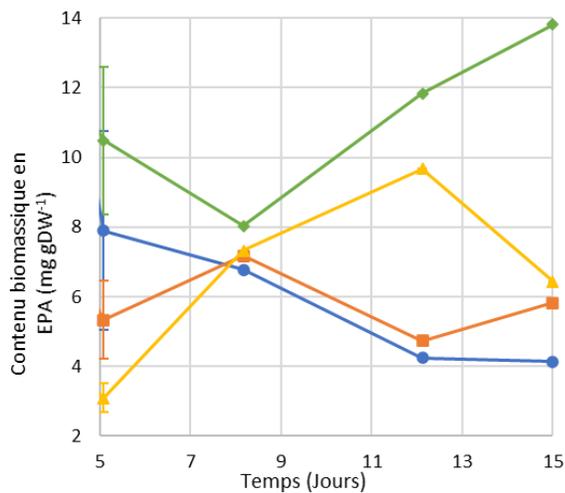


FIGURE 22 : ÉVOLUTION DU CONTENU BIOMASSIQUE EN EPA DANS LES CULTURES (MG GDW⁻¹) DE *S. MINIMA* AU COURS DU TEMPS (JOURS) SELON QUATRE CONDITIONS ; A (ROND BLEU) : TRIS 10MM / AIR, B (CARRÉ ORANGE) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / AIR, C (TRIANGLE JAUNE) : TRIS 10MM / CO₂ 2% (v/v), D (LOSANGE VERT) : TRIS 20MM + PIPES 20MM / CO₂ 2% (v/v). VALEURS ET BARRES D'ERREURS DU JOUR 5, MOYENNES ± ÉCARTS-TYPES (N=3).

Sous CO₂ 2%, quelle que soit la solution tampon, il est intéressant de constater que la teneur biomassique en EPA se met à augmenter précisément au moment où la croissance s'arrête (**Fig. 9**) et où les nutriments sont épuisés (**Fig. 15**), à savoir aux jours 7 et 9 pour les conditions C (CO₂ 2% / Tris 10mM) et D (CO₂ 2% / Tris 20mM + PIPES 20mM), respectivement. Une telle observation est vraisemblablement à mettre en relation avec le constat bien connu selon lequel la carence en azote génère, chez de nombreuses microalgues, l'augmentation de la teneur en lipides intracellulaires avec, chez les diatomées, un accroissement concomitant de la teneur en EPA [132–134].

Ces résultats, très prometteurs, nous permettent de conclure que cultiver *S. minima* sous un air enrichi en CO₂ 2% améliore la production d'EPA en termes de concentration maximale dans la culture, de rapidité pour atteindre cette dernière, de productivité volumétrique maximale et de contenu au sein de la biomasse algale. L'augmentation de la teneur en EPA étant vraisemblablement liée à la carence en nutriments concomitante à l'arrêt de la croissance, il nous semblerait opportun d'élaborer, sur base de cette piste et en complément de la modulation de l'apport en CO₂, une stratégie expérimentale visant à optimiser la production d'EPA en tirant parti de ces deux outils. Cette possibilité sera discutée plus avant dans la section **6. Perspectives**.

5. Discussion :

TABLEAU 3 : RÉSUMÉ DES RÉSULTATS OBTENUS LORS DE CETTE ÉTUDE CONCERNANT LES PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION ET DE PRODUCTIVITÉ D'EPA ET DE FUcoxANTHINE DANS LES DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE EXPÉRIMENTÉES POUR *S. MINIMA*. LES VALEURS AFFICHÉES SONT DES MOYENNES ± ÉCART-TYPE (N=3), SAUF EN CE QUI CONCERNE L'EPA (VOIR SECTION 4.5).

	Air/Tris 10mM (A)		Air/Tris 20mM + PIPES 20mM (B)		CO ₂ 2%/Tris 10mM (C)		CO ₂ 2%/Tris 20mM + PIPES 20mM (D)	
	Valeur du paramètre	Jour(s) d'incidence	Valeur du paramètre	Jour d'incidence	Valeur du paramètre	Jour d'incidence	Valeur du paramètre	Jour d'incidence
Biomasse max (gDW.L ⁻¹)	1,232 ± 0,051	15	0,918 ± 0,092	13	1,707 ± 0,195	7	0,930 ± 0,236	9
Productivité (gDW.L ⁻¹ .j ⁻¹)	0,082 ± 0,003	15	0,070 ± 0,007	13	0,241 ± 0,028	7	0,101 ± 0,026	9
V _{max} (gDW.L ⁻¹ .j ⁻¹)	0,164 ± 0,005	9	0,114 ± 0,020	12	0,325 ± 0,061	5	0,300 ± 0,051	6
μ _{max} (j ⁻¹)	0,643 ± 0,038	2 à 5	0,401 ± 0,015	2 à 5	0,597 ± 0,038	2 à 5	0,453 ± 0,018	2 à 6
Taux fuco. (mg.L ⁻¹)	7,64 ± 1,68	12	3,98 ± 0,35	12	6,57 ± 0,74	8	4,01 ± 0,87	12
Fuco. Biomasse sèche (mg.gDW ⁻¹)	12,57 ± 1,68	2	7,08 ± 0,65	0	6,91 ± 1,19	0	6,37 ± 0,44	0
Productivité fuco (mg.L ⁻¹ .j ⁻¹)	0,86 ± 0,29	12	0,55 ± 0,01	12	1,29 ± 0,42	5	0,65 ± 0,09	8
Taux EPA. (mg.L ⁻¹)	5,30	15	4,70	15	12,57	12	8,19	12
EPA. Biomasse sèche (mg.gDW ⁻¹)	7,90	5	7,17	8	9,68	12	13,82	15
Productivité EPA (mg.L ⁻¹ .j ⁻¹)	0,40	5	0,53	8	2,15	8	0,99	8

Lors de ce mémoire, nous avons étudié la production d'EPA et de fucoxanthine chez une souche de diatomée d'eau douce, *Sellaphora minima*. Deux paramètres, à savoir l'enrichissement de l'air des cultures avec du CO₂ 2% et la modification de la composition en tampons du milieu, ont été testés. Les résultats obtenus ont pu ainsi être comparés à ceux de l'étude de Gérin *et al.* [87], qui rapporte la mise au point du milieu pour diatomée d'eau douce utilisé ici, le FDMed.

5.1. Sur les paramètres de croissance

D'après nos résultats (**Tableau 3**), il semblerait que l'adjonction de CO₂ ne permette pas d'augmenter la concentration en masse sèche en fin de culture, mais bien d'arriver à ce maximum plus tôt. Ceci est probablement dû au fait que chez les algues cultivées sous CO₂ saturant, l'activité photosynthétique, et donc la production de sucres nécessaires à la croissance via le cycle de Calvin, n'est plus limitée par la disponibilité en CO₂, mais bien par l'intensité lumineuse à laquelle les microalgues sont soumises (et qui s'avère modérée dans la présente étude)

Les concentrations biomassiques référencées pour des microalgues productrices de composés bioactifs tels que la fucoxanthine et l'EPA peuvent être très variables. *Nannochloropsis oceanica* peut par exemple en conditions optimisées arriver à des concentrations de 1,6g.L⁻¹ en photobioréacteur [135], avec seulement 0,9g.L⁻¹ pour *Nannochloropsis oculata* [136]. Chez *Nannochloropsis gaditana*, Camacho-Rodríguez *et al.* [137] ont obtenu une concentration en biomasse maximale de 1,86g.L⁻¹ et chez *Cryptocodinium cohnii* Jiang et Chen ont rapporté une concentration en biomasse allant jusqu'à 3,13g.L⁻¹ [138]. Dans le même registre, une microalgue d'eau douce étudiée en vue d'optimiser sa production de fucoxanthine de l'ordre des *Synurales*, *Mallomonas sp.*, a montré un contenu en biomasse de 3,75g.L⁻¹ [139].

En se focalisant sur le taux de croissance spécifique (μ), Boelen *et al.* [140] ont comparé plusieurs microalgues productrices d'acides gras polyinsaturés et ont obtenu respectivement pour *Chaetoceros brevis*, *Thalassiosira weissflogii*, *Pyramimonas sp.*, *Emiliana huxleyi*, *Fibrocapsa japonica* des μ de 0,47j⁻¹, 0,42j⁻¹, 0,14j⁻¹, 0,34j⁻¹ et 0,44j⁻¹ en conditions de température et de luminosité optimisées. Indépendamment du contenu en EPA, on peut se faire une idée de l'efficacité du taux de croissance spécifique de *S. minima* puisque, à l'exception de la condition B (Air / Tris 20mM + PIPES 20mM), toutes les autres conditions ont des μ plus importants que ceux rapportés pour ces différentes espèces d'intérêt industriel.

