HAL
open science

Amélioration de microalgues à vocation énergétique par pression de sélection continue

Hubert Bonnefond

To cite this version:

Hubert Bonnefond. Amélioration de microalgues à vocation énergétique par pression de sélection continue. Océanographie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066719 . tel-01660510

HAL Id: tel-01660510

https://theses.hal.science/tel-01660510v1

Submitted on 11 Dec 2017

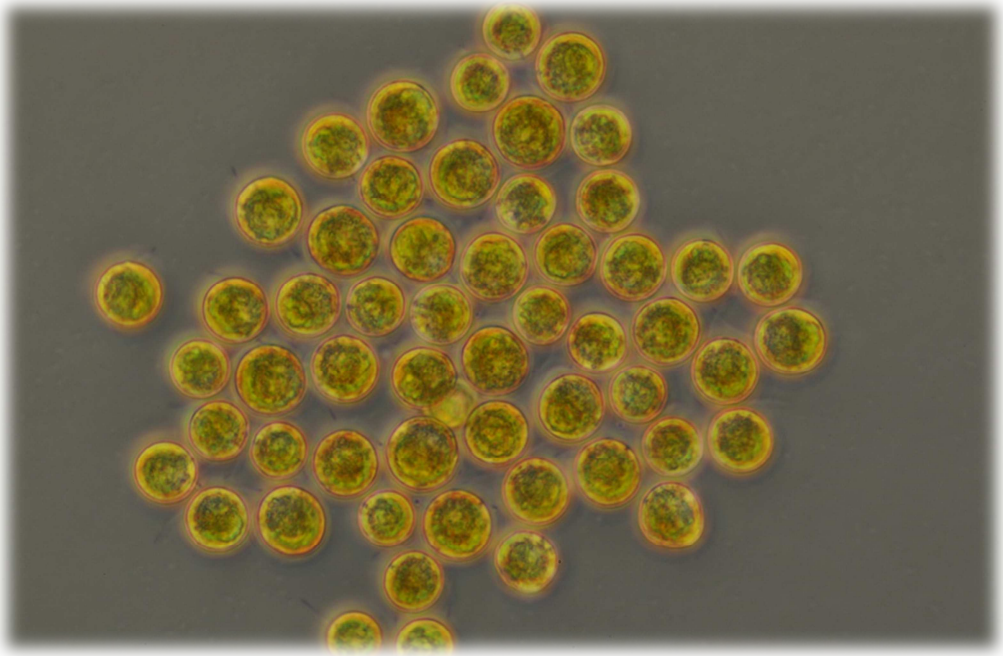
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Université Pierre et Marie Curie, ED 129

Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer

Amélioration de microalgues à vocation énergétique par pression de sélection continue



Hubert Bonnefond

Antoine Sciandra et Olivier Bernard : *directeurs de thèse*

Présentée et soutenue publiquement le 09 décembre 2015

Jean-Paul Cadoret : *rapporteur*

Tomas Morosinotto : *rapporteur*

Gael Bougaran : *examinateur*

Luis-miguel Chevin : *examinateur*

Patrick Mayzaud : *examinateur*

Alice Gueudet : *invité*

REMERCIEMENTS.

Pour avoir financé mon travail, et m'avoir donné l'occasion de faire partie d'un réseau, au centre de mes préoccupations, merci à l'ADEME et à la région PACA.

Pour m'avoir fait découvrir que dans la mer, il y a autre chose que de l'eau, du sel et de la crème solaire, merci au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer et à tous ses occupants.

Pour m'avoir fait découvrir avec étonnement la modélisation (et les pieuvres), merci à l'équipe BIOCORE et à Jean-Luc Gouzé.

Pour avoir suivi ma thèse depuis Nantes, m'avoir toujours accueilli chaleureusement quand, transi par le vent du Nord, je venais me risquer chez vous, merci à Gaël Bougaran et à la formidable équipe PBA de l'IFREMER.

Pour m'avoir sauvé la mise une paire de fois, merci à Corinne Poutier.

Pour les conseils scientifiques avisés et le regard expert sur mon travail en biochimie, merci à Patrick Mayzaud.

Pour l'aide technique, les formations et sa patience, merci à Marc Boutoute.