Chez les diatomées étudiées à des fins de production d'EPA ou de fucoxanthine, les gammes de concentrations en biomasse rapportées dans la littérature sont très variables selon les conditions d'optimisation des cultures. Tout dépend, d'abord, de l'objectif de la production, car différentes stratégies existent selon ce qu'on veut faire biosynthétiser à la microalgue. Ensuite, certains visent la culture en photobioréacteurs illuminés par la lumière du jour alors que d'autres vont préférer utiliser des lumières artificielles calibrées. La diatomée marine modèle, *Phaeodactylum tricornutum*, montre des contenus en biomasse allant de 1,56g.L⁻¹ (CO₂ 1% (v/v) ; 1,7mM de nitrate, 120 $\mu\text{mol}^{\text{photon}}\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$) à 4,1g.L⁻¹ (CO₂ 1%

(v/v) ; 14,5mM de nitrate, 300 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en phototrophie [114,141,142], mais l'incroyable concentration de 25,4 g.L⁻¹ de biomasse a pu être atteinte en mixotrophie (glycérol 1% ; photobioréacteur en extérieur) [143]. Pour d'autres organismes, il semble possible, toujours en jouant sur la concentration en nitrate, mais aussi sur l'intensité lumineuse, d'obtenir des concentrations en biomasse un peu plus élevées comme c'est le cas pour *Odontella aurita*. En photobioréacteur bullé en colonne, Xia *et al.* [28] ont atteint une biomasse de 6,36g.L⁻¹ (CO₂ 1% (v/v) ; 18mM de nitrate, 300 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). On se rend compte que la plupart du temps, les contenus biomassiques les plus élevés sont obtenus notamment à l'aide d'un air enrichi en CO₂, ce pourquoi nous avons voulu expérimenter une telle supplémentation sur *S. minima*.

Cela n'a rien d'étonnant car, comme déjà largement référencé dans la littérature, le manque de CO₂ devient vite un facteur limitant dans une culture dont la biomasse commence à s'élever. L'enrichissement en dioxyde de carbone avec des taux plus élevés que ceux contenus dans l'atmosphère permet de s'affranchir de toute limitation en carbone inorganique, la lumière devenant alors le facteur limitant de la photosynthèse (review de [31]). Ceci étant dit, on remarque aussi, pour les raisons de limitation de lumière évoquées, que les exemples cités utilisent le plus souvent des intensités lumineuses plus importantes que dans notre cas, leur permettant probablement d'augmenter l'activité photosynthétique, et donc les produits du cycle de Calvin et la croissance cellulaire. Alors qu'en début de culture de telles intensités pourraient être trop fortes et induire une photoinhibition chez l'algue, la tendance s'inverse en fin de culture quand la biomasse est très importante et que les cellules commencent à faire de l'ombre à leurs congénères (effet écran). Cependant, des études sur *Thalassiosira pseudonana* ont montré qu'une augmentation de la pression partielle en CO₂ augmentait bien la croissance de manière significative, mais qu'additionnée à une intensité lumineuse saturante ils apercevaient un effet inhibiteur [144,145]. Il aurait été intéressant de réaliser des expériences de photosynthèse sur *S. minima* afin de démontrer que l'activité photosynthétique était accrue avec un air enrichi en CO₂, et qu'à ce moment-là c'était la lumière qui devenait limitante. Malheureusement à cause des conditions exceptionnelles liées à la crise du Sars-Cov2, cela n'a pas été possible.

Un autre paramètre montrant beaucoup d'importance pour la croissance cellulaire mais aussi la production de biocomposants est la concentration en nitrate dans le milieu [146–148]. Même s'il a été prouvé que des concentrations élevées en nitrates favorisent une concentration élevée en biomasse chez les diatomées *P. tricornutum* [141] et *O. aurita* [28], d'autres auteurs ont préféré une stratégie de fed-batch ayant également fait ses preuves. Xia *et al.* [32] ont su optimiser la croissance cellulaire mais

également la production d'EPA ($6,01\text{mg.gDW}^{-1}$; $9,37\text{mg}_{\text{EPA.L}^{-1}.\text{j}^{-1}}$) en commençant la culture avec 18mM de nitrates puis en y ajoutant 6mM supplémentaires aux jours 3, 7 et 11 afin d'éviter une carence empêchant la progression de la culture [146].

Ces exemples nous confortent dans l'idée que *S. minima*, cultivée dans le milieu FDMed, est apte à rivaliser, en regard de ses facultés d'accumulation de la biomasse, avec les microalgues exploitées pour leurs acides gras poly-insaturés et la fucoxanthine ne faisant pas partie de l'ordre des *Bacillariales*, mais entrant aussi dans les gammes répertoriées pour les diatomées marines. Étant d'eau douce, la diatomée étudiée dans ce mémoire présente un avantage d'un point de vue commercial (milieux de culture moins onéreux et évitement des problèmes de corrosion) et montre des contenus en biomasse intéressants (jusqu'à $1,71\text{g.L}^{-1}$ après seulement 7 jours). Puisque productrice efficace de fucoxanthine, mais également d'EPA en présence de CO_2 2% (v/v), nous allons discuter l'intérêt de sa culture par rapport à celle d'algues communément utilisées pour la production de ces biocomposants.

5.2. Sur la production de fucoxanthine

La fucoxanthine possède des vertus indéniables déjà expliquées dans l'introduction de ce travail, telles qu'une activité antioxydante, antitumorale et anti-inflammatoire [65,68,78]. À l'heure actuelle, ce sont majoritairement les algues brunes qui sont à la base de la production du pigment pour sa commercialisation. On recense pour celles-ci des taux cellulaires variables mais généralement bas par rapport à ce qui peut se faire chez les diatomées. En effet, le contenu en fucoxanthine par gramme de masse sèche est généralement situé entre 0,1 à 5 mg.gDW^{-1} chez les algues brunes. On peut citer par exemple les espèces *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Nizamuddinina zanardinii*, *Cystoseira indica*, *Sargassum muricum*, ou encore *Petalonia binghamiae* pour lesquelles c'est le cas [80–82,149,150].

En opposition, les diatomées, selon les espèces et les conditions, montrent des taux bien plus élevés. On a référencé par exemple $4,92\text{mg.gDW}^{-1}$ pour *Nitzschia sp* (0,9mM de nitrate ; $30\ \mu\text{mol}_{\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$), $5,25\text{mg.gDW}^{-1}$ pour *Chaetoceros calcitrans* (23mM de nitrate), $10,3\text{mg.gDW}^{-1}$ pour *Phaeodactylum tricornutum* (CO_2 1% (v/v) ; 18mM de nitrate, $300\ \mu\text{mol}_{\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$), ou encore $18,5\text{mg.gDW}^{-1}$ pour *Odontella aurita* cultivée en photobioréacteur bullé en colonne (CO_2 1% (v/v) ; 18mM de nitrate, $300\ \mu\text{mol}_{\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$) [28,141,151,152].

Les concentrations en fucoxanthine par gramme de masse sèche que nous obtenons sont respectivement de 12,57 ; 7,08 ; 6,91 et $6,37\text{ mg.gDW}^{-1}$ pour les conditions A (Air / Tris 10mM), B (Air / Tris 10mM + PIPES 20mM), C (CO_2 2% / Tris 10mM) et D (CO_2 2% / Tris 20mM + PIPES 20mM)(**Fig. 18**). On se trouve donc bien

dans les intervalles de valeurs retrouvés dans la littérature. Ce qu'il y a d'étonnant c'est que la concentration biomassique en fucoxanthine montre un maximum pour toutes les conditions en début de culture, avant de décroître en milieu de culture puis de remonter aux alentours des 4 mg.gDW⁻¹ pour les conditions B (Air / Tris 10mM + PIPES 20mM), C (CO₂ 2% / Tris 10mM) et D (CO₂ 2% / Tris 20mM + PIPES 20mM)(**Fig. 18**). Le même genre de tendance a été observé chez *P. tricornutum* et *C. fusiformis* en présence d'un air enrichi en CO₂ 1% [114]. Bien que les études précises sur l'impact d'une supplémentation en CO₂ sur la production de fucoxanthine soient rares, il semble que ce paramètre n'affecte pas sa concentration par gramme de biomasse sèche chez *P. tricornutum* [153].

En revanche, l'intensité lumineuse exerce, elle, une influence majeure sur la production de fucoxanthine. Des articles sur le sujet montrent que chez *P. tricornutum* et *C. fusiformis*, tout comme chez une autre microalgue productrice de la classe des *Synurophyceae*, *Mallomonas* sp., une faible intensité lumineuse (maximum à 30μmol_{photons}.m⁻².s⁻¹) induit une augmentation de la concentration biomassique des microalgues en fucoxanthine [114,139,153]. Sur base de ces constatations émettons l'hypothèse qu'en début de culture, la teneur en fucoxanthine est élevée du fait que les diatomées proviennent d'une préculture où la densité cellulaire est plus importante et la luminosité faible (par effet écran), ce qui cause un accroissement de la teneur en fucoxanthine chez les algues. Une fois les algues mises en culture à faible densité cellulaire sous une intensité lumineuse accrue (100μmol_{photons}.m⁻².s⁻¹), leur contenu en fucoxanthine aurait subi une décroissance par suppression dudit effet écran. Ce dernier, avec le gain en biomasse, aurait fini par se réitérer, réduisant ainsi la quantité de photons excitateurs parvenant jusqu'aux microalgues et causant une augmentation de la teneur en fucoxanthine.

On remarque que c'est la condition contrôle (A : Air / Tris 10mM) qui obtient le palmarès de la plus haute teneur cellulaire en fucoxanthine, et ce, de manière significative ($p < 0,02$) en début de culture (jour 2)(**Fig. 4**). Cette teneur ne va néanmoins cesser, par la suite, de décroître au cours du temps pour atteindre le minimum de 4 mg.gDW⁻¹ commun à toutes les conditions. Il est surprenant de constater que le profil de la courbe obtenue pour la condition A se présente comme l'exact inverse de celle qui caractérise les trois autres conditions, pour lesquelles nous avons noté une décroissance initiale rapide vers un minimum suivie d'une ré-augmentation lente de la teneur en fucoxanthine. Cette divergence de comportement physiologique, particulière à la combinaison Air et Tris 10 mM, est remarquable et ne peut pas être expliquée sur base de nos seuls résultats.

Les concentrations maximales en fucoxanthine atteintes lors de ce travail varient selon les conditions : nous obtenons des valeurs de 7,64 , 3,98 , 6,57 et 4,01 mg.L⁻¹ pour les conditions A (Air / Tris 10mM), B

(Air / Tris 10mM + PIPES 20mM), C (CO₂ 2% / Tris 10mM) et D (CO₂ 2% / Tris 20mM + PIPES 20mM), respectivement (**Fig. 16**). Bien que les deux valeurs les plus hautes, attribuées aux conditions A et C ne soient pas significativement différentes ($p > 0,2$), on remarque (**Tableau 3**) que le maximum est atteint plus rapidement dans la condition C, probablement grâce à la disponibilité plus élevée en carbone inorganique. Bien que cet enrichissement n'influence pas la quantité de fucoxanthine produite [156, cette étude], il est connu pour accroître le taux de croissance spécifique et donc l'arrivée précoce de la phase plateau. Ce gain rapide de biomasse par rapport à la condition contrôle A (Air / Tris 10mM) représente un avantage indéniable qui se traduit par une productivité significativement plus élevée de la condition C (CO₂ 2% / Tris 10mM) (1,29 mg.L⁻¹.j⁻¹ contre 0,86 mg.L⁻¹.j⁻¹ pour la condition A) (**Fig. 17**). En comparant notre meilleure productivité avec ce que l'on trouve en conditions optimisées dans la littérature, on se rend compte que des valeurs bien supérieures sont répertoriées pour *Odontella aurita* : 7,96 mg_{Fuco}.L⁻¹.j⁻¹ (CO₂ 1% (v/v) ; 18mM de nitrate, 300 μmol_{photons}.m⁻².s⁻¹) en photobioréacteur [28]. Ces résultats sont intéressants car ils indiquent qu'en modulant d'autres paramètres environnementaux tels que l'intensité lumineuse et la concentration en nitrate, nous pourrions encore bien davantage améliorer la production de fucoxanthine chez *S. minima* dans le milieu FDMed, de manière à atteindre les rendements obtenus avec les diatomées marines en conditions optimisées.

5.3. Sur la production d'EPA

L'EPA est majoritairement commercialisé sous la forme de compléments alimentaires à base d'huile de poissons gras. De manière générale, les poissons montrent des contenus en EPA allant de 0,6 mg par gramme de chair pour la morue à 9 mg pour le maquereau, qui appartient à la famille de ces poissons dits « gras » [88]. A cause des problèmes environnementaux liés à la surpêche, les microalgues productrices d'EPA, dont les diatomées font partie, ont été ces dernières années massivement étudiées dans l'optique de fournir une source d'EPA alternative qui serait industriellement compétitive. Trois diatomées marines sont d'ores et déjà exploitées à cette fin, à savoir *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia laevis* et *Odontella aurita* qui présentent des teneurs biomassiques en EPA de 10 à 50 mg.gDW⁻¹ selon la souche, le système de culture et le fait que les conditions opératoires aient ou non été optimisées [32,114–117].

Il est intéressant de noter que cultiver *S. minima* sous un air enrichi en CO₂ 2% améliore sensiblement les paramètres de production d'EPA en comparaison de ceux qui sont observés sous air (présente étude et Gérin *et al.* [87]). Sous CO₂ 2%, nous enregistrons des teneurs maximales en EPA de 9,68 (Tris 10 mM) et 13,82 mg.gDW⁻¹ (Tris 20 mM + PIPES 20 mM) (**Fig. 22**) surpassant les valeurs obtenues par Gérin *et al.* [87] avec *N. palea*, qui dans la condition contrôle (A : Air / Tris 10 mM) s'était avérée meilleure productrice

d'EPA que sa consœur. Un effet similaire a déjà été démontré chez *P. tricornutum*, à savoir un doublement la teneur biomassique en EPA lorsque les algues sont cultivées sous CO₂ 5% [154], même si d'autres études ont quant à elles révélé l'inverse, soit que cultiver l'algue sous CO₂ 5% réduit la teneur biomassique en EPA [155]. Il a également été montré que la diatomée *Chaetoceros brevis* ne semble pas affectée par la concentration du carbone inorganique dans le milieu [36]. L'hypothèse que la régulation du contenu en EPA par le CO₂ est spécifique non seulement de l'espèce de diatomée considérée, mais également de la souche nous semble plus que fondée en regard de ces différents résultats.

Une observation remarquable, lorsque l'on compare le graphique de l'évolution de la biomasse (**Fig. 9**) avec celui de la teneur algale en EPA (**Fig. 22**), est de constater que chez les diatomées cultivées sous CO₂ 2% (conditions C et D), cette teneur continue d'augmenter après l'arrêt de la croissance, alors que les nutriments, et notamment le nitrate, sont totalement épuisés (**Fig. 15**). L'azote est un macroélément qui entre dans la composition de classes très variées de macromolécules biologiques et s'avère d'une importance majeure pour la croissance des microalgues. Des fluctuations de la nature et de la concentration en azote dans l'environnement sont connues pour altérer l'état physiologique des microalgues, et par là même leur contenu cellulaire en carbohydrates, protéines, lipides, pigments et métabolites secondaires [156]. En particulier, de nombreuses études se sont focalisées sur les effets d'une limitation en azote dans le milieu sur le métabolisme des microalgues, étant donné la prévalence de ce stress environnemental dans certains écosystèmes et son intérêt bioindustriel. Il est en effet bien connu que la carence en azote induit, chez la plupart des microalgues, un accroissement de la biosynthèse des lipides se traduisant par une augmentation du pourcentage massique de ladite fraction. Par exemple, une étude de Shifrin et Chisholm [157] rapporte qu'une privation en azote génère un triplement de la fraction lipidique totale chez certaines algues vertes. Dans le même sens, en mixotrophie (1% glycérol) et avec des concentrations très basses en nitrates, c'est ainsi que Fernández Sevilla *et al.* [143] ont atteint l'impressionnante productivité de 56 mg.L⁻¹.j⁻¹ d'EPA chez *P. tricornutum*. Ces données sont en accord avec l'observation que dans la présente étude, la teneur biomassique en EPA est accrue en fin de culture, lorsque l'azote est totalement épuisé, chez *S. minima* cultivée sous CO₂ 2% (**Fig. 15, Fig. 22**). Si les cultures sous air avaient été poursuivies plus avant (le temps de laisser les cellules s'adapter à la carence en azote), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un tel accroissement de la teneur biomassique en EPA aurait également pu être observé.