Pour avoir trouvé tout ce que je cherchais (avant même que je ne le cherche), m'avoir conseillé habillement et aidé dans la réalisation de mes expériences, merci à Amélie Talec.

Pour m'avoir cassé les oreilles pendant 4 ans mais pas que, merci à Eric Pruvost.

Pour la suite, merci d'avance à Christophe Vasseur.

Pour m'avoir fait réécrire 27 fois ma première publication et tous les clins d'œil, merci à Antoine Sciandra.

Pour m'avoir donné ma chance, m'avoir soutenu et m'encourager (subtilement), merci à Olivier Bernard.

Pour tout le reste, merci à Sophie Marro.

Merci à tous les occupants du terrier qui s'y sont succédés et m'ont supporté avec autant de bonne humeur.

Je ne peux citer tous les très bons amis qui m'ont m'accompagnés pendant la réalisation de ce travail, mais je peux tous les remercier, alors merci !

Enfin merci aux casse-pieds, trop nombreux, trop souvent oubliés et qui pourtant donnent à la vie tout son charme.

SOMMAIRE.

A. CONTEXTE : DU PETROLE AUX BIOCARBURANTS 1

I. Un triptyque inquiétant : une demande en énergie fossile croissante pour une offre en baisse sur fond de réchauffement climatique. **3**

i. Une demande en énergie fossile croissante 3
ii. 2050 : une pénurie annoncée ? 4
iii. Les énergies fossiles, source principale de gaz à effet de serre 5

II. Les biocarburants : un élément de réponse ? **7**

i. Les biocarburants qu'est-ce que c'est ? 7
ii. L'utilisation des microalgues autour du monde aujourd'hui. 9

III. Biocarburants à base d'algues : des verrous nombreux sur toute la chaine de valeur **11**

IV. Objectif de la thèse **14**

B. ETAT DE L'ART : LA COMPREHENSION DES MECANISMES D'ACCUMULATION DU CARBONE ET LEURS CONSEQUENCES POUR LA SELECTION DE SOUCHES PLUS PRODUCTIVES. 15

I. Quelles algues: rapide tableau de famille **17**

i. Dunaliella salina : entre lipides et bêta-carotène 17
ii. Tisochrysis lutea W2X : une algue obtenue par mutation/sélection 18
iii. *Cylindrotheca closterium* : une diatomée benthique 19

II. Le stockage des lipides chez les algues, un phénomène complexe **20**

i. Les lipides : distinction entre lipides de réserve et lipides structurels 20
ii. Le métabolisme des lipides chez les microalgues 24
iii. Localisation des lipides et du bêta-carotène 28
iv. Dynamique des réserves énergétiques durant le cycle cellulaire en conditions optimales de croissance 29
v. Facteurs modifiant l'accumulation des réserves 31

III. La sélection, qu'est-ce que c'est ? Concepts et avancées **36**

i. De Malthus à Darwin: la sélection naturelle 37
ii. Pas de sélection sans élimination : la culture en continu, base de la sélection de microorganismes. 39
iii. La compréhension fondamentale des mécanismes d'évolution : utilisation des microorganismes comme modèle d'étude 43
iv. La sélection des microalgues appliquée aux biotechnologies..... 44

C. MATERIELS ET METHODES 53

I. Préparation du milieu de culture et inoculation..... 55

II. La culture des algues : utilisation de deux types de photobioréacteurs 55

i. Un logiciel de gestion des cultures commun : ODIN 55
ii. Des photobioréacteurs cylindriques en verre pour la compréhension de la physiologie..... 56
iii. Des photobioréacteurs plans, les sélectiostats, pour la sélection par pression continue. ... 57

III. Les mesures automatiques. 59

i. Densité cellulaire et taux de croissance 60
ii. Mesure de la concentration en nitrates et nitrites 62

IV. Les analyses biochimiques 63

i. Carbone et azote particulaires 63
ii. La méthode classique de dosage des lipides, lente mais précise 64
iii. Le dosage des piments 66