Bien qu'en termes de productivité et de concentration volumétrique maximale, nous n'ayons pas obtenu des valeurs aussi intéressantes que les meilleures recensées dans la littérature, la présente étude nous

donne des pistes pour pousser plus en avant les investigations, notamment en regard des résultats relatifs à l'influence de la culture de *S. minima* sous CO₂ 2% et de la carence en azote sur la croissance algale ainsi que sur la productivité et la teneur biomassique en EPA.

6. Conclusion et perspectives

Nous avons vu que l'enrichissement de l'air de nos cultures avec du CO₂ 2% permettait d'accélérer fortement la production de biomasse chez la diatomée d'eau douce *Sellaphora minima*. Il en résultait, pour la condition C principalement (CO₂ 2% ; Tris 10mM), une productivité ainsi qu'une concentration volumique maximale relativement importante d'EPA et de fucoxanthine par rapport aux autres conditions, le tout dans un laps de temps réduit. Malgré tout, nous sommes loin d'atteindre les taux référencés dans la littérature pour les espèces marines qui ont fait l'objet de travaux d'optimisation approfondis, surtout en ce qui concerne la production d'EPA. Cette étude pourrait donc donner suite à diverses expériences qui nous permettraient d'améliorer les conditions de croissance et la production de biocomposants par des diatomées d'eau douce.

En ce qui concerne le CO₂, il pourrait être intéressant de mesurer la cinétique de croissance de *S. minima* sous différentes concentrations de CO₂ afin de définir exactement laquelle pourrait induire la plus rapide et la plus importante accumulation de biomasse. Ce type d'expérience a déjà été réalisé à de nombreuses reprises et démontre à quel point les taux optimaux peuvent être variable selon les espèces étudiées, mais également selon les composés que l'on désire produire [154,158].

En ce qui concerne la fucoxanthine, puisque nous avons remarqué que la supplémentation en CO₂ en fait baisser la teneur biomassique, nous pourrions envisager un processus de culture en deux étapes : premièrement, une phase de croissance sous CO₂ 2% qui permettrait d'emmagasiner de la biomasse, et deuxièmement une phase d'accumulation de fucoxanthine sous air, durant laquelle la croissance serait attendue comme quasiment nulle (au vu de l'important effet écran à ces fortes densités cellulaires) mais où la teneur biomassique en fucoxanthine augmenterait très fortement. En passant à un mode de culture fed-batch pour réapprovisionner le milieu en N, Si et P lorsqu'ils arrivent à épuisement, il pourrait éventuellement s'avérer possible, lors de la première phase, d'atteindre des densités cellulaires bien supérieures à celles obtenues dans la présente étude. Cette possibilité de feed des cultures vaut aussi pour la production de biomasse dans le contexte de la biosynthèse d'EPA, et nous estimons à cet égard qu'elle pourrait grandement en améliorer les rendements.

En faisant fluctuer l'intensité lumineuse, il pourrait s'avérer possible de promouvoir la production de biomasse et des composés d'intérêt. Nous pourrions, par exemple, soumettre les microalgues à une intensité lumineuse modérée ($120 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) de manière à promouvoir la croissance, avant de les faire redescendre à $30 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (intensité considérée comme faible) de manière à promouvoir la

biosynthèse des molécules d'intérêt. Cette manœuvre a permis à Wang *et al.* [114] de faire produire à *P. tricornutum* des concentrations volumiques d'EPA et de fucoxanthine particulièrement importantes (62,6 mg.L⁻¹ d'EPA et 8,32 mg.L⁻¹ de fucoxanthine).

Une autre stratégie pourrait être de tester différentes concentrations en nitrates, ce paramètre étant connu pour moduler non seulement la croissance cellulaire, mais également le contenu en EPA et en fucoxanthine des cellules. Un cas intéressant est celui d'*O. aurita*, montrant une production accrue d'EPA lorsqu'on ajoute, selon une méthode de fed-batch que nous pourrions envisager, de petites doses de nitrates régulièrement plutôt qu'une dose importante unique en début de culture [32]. En outre, pourquoi ne pas tester différentes sources d'azote en vue d'accroître la croissance et la production de lipides ? À titre d'exemple, l'algue verte *Chlorella sorokiniana* porte un intérêt particulier à l'ammonium lorsqu'il s'agit d'accumuler des acides gras [159]. Un autre exemple concerne l'enrichissement du milieu de croissance par des formes d'azote organique plus communément utilisées en culture bactérienne, les peptones et les extraits de levure. Il a été démontré que la culture mixotrophe de *P. tricornutum* en présence de ces composés amplifie significativement, par rapport à la condition autotrophe, la croissance et la production de lipides (dont EPA), protéines et carbohydrates totaux tout en augmentant également la concentration volumique en fucoxanthine [160].

Certains chercheurs se sont penchés sur la modification des conditions de température au cours de la culture de *P. tricornutum*. Ils sont parvenus à améliorer la teneur en EPA des cultures en plaçant ces dernières, une fois la biomasse efficacement accumulée, à 10°C au lieu de 25°C pendant 10h (stratégie de culture en deux étapes) [115]. Toutes nos expériences ont été menées à 25°C, température généralement idéale pour la croissance des diatomées des milieux tempérés, mais il n'est pas exclu que l'optimum de *S. minima* se situe en léger décalage [161–163].

Alors que ce mémoire s'est focalisé sur la culture des diatomées en phototrophie, il a été démontré que leur culture en mixotrophie avait un avenir prometteur. Comme cité précédemment, l'impressionnante productivité de 56 mg.L⁻¹.j⁻¹ d'EPA a été atteinte en mixotrophie pour *P. tricornutum* avec l'ajout de 0,1% de glycérol dans le milieu [143]. En outre, avec des conditions de cultures similaire additionnées de 5 g.L⁻¹ de glucose en mixotrophie, *N. laevis* est capable de produire, en termes de concentration volumique, jusqu'à 7-fois plus d'EPA qu'en phototrophie, et ce pour une productivité près de 3-fois supérieure [117]. Une perspective d'étude ultérieure pourrait donc être de tester différentes sources de carbone en mixotrophie en vue d'améliorer la croissance de *S. minima* ainsi que son contenu en EPA.

Enfin, une approche de modification génétique pourrait aussi être envisagée. Chez *P. tricornutum*, des chercheurs se sont penchés sur le gène *dxs* codant pour une 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. Cette enzyme est impliquée dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes, et est connue pour favoriser la biosynthèse des β -carotènes lorsqu'elle est surexprimée chez divers organismes comme le plant de tomate [164] ou *Escherichia coli* [165]. À l'aide de plasmides d'expression, ils ont intégré dans le génome de la diatomée de nombreuses copies de ce gène qui était transcriptionnellement surexprimé une fois les cultures transférées de l'obscurité à la lumière. Ils ont ainsi pu obtenir des taux cellulaires en fucoxanthine 2,5-fois supérieurs par rapport à la souche sauvage, de l'ordre de 24mg.gDW^{-1} [166]. À l'avenir, si les diatomées d'eau douce s'avèrent efficace pour la production de ces biocomposants, nous pourrions imaginer nous baser sur les travaux de caractérisation des voies de biosynthèse de l'EPA et de la fucoxanthine dans le but de générer des souches transgéniques capables d'en produire davantage.

En conclusion, les expériences menées dans le cadre de ce mémoire offrent de nombreuses pistes d'optimisation des conditions de culture qui pourraient placer la diatomée d'eau douce *Sellaphora minima* comme une candidate potentielle, au même titre que ses consœurs marines, pour la production à grande échelle d'EPA et de fucoxanthine.

7. Bibliographie

- [1] P. Vanormelingen, E. Verleyen, W. Vyverman, The diversity and distribution of diatoms: From cosmopolitanism to narrow endemism, *Biodivers. Conserv.* 17 (2008) 393–405. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9257-4>.
- [2] L.K. Medlin, I. Kaczmarska, Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision, *Phycologia*. 43 (2004) 245–270. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1>.
- [3] L.K. Medlin, D.M. Williams, P.A. Sims, The evolution of the diatoms origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions, *Eur. J. Phycol.* 28 (1993) 261–275. <https://doi.org/10.1080/09670269300650381>.
- [4] G.R. Halse, E.E. Syvertsen, Marine Diatoms, in: *Identifying Mar. Diatoms Dinoflag.*, 1996. <https://doi.org/10.1016/b978-012693015-3/50005-x>.
- [5] A.K.S.K. Prasad, B.E. Felgenhauer, Cingulum Morphology of the Marine Diatom *Dimeregramma fulvum* (Bacillariophyceae: Diatomaceae), *Trans. Am. Microsc. Soc.* (1988). <https://doi.org/10.2307/3226505>.
- [6] L.M. Johnson, J.R. Rosowski, Valve and band morphology of some freshwater diatoms: V. Variations in the cingulum of *Pleurosira laevis* (Bacillariophyceae), *J. Phycol.* (1992).
- [7] Z. V. Finkel, B. Kotrc, Silica use through time: Macroevolutionary change in the morphology of the diatom *fustule*, *Geomicrobiol. J.* (2010). <https://doi.org/10.1080/01490451003702941>.
- [8] N.C. Poulsen, I. Spector, T.P. Spurck, T.F. Schultz, R. Wetherbee, Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system, *Cell Motil. Cytoskeleton.* (1999). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(199909\)44:1<23::AID-CM2>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(199909)44:1<23::AID-CM2>3.0.CO;2-D).
- [9] L.A. Edgar, J.D. Pickett Heaps, The mechanism of diatom locomotion. I. An ultrastructural study of the motility apparatus, *Proc. R. Soc. London - Biol. Sci.* (1983). <https://doi.org/10.1098/rspb.1983.0042>.
- [10] D.G. Mann, Patterns of sexual reproduction in diatoms, *Hydrobiologia.* (1993). <https://doi.org/10.1007/BF00027999>.
- [11] J. Pickett-Heaps, Cell Division in Diatoms, *Int. Rev. Cytol.* (1991). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60497-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60497-0).
- [12] C. Zurzolo, C. Bowler, Exploring bioinorganic pattern formation in diatoms. A story of polarized trafficking, *Plant Physiol.* (2001). <https://doi.org/10.1104/pp.010709>.
- [13] C. Van Den Hoek, D.G. Mann, H.M. Jahns, *Algae: an introduction to phycology*, Search. (1995). <https://doi.org/10.2307/1468159>.
- [14] I. Kaczmarska, A. Poulícková, S. Sato, M.B. Edlund, M. Idei, T. Watanabe, D.G. Mann, Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxospores and resting stages, *Diatom Res.* (2013). <https://doi.org/10.1080/0269249X.2013.791344>.
- [15] A.S. Benoiston, F.M. Ibarbalz, L. Bittner, L. Guidi, O. Jahn, S. Dutkiewicz, C. Bowler, The evolution of diatoms and their biogeochemical functions, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* (2017).

<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>.

- [16] V. Martin-Jézéquel, M. Hildebrand, M.A. Brzezinski, Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth, *J. Phycol.* (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.00019.x>.
- [17] A.E. Allen, C.L. Dupont, M. Oborník, A. Horák, A. Nunes-Nesi, J.P. McCrow, H. Zheng, D.A. Johnson, H. Hu, A.R. Fernie, C. Bowler, Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms, *Nature*. (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10074>.
- [18] J. Kwadrans, P. Eloranta, B. Kawecka, K. Wojtan, Use of benthic diatom communities to evaluate water quality in rivers of southern Poland, *J. Appl. Phycol.* (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1008087114256>.
- [19] I. Lavoie, W.F. Vincent, R. Pienitz, J. Painchaud, Benthic algae as bioindicators of agricultural pollution in the streams and rivers of southern Québec (Canada), *Aquat. Ecosyst. Heal. Manag.* (2004). <https://doi.org/10.1080/14634980490281236>.
- [20] E. Reavie, J. Smol, Diatom-environmental relationships in 64 alkaline southeastern Ontario (Canada) lakes: A diatom-based model for water quality reconstructions, *J. Paleolimnol.* (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1008123613298>.
- [21] T. Debenest, J. Silvestre, M. Coste, E. Pinelli, Effects of pesticides on freshwater diatoms, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* (2010). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1352-4_2.
- [22] C.D. Van Raalte, I. Valiela, J.M. Teal, The effect of fertilization on the species composition of salt marsh diatoms, *Water Res.* (1976). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90149-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90149-4).
- [23] A. Bozarth, U.G. Maier, S. Zauner, Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2009). <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1804-8>.
- [24] J.B. Lee, K. Hayashi, M. Hirata, E. Kuroda, E. Suzuki, Y. Kubo, T. Hayashi, Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay, *Biol. Pharm. Bull.* (2006). <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2135>.
- [25] T.M. Perl, L. Bédard, T. Kosatsky, J.C. Hockin, E.C. d. Todd, R.S. Remis, An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid, *N. Engl. J. Med.* (1990). <https://doi.org/10.1056/NEJM199006213222504>.
- [26] S.K. Prestegard, L. Oftedal, R.T. Coyne, G. Nygaard, K.H. Skjærven, G. Knutsen, S.O. Døskeland, L. Herfindal, Marine benthic diatoms contain compounds able to induce leukemia cell death and modulate blood platelet activity, *Mar. Drugs.* (2009). <https://doi.org/10.3390/md7040605>.
- [27] T. Arao, M. Yamada, Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, *Phytochemistry.* (1994). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94817-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94817-9).
- [28] S. Xia, K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu, C. Zhang, Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *odontella aurita*, *Mar. Drugs.* (2013). <https://doi.org/10.3390/md11072667>.
- [29] M. Hüglér, S.M. Sievert, Beyond the Calvin cycle: Autotrophic carbon fixation in the ocean, *Ann. Rev. Mar. Sci.* (2011). <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142712>.
- [30] E. Jensen, R. Clément, S.C. Maberly, B. Gontero, Regulation of the calvin – Benson – Bassham

- cycle in the enigmatic diatoms: Biochemical and evolutionary variations on an original theme, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* (2017). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0401>.
- [31] B. Zhao, Y. Su, Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.054>.
- [32] S. Xia, B. Gao, J. Fu, J. Xiong, C. Zhang, Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different nitrogen supply regimes, *J. Biosci. Bioeng.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.06.002>.
- [33] K. Gao, D.A. Campbell, Photophysiological responses of marine diatoms to elevated CO₂ and decreased pH: A review, *Funct. Plant Biol.* (2014). <https://doi.org/10.1071/FP13247>.
- [34] W. Li, K. Gao, J. Beardall, Interactive Effects of Ocean Acidification and Nitrogen-Limitation on the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *PLoS One.* (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051590>.
- [35] E. Low-Décarie, G.F. Fussmann, G. Bell, The effect of elevated CO₂ on growth and competition in experimental phytoplankton communities, *Glob. Chang. Biol.* (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02402.x>.
- [36] P. Boelen, W.H. van de Poll, H.J. van der Strate, I.A. Neven, J. Beardall, A.G.J. Buma, Neither elevated nor reduced CO₂ affects the photophysiological performance of the marine Antarctic diatom *Chaetoceros brevis*, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.012>.
- [37] K.J. Crawford, J.A. Raven, G.L. Wheeler, E.J. Baxter, I. Joint, The response of *Thalassiosira pseudonana* to long-term exposure to increased CO₂ and decreased pH, *PLoS One.* (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026695>.
- [38] A. Gelzinis, V. Butkus, E. Songaila, R. Augulis, A. Gall, C. Büchel, B. Robert, D. Abramavicius, D. Zigmantas, L. Valkunas, Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll protein complex, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.11.004>.
- [39] M. Lohr, C. Wilhelm, Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8784>.
- [40] M. Lohr, C. Wilhelm, Xanthophyll synthesis in diatoms: Quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model, *Planta.* (2001). <https://doi.org/10.1007/s004250000403>.
- [41] J.J. Katz, J.R. Norris, L.L. Shipman, M.C. Thurnauer, M.R. Wasielewski, Chlorophyll function in the photosynthetic reaction center., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* (1978). <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.07.060178.002141>.
- [42] D. Von Wettstein, S. Gough, C.G. Kannangara, Chlorophyll biosynthesis, *Plant Cell.* (1995). <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1039>.
- [43] P. Kuczynska, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, Photosynthetic pigments in diatoms, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>.
- [44] M. Zapata, J.L. Garrido, S.W. Jeffrey, Chlorophyll c Pigments: Current Status, in: *Chlorophylls and*