V. La sélection 67

D. LA COMPREHENSION DE LA PHYSIOLOGIE DES ALGUES : UNE PREMIERE ETAPE VERS LA SELECTION 69

I. La température : un paramètre clef, au cœur des mécanismes biochimiques, trop souvent reléguée au second plan. 71

i. Introduction..... 71
ii. Materials and methods 73
iii. Results 76

iv. Discussion 83
v. Conclusion 88
vi. Acknowledgements 88

II. La production de lipides et de caroténoïdes chez *D. salina* sous limitation et carence en azote. 89

i. Introduction 89
ii. Materials and methods 91
iii. Results 95
iv. Discussion 102
v. Conclusion 107
vi. Acknowledgements 107

E. BOITE A OUTILS POUR LE SCREENING DE SOUCHES PLUS PRODUCTIVES EN LIPIDES 109

I. Screening d'une souche de *D. salina* plus riche en bêta-carotène par isolement monoclonal. 111

i. Les étapes du screening : d'une population hétérogène à l'obtention d'un clone productif 112
ii. Pré-caractérisation : vert, orange, deux phénotypes très différents. 114

II. Des méthodes rapides et reproductibles de dosage des lipides : utilisation du Nile red 115

i. L'utilisation du Nile red et du Bodipy pour la mesure des lipides chez les microalgues..... 117
ii. Des méthodes rapides et reproductibles de dosage des lipides. Pourquoi la spectrophotométrie UV ne fonctionne pas ? 147

III. Conclusions, utilisations futures et perspectives.....157

F. LA SELECTION PAR PRESSION CONTINUE NON OGM : UNE APPLICATION DES THEORIES DE DARWIN 159

I. La sélection par pression continue pour améliorer la réponse de *Tisochrysis lutea* à la température 161

i. Introduction 161

ii. Materials and methods 164
iii. Results and discussion. 170
iv. Conclusion 180

II. L'alternance nutrition-carence comme outil de sélection de souches plus grasses ? 181

i. Introduction : les pulses d'azote comme paramètre de sélection. 181
ii. Matériels et méthodes 184
iii. Résultats 186
iv. Discussion 189
v. Conclusions 192

III. Transparence accrue pour une biomasse finale accrue ? 193

i. Introduction : le contenu en pigment, fonction de l'intensité lumineuse 193
ii. Matériel et méthode 196
iii. Résultats 201
iv. Discussion 209
v. Conclusions 215

G. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 217

I. La compréhension de la physiologie des microalgues et la construction de modèles prédictifs : outils de décision pour la sélection 220

i. Les variations journalières de la température, paramètre clef du métabolisme 220
ii. L'apport en nutriment : contenu en lipides versus productivité 223

II. La sélection par pression de sélection : une approche novatrice et prometteuse 225

i. 3 expériences de longue durée pour trois aspects de la sélection 226
ii. Perspectives 230

III. Conclusion 235

H. BIBLIOGRAPHIE 237

A. CONTEXTE : DU PETROLE AUX BIOCARBURANTS

Tout est bien, tout va bien, tout va le mieux qui soit possible.
Voltaire (1694 – 1778)

I. Un triptyque inquiétant : une demande en énergie fossile croissante pour une offre en baisse sur fond de réchauffement climatique.

i. Une demande en énergie fossile croissante

Depuis le début du XIXième siècle et avec les premières machines à vapeur, la demande en énergie fossile carbonée n'a fait que croitre de manière exponentielle. Ces énergies regroupent principalement le pétrole, le gaz naturel et le charbon. Elles représentent aujourd'hui plus de 80 % de l'énergie consommée dans le monde (plus de 65 % en France), loin devant la biomasse (dont le bois), le nucléaire et l'hydraulique (Fig. A1).

Le pétrole représente 1/3 de l'énergie utilisée sur terre. En raison de son contenu énergétique très élevé, il est particulièrement bien adapté aux utilisations embarquées (voitures, avions). En 2013, la production mondiale était de 86 millions de barils par jour contre 66 millions en 1991. La consommation en France représente environ 2% (2 millions de barils) de la consommation mondiale et cela de manière assez constante (BPstats, 2014). Les besoins mondiaux sont en augmentation alors même que la durabilité du système 'tout-pétrole' est de plus en plus critiquée.