- Bacteriochlorophylls, 2007. https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_3.
- [45] S. Takaichi, Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions, *Mar. Drugs*. (2011). <https://doi.org/10.3390/md9061101>.
- [46] J.A. Haugan, S. Liaaen-Jensen, Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae), *Biochem. Syst. Ecol.* (1994). [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0305-1978(94)90112-0).
- [47] T.W. Goodwin, *The Biochemistry of the Carotenoids*, 1980. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5860-9>.
- [48] E. Papagiannakis, I.H.M. Van Stokkum, H. Fey, C. Büchel, R. Van Grondelle, Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms, in: *Photosynth. Res.*, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-1003-8>.
- [49] S.W. JEFFREY, Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae., *Biochem. J.* (1961). <https://doi.org/10.1042/bj0800336>.
- [50] S. Coesel, M. Oborník, J. Varela, A. Falciatore, C. Bowler, Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms, *PLoS One*. (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002896>.
- [51] M. Bertrand, Carotenoid biosynthesis in diatoms, *Photosynth. Res.* (2010). <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9589-x>.
- [52] C. Bowler, A.E. Allen, J.H. Badger, J. Grimwood, K. Jabbari, A. Kuo, U. Maheswari, C. Martens, F. Maumus, R.P. Otiillar, E. Rayko, A. Salamov, K. Vandepoele, B. Beszteri, A. Gruber, M. Heijde, M. Katinka, T. Mock, K. Valentin, F. Verret, J.A. Berges, C. Brownlee, J.P. Cadoret, A. Chiovitti, C.J. Choi, S. Coesel, A. De Martino, J.C. Detter, C. Durkin, A. Falciatore, J. Fournet, M. Haruta, M.J.J. Huysman, B.D. Jenkins, K. Jiroutova, R.E. Jorgensen, Y. Joubert, A. Kaplan, N. Kröger, P.G. Kroth, J. La Roche, E. Lindquist, M. Lommer, V. Martin-Jézéquel, P.J. Lopez, S. Lucas, M. Mangogna, K. McGinnis, L.K. Medlin, A. Montsant, M.P.O. Le Secq, C. Napoli, M. Obornik, M.S. Parker, J.L. Petit, B.M. Porcel, N. Poulsen, M. Robison, L. Rychlewski, T.A. Ryneerson, J. Schmutz, H. Shapiro, M. Siaut, M. Stanley, M.R. Sussman, A.R. Taylor, A. Vardi, P. Von Dassow, W. Vyverman, A. Willis, L.S. Wyrwicz, D.S. Rokhsar, J. Weissenbach, E.V. Armbrust, B.R. Green, Y. Van De Peer, I. V. Grigoriev, The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes, *Nature*. (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07410>.
- [53] M. Dambek, U. Eilers, J. Breitenbach, S. Steiger, C. Büchel, G. Sandmann, Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*, *J. Exp. Bot.* (2012). <https://doi.org/10.1093/jxb/ers211>.
- [54] F.X. Cunningham, E. Gantt, Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* (1998). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.557>.
- [55] J.E. Sarry, J.L. Montillet, Y. Sauvaire, M. Havaux, The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis, *FEBS Lett.* (1994). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01028-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01028-5).
- [56] F. Bouvier, A. D'Harlingue, R.A. Backhaus, M.H. Kumagai, B. Camara, Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog, *Eur. J. Biochem.* (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01722.x>.
- [57] F. Beppu, Y. Niwano, E. Sato, M. Kohno, T. Tsukui, M. Hosokawa, K. Miyashita, In vitro and in vivo

- evaluation of mutagenicity of fucoxanthin (FX) and its metabolite fucoxanthinol (FXOH), *J. Toxicol. Sci.* (2009). <https://doi.org/10.2131/jts.34.693>.
- [58] A. Asai, T. Sugawara, H. Ono, A. Nagao, Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin a in mice and HepG2 cells: Formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites, *Drug Metab. Dispos.* (2004). <https://doi.org/10.1124/dmd.32.2.205>.
- [59] H. Nishino, M. Murakoshi, H. Tokuda, Y. Satomi, Cancer prevention by carotenoids, *Arch. Biochem. Biophys.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.09.011>.
- [60] S. Zhang, D.J. Hunter, M.R. Forman, B.A. Rosner, F.E. Speizer, G.A. Colditz, J.A.E. Manson, S.E. Hankinson, W.C. Willett, Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* (1999). <https://doi.org/10.1093/jnci/91.6.547>.
- [61] M.L. Slattery, J. Benson, K. Curtin, K.N. Ma, D. Schaeffer, J.D. Potter, Carotenoids and colon cancer, *Am. J. Clin. Nutr.* (2000). <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.575>.
- [62] S.K. Das, T. Hashimoto, K. Shimizu, T. Yoshida, T. Sakai, Y. Sowa, A. Komoto, K. Kanazawa, Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.09.007>.
- [63] E. Kotake-Nara, A. Asai, A. Nagao, Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells, *Cancer Lett.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.07.048>.
- [64] D.S. Michaud, D. Feskanich, E.B. Rimm, G.A. Colditz, F.E. Speizer, W.C. Willett, E. Giovannucci, Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts, *Am. J. Clin. Nutr.* (2000). <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.4.990>.
- [65] S.R. Kumar, M. Hosokawa, K. Miyashita, Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms, *Mar. Drugs.* (2013). <https://doi.org/10.3390/md11125130>.
- [66] P. Ganesan, K. Matsubara, T. Sugawara, T. Hirata, Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells, *Mol. Cell. Biochem.* (2013). <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1651-5>.
- [67] F. Beppu, Y. Niwano, T. Tsukui, M. Hosokawa, K. Miyashita, Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice, *J. Toxicol. Sci.* (2009). <https://doi.org/10.2131/jts.34.501>.
- [68] K.N. Kim, S.J. Heo, W.J. Yoon, S.M. Kang, G. Ahn, T.H. Yi, Y.J. Jeon, Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, *Eur. J. Pharmacol.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>.
- [69] T.R. Ulich, L.R. Watson, S. Yin, K. Guo, P. Wang, H. Thang, J. Del Castillo, The intratracheal administration of endotoxin and cytokines: I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate, *Am. J. Pathol.* (1991).
- [70] K. Shiratori, K. Ohgami, I. Ilieva, X.H. Jin, Y. Koyama, K. Miyashita, K. Yoshida, S. Kase, S. Ohno, Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo, *Exp. Eye Res.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>.

- [71] P. Ježek, Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins - UCPn, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2002). [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00061-4).
- [72] H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama, K. Miyashita, Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.002>.
- [73] S. Nishikawa, M. Hosokawa, K. Miyashita, Fucoxanthin promotes translocation and induction of glucose transporter 4 in skeletal muscles of diabetic/obese KK-Ay mice, *Phytomedicine.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.001>.
- [74] H.G. Joost, G.I. Bell, J.D. Best, M.J. Birnbaum, M.J. Charron, Y.T. Chen, H. Doege, D.E. James, H.F. Lodish, K.H. Moley, J.F. Moley, M. Mueckler, S. Rogers, A. Schürmann, S. Seino, B. Thorens, Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (2002). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00407.2001>.
- [75] S. Huang, M.P. Czech, The GLUT4 Glucose Transporter, *Cell Metab.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006>.
- [76] X. Yan, Y. Chuda, M. Suzuki, T. Nagata, Fucoxanthin as the major antioxidant in *hijikia fusiformis*, a common edible seaweed, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1999). <https://doi.org/10.1271/bbb.63.605>.
- [77] T. Nomura, M. Kikuchi, A. Kubodera, Y. Kawakami, Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), *Biochem. Mol. Biol. Int.* (1997). <https://doi.org/10.1080/15216549700202761>.
- [78] N.M. Sachindra, E. Sato, H. Maeda, M. Hosokawa, Y. Niwano, M. Kohno, K. Miyashita, Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites, *J. Agric. Food Chem.* (2007). <https://doi.org/10.1021/jf071848a>.
- [79] F.L. Li, L.J. Wang, Y. Fan, R.L. Parsons, G.R. Hu, P.Y. Zhang, A rapid method for the determination of fucoxanthin in diatom, *Mar. Drugs.* (2018). <https://doi.org/10.3390/md16010033>.
- [80] A. Fung, N. Hamid, J. Lu, Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*, *Food Chem.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.024>.
- [81] W.J. Wang, G.C. Wang, M. Zhang, C.K. Tseng, Isolation of fucoxanthin from the rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch, *J. Integr. Plant Biol.* (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00054.x>.
- [82] G.A. Fariman, S.J. Shastan, M.M. Zahedi, Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (*Nizamuddinina zanardinii* and *Cystoseira indica*) from Iran, *J. Appl. Phycol.* (2016). <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0645-y>.
- [83] X. Lu, H. Sun, W. Zhao, K.W. Cheng, F. Chen, B. Liu, A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process for production of fucoxanthin by the marine diatom *Nitzschia laevis*, *Mar. Drugs.* (2018). <https://doi.org/10.3390/md16070219>.
- [84] S.M. Kim, Y.J. Jung, O.N. Kwon, K.H. Cha, B.H. Um, D. Chung, C.H. Pan, A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2012). <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9602-2>.

- [85] E.A. Titlyanov, T. V. Titlyanova, Seaweed cultivation: Methods and problems, *Russ. J. Mar. Biol.* (2010). <https://doi.org/10.1134/S1063074010040012>.
- [86] K.W. Chew, S.R. Chia, P.L. Show, Y.J. Yap, T.C. Ling, J.S. Chang, Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>.
- [87] S. Gérin, T. Delhez, A. Corato, C. Remacle, F. Franck, A novel culture medium for freshwater diatoms promotes efficient photoautotrophic batch production of biomass, fucoxanthin, and eicosapentaenoic acid, *J. Appl. Phycol.* (2020) 1581–1596. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02097-1>.
- [88] P.M. Kris-Etherton, J.A. Grieger, T.D. Etherton, Dietary reference intakes for DHA and EPA, Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids. (2009). <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.011>.
- [89] O. V. Sayanova, J.A. Napier, Eicosapentaenoic acid: Biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants, *Phytochemistry.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.017>.
- [90] H. Takeyama, D. Takeda, K. Yazawa, A. Yamada, T. Matsunaga, Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp., *Microbiology.* (1997). <https://doi.org/10.1099/00221287-143-8-2725>.
- [91] A.R. PRATIWI, D. SYAH, L. HARDJITO, L.M.G. PANGGABEAN, M.T. SUHARTONO, Fatty Acid Synthesis by Indonesian Marine Diatom, *Chaetoceros gracilis*, *HAYATI J. Biosci.* (2009). <https://doi.org/10.4308/hjb.16.4.151>.
- [92] F. Domergue, J. Lerchl, U. Zähringer, E. Heinz, Cloning and functional characterization of phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* (2002). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03104.x>.
- [93] T. Arao, A. Kawaguchi, M. Yamada, Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Phytochemistry.* (1987). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83880-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83880-7).
- [94] E. Molina Grima, A. Robles Medina, A. Giménez Giménez, M.J. Ibáñez González, Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) from wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass, *J. Appl. Phycol.* (1996). <https://doi.org/10.1007/bf02178579>.
- [95] S.E. Carlson, S.H. Werkman, J.M. Peeples, R.J. Cooke, E.A. Tolley, Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993). <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.1073>.
- [96] M.A. Crawford, Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: Implications for the lipid nutrition of preterm infants, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.275s>.
- [97] A.P. Simopoulos, The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases, *Exp. Biol. Med.* (2008). <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.
- [98] A.P. Simopoulos, Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, *Am. J. Clin. Nutr.* (1991). <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.3.438>.

- [99] A.P. Simopoulos, Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply, in: Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(99\)80023-4](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(99)80023-4).
- [100] J. Dyerberg, H.O. Bang, E. Stoffersen, S. Moncada, J.R. Vane, EICOSAPENTAENOIC ACID AND PREVENTION OF THROMBOSIS AND ATHEROSCLEROSIS?, *Lancet*. (1978). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)91505-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)91505-2).
- [101] S. Fischer, P.C. Weber, Thromboxane A3 (TXA3) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983). [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(83\)80254-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(83)80254-X).
- [102] A. Raz, M.S. Minkes, P. Needleman, Endoperoxides and thromboxanes structural determinants for platelet aggregation and vasoconstriction, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* (1977). [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(77\)90188-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(77)90188-6).
- [103] P. Magee, S. Pearson, J. Whittingham-Dowd, J. Allen, PPAR γ as a molecular target of EPA anti-inflammatory activity during TNF- α -impaired skeletal muscle cell differentiation, *J. Nutr. Biochem.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.09.005>.
- [104] D. Camuesco, M. Comalada, A. Concha, A. Nieto, S. Sierra, J. Xaus, A. Zarzuelo, J. Gálvez, Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis, *Clin. Nutr.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2005.12.009>.
- [105] A. Mullen, C.E. Loscher, H.M. Roche, Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages, *J. Nutr. Biochem.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.02.008>.
- [106] V. Pallarès, D. Calay, L. Cedó, A. Castell-Auví, M. Raes, M. Pinent, A. Ardévol, L. Arola, M. Blay, Enhanced anti-inflammatory effect of resveratrol and EPA in treated endotoxin-activated RAW 264.7 macrophages, *Br. J. Nutr.* (2012). <https://doi.org/10.1017/S0007114511007057>.
- [107] Y. Zhao, S. Joshi-Barve, S. Barve, L.H. Chen, Eicosapentaenoic Acid Prevents LPS-Induced TNF- α Expression by Preventing NF- κ B Activation, *J. Am. Coll. Nutr.* (2004). <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719345>.
- [108] T.E. Novak, T.A. Babcock, D.H. Jho, W.S. Helton, N.J. Espat, NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α -transcription, *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* (2003). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00077.2002>.
- [109] M. Serasanambati, S.R. Chilakapati, Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Human Diseases-A Review, *South Indian J. Biol. Sci.* (2016). <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443>.
- [110] J.G. Martins, Epa but not dha appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: Evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials, *J. Am. Coll. Nutr.* (2009). <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719785>.
- [111] E.F.H. Saunders, A. Reider, G. Singh, A.J. Gelenberg, S.I. Rapoport, Low unesterified: Esterified eicosapentaenoic acid (EPA) plasma concentration ratio is associated with bipolar disorder episodes, and omega-3 plasma concentrations are altered by treatment, *Bipolar Disord.* (2015).

<https://doi.org/10.1111/bdi.12337>.

- [112] S. Frangou, M. Lewis, P. McCrone, Efficacy of ethyl-eicosapentaenoic acid in bipolar depression: Randomised double-blind placebo-controlled study, in: *Br. J. Psychiatry*, 2006. <https://doi.org/10.1192/bjp.188.1.46>.
- [113] T.C. Adarme-Vega, D.K.Y. Lim, M. Timmins, F. Vernen, Y. Li, P.M. Schenk, Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production, *Microb. Cell Fact.* (2012). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>.
- [114] H. Wang, Y. Zhang, L. Chen, W. Cheng, T. Liu, Combined production of fucoxanthin and EPA from two diatom strains *Phaeodactylum tricorutum* and *Cylindrotheca fusiformis* cultures, *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2018). <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1935-y>.
- [115] H. Jiang, K. Gao, Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae), *J. Phycol.* (2004). <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03112.x>.
- [116] Z.Y. Wen, F. Chen, Continuous cultivation of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: Physiological study and process optimization, *Biotechnol. Prog.* (2002). <https://doi.org/10.1021/bp010125n>.
- [117] Z.Y. Wen, F. Chen, Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*, *Biotechnol. Lett.* (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1005666219163>.
- [118] J. Zimmermann, R. Jahn, B. Gemeinholzer, Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols, *Org. Divers. Evol.* 11 (2011) 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>.
- [119] R.R.L. Guillard, C.J. Lorenzen, YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C2, *J. Phycol.* 8 (n.d.) 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>.
- [120] S. Gérin, P. Leprince, F.E. Sluse, F. Franck, G. Mathy, New features on the environmental regulation of metabolism revealed by modeling the cellular proteomic adaptations induced by light, carbon, and inorganic nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1–28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01158>.
- [121] W.J. Bligh, E.G. and Dyer, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959).
- [122] D.A. Cataldo, M.H. Haroon, L.E. Schrader, V.L. Youngs, Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6 (1975) 71–80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>.
- [123] P. Tocquin, A. Fratamico, F. Franck, Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9771-3>.
- [124] C.X. Galhardo, J.C. Masini, Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using molybdenum blue chemistry, *Anal. Chim. Acta.* 417 (2000) 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00933-8).
- [125] M. Taraldsvik, S. Myklestad, The effect of pH on growth rate, biochemical composition and

- extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*, *Eur. J. Phycol.* (2000). <https://doi.org/10.1080/09670260010001735781>.
- [126] N. Lundholm, P.J. Hansen, Y. Kotaki, Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (2004). <https://doi.org/10.3354/meps273001>.
- [127] R. V. Smith, R.H. Foy, Improved hydrogen ion buffering of media for the culture of freshwater algae, *Br. Phycol. J.* (1974). <https://doi.org/10.1080/00071617400650271>.
- [128] J. MCLACHLAN, SOME CONSIDERATIONS OF THE GROWTH OF MARINE ALGAE IN ARTIFICIAL MEDIA., *Can. J. Microbiol.* (1964). <https://doi.org/10.1139/m64-098>.
- [129] A. Blanchemain, D. Grizeau, J.C. Guary, Effect of different organic buffers on the growth of *Skeletonema costatum* cultures; further evidence for an autoinhibitory effect, *J. Plankton Res.* (1994). <https://doi.org/10.1093/plankt/16.10.1433>.
- [130] C. Tantanararit, A.J. Englande, S. Babel, Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.05.004>.
- [131] K. Thamtrakoln, M. Hildebrand, Silicon uptake in diatoms revisited: A model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters, *Plant Physiol.* (2008). <https://doi.org/10.1104/pp.107.107094>.
- [132] J. Jia, D. Han, H.G. Gerken, Y. Li, M. Sommerfeld, Q. Hu, J. Xu, Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions, *Algal Res.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.005>.
- [133] F. Guihéneuf, D.B. Stengel, 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.* (2013). <https://doi.org/10.3390/md11114246>.
- [134] I.M. Remmers, D.E. Martens, R.H. Wijffels, P.P. Lamers, Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities, *PLoS One.* (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175630>.
- [135] C.Y. Chen, Y.C. Chen, H.C. Huang, S.H. Ho, J.S. Chang, Enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using innovative photobioreactors with optimal light source arrangements, *Bioresour. Technol.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.001>.
- [136] N. Gu, Q. Lin, G. Li, G. Qin, J. Lin, L. Huang, Effect of Salinity Change on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata*, *J. World Aquac. Soc.* (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00538.x>.
- [137] J. Camacho-Rodríguez, M.C. Cerón-García, C. V. González-López, J.M. Fernández-Sevilla, A. Contreras-Gómez, E. Molina-Grima, A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture, *Bioresour. Technol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.083>.
- [138] Y. Jiang, F. Chen, Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid

- production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*, *JAOCS*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2000). <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0099-0>.
- [139] M. Petrushkina, E. Gusev, B. Sorokin, N. Zotko, A. Mamaeva, A. Filimonova, M. Kulikovskiy, Y. Maltsev, I. Yampolsky, E. Guglya, V. Vinokurov, Z. Namsaraev, D. Kuzmin, Fucoxanthin production by heterokont microalgae, *Algal Res.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.016>.
- [140] P. Boelen, R. van Dijk, J.S.S. Damsté, W.I.C. Rijpstra, A.G.J. Buma, On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production, *AMB Express.* (2013). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-26>.
- [141] B. Gao, A. Chen, W. Zhang, A. Li, C. Zhang, Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions, *J. Ocean Univ. China.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3174-2>.
- [142] F.G. Acién Fernández, D.O. Hall, E. Cañizares Guerrero, K. Krishna Rao, E. Molina Grima, Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor, *J. Biotechnol.* (2003). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00101-9).
- [143] J.M. Fernández Sevilla, M.C. Cerón García, A. Sánchez Mirón, E.H. Belarbi, F. García Camacho, E. Molina Grima, Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fed-batch mode, *Biotechnol. Prog.* (2004). <https://doi.org/10.1021/bp034344f>.
- [144] G. Li, D.A. Campbell, Rising CO₂ Interacts with Growth Light and Growth Rate to Alter Photosystem II Photoinactivation of the Coastal Diatom *Thalassiosira pseudonana*, *PLoS One.* (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055562>.
- [145] A. McCarthy, S.P. Rogers, S.J. Duffy, D.A. Campbell, Elevated carbon dioxide differentially alters the photophysiology of *thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae) and *emiliana huxleyi* (haptophyta), *J. Phycol.* (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01171.x>.
- [146] P.K. Bienfang, P.J. Harrison, L.M. Quarmby, Sinking rate response to depletion of nitrate, phosphate and silicate in four marine diatoms, *Mar. Biol.* (1982). <https://doi.org/10.1007/BF00397670>.
- [147] J.S. Parslow, P.J. Harrison, P.A. Thompson, Saturated uptake kinetics: transient response of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* to ammonium, nitrate, silicate or phosphate starvation, *Mar. Biol.* (1984). <https://doi.org/10.1007/BF00393085>.
- [148] Q. Dortch, Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* (1982). [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90072-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90072-7).
- [149] G.R. Seely, M.J. Duncan, W.E. Vidaver, Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide, *Mar. Biol.* (1972). <https://doi.org/10.1007/BF00350754>.
- [150] K. Mori, T. Ooi, M. Hiraoka, N. Oka, H. Hamada, M. Tamura, T. Kusumi, Fucoxanthin and Its Metabolites in Edible Brown Algae Cultivated in Deep Seawater, *Mar. Drugs.* (2004). <https://doi.org/10.3390/md202063>.
- [151] S.M. Kim, S.W. Kang, O.N. Kwon, D. Chung, C.H. Pan, Fucoxanthin as a major carotenoid in

- Isochrysis aff. galbana: Characterization of extraction for commercial application, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. (2012). <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2108-3>.
- [152] V. Pasquet, J.R. Chérouvrier, F. Farhat, V. Thiéry, J.M. Piot, J.B. Bérard, R. Kaas, B. Serive, T. Patrice, J.P. Cadoret, L. Picot, Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction, Process Biochem. (2011). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>.
- [153] D.D. McClure, A. Luiz, B. Gerber, G.W. Barton, J.M. Kavanagh, An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*, Algal Res. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.015>.
- [154] W. Yongmanitchai, O.P. Ward, Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions, Appl. Environ. Microbiol. (1991). <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.419-425.1991>.
- [155] T. Christmadha, M.A. Borowitzka, Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor, J. Appl. Phycol. (1994). <https://doi.org/10.1007/BF02185906>.
- [156] A. Converti, A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, P. Perego, M. Del Borghi, Nitrogen metabolism in phytoplankton, Chem. Eng. Process. Process Intensif. (2009).
- [157] N.S. Shifrin, S.W. Chisholm, PHYTOPLANKTON LIPIDS: INTERSPECIFIC DIFFERENCES AND EFFECTS OF NITRATE, SILICATE AND LIGHT-DARK CYCLES, J. Phycol. (1981). <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1981.00374.x>.
- [158] H.R. Molitor, E.J. Moore, J.L. Schnoor, Maximum CO₂ Utilization by Nutritious Microalgae, ACS Sustain. Chem. Eng. (2019). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00656>.
- [159] Y. Shen, W. Yuan, Z. Pei, E. Mao, Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production, Appl. Biochem. Biotechnol. (2010). <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8659-z>.
- [160] T. Bin Hao, Y.F. Yang, S. Balamurugan, D.W. Li, W.D. Yang, H.Y. Li, Enrichment of f/2 medium hyperaccumulates biomass and bioactive compounds in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, Algal Res. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101872>.
- [161] W. Admiraal, Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture, Mar. Biol. (1976). <https://doi.org/10.1007/BF00395586>.
- [162] D.J.S. Montagnes, D.J. Franklin, Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms, Limnol. Oceanogr. (2001). <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.8.2008>.
- [163] Y. Suzuki, M. Takahashi, GROWTH RESPONSES OF SEVERAL DIATOM SPECIES ISOLATED FROM VARIOUS ENVIRONMENTS TO TEMPERATURE, J. Phycol. (1995). <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00880.x>.
- [164] L.M. Lois, M. Rodríguez-Concepción, F. Gallego, N. Campos, A. Boronat, Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, Plant J. (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00764.x>.

- [165] M. Albrecht, N. Misawa, G. Sandmann, Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β -carotene and zeaxanthin, *Biotechnol. Lett.* (1999). <https://doi.org/10.1023/A:1005547827380>.
- [166] U. Eilers, A. Bikoulis, J. Breitenbach, C. Büchel, G. Sandmann, Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 123–129. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0583-8>.