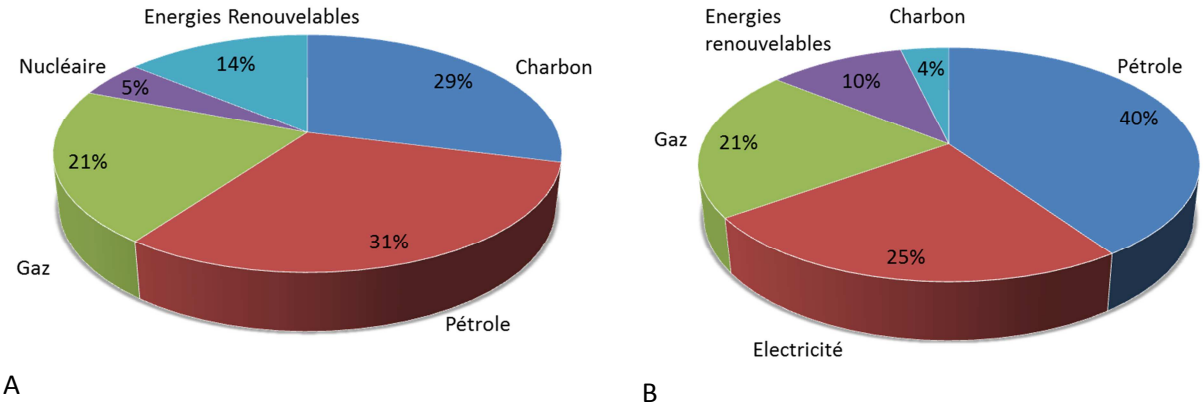


Figure A1 : A) Répartition de l'énergie consommée dans le monde. B) Répartition de l'énergie consommée en France, corrigée des variations climatiques. AIE 2014 ; Service de l'observation des statistiques, Ministère de l'écologie, Soes, bilan de l'énergie 2014.

ii. 2050 : une pénurie annoncée ?

Le pétrole est, d'une certaine façon, une énergie renouvelable à des échelles géologiques. Il se forme sur plusieurs millions d'années par la décomposition anoxique de végétaux. A l'échelle de l'humanité, c'est par contre une ressource non renouvelable. Les estimations des réserves restantes divergent fortement. Le sujet étant un enjeu de l'économie mondiale, de nombreux débats politico-scientifiques s'invitent dans les estimations et floutent les prospectives. En fonction des scénarios prédictifs, le peak-oil, correspondant au maximum de production permis par les ressources naturelles, se profile d'ici à l'an 2050. Comme il est certain que le pétrole conventionnel est en voie d'épuisement, les industriels de l'énergie se tournent maintenant, et de manière très concrète, vers des formes de pétrole économiquement moins intéressantes à extraire car moins accessibles (gaz de schiste, sable bitumineux, etc…). De plus, et dans une vision plus Franco-centrée, l'extraction de ressources fossiles n'est plus réalisée sur notre territoire, le peak-oil français datant de 1988. Une extraction non conventionnelle de pétrole semble encore possible mais à un coût écologique discutable. La France est donc largement dépendante (à plus de 98,5%) de ses importations en pétrole (le taux d'indépendance énergétique global est de 55%). Cette dépendance entraine une faiblesse économique et politique vis-à-vis d'un certain nombre de pays producteurs de pétrole. Enfin et malheureusement, l'aspect économique n'est pas le seul problème. De par sa nature même, le pétrole, dégage, depuis son raffinage jusqu'à sa combustion, d'importantes quantités de gaz à effet de serre dont le CO_2 (ADEME, 2014).

iii. Les énergies fossiles, source principale de gaz à effet de serre

L'effet de serre est un phénomène classique et bien connu sur terre. Il permet tout simplement la vie. Un certain nombre de gaz atmosphériques (H_2O, CO_2, NO_x, CH_4), forment une enveloppe protectrice et renvoient vers notre planète une partie du rayonnement solaire qu'elle réfléchit. Cela permet d'obtenir une température moyenne de +15°C au lieu des -18°C attendus sans ce mécanisme. Malheureusement, les activités humaines accentuent cet effet en augmentant les concentrations de gaz à effet de serre (Fig. A2, A). L'effet le plus direct et le plus connu est la hausse de la température moyenne du globe, laquelle entraine une élévation du niveau moyen des océans *via,* la fonte des glaces et la dilatation thermique de l'eau de mer (Fig. A2, B).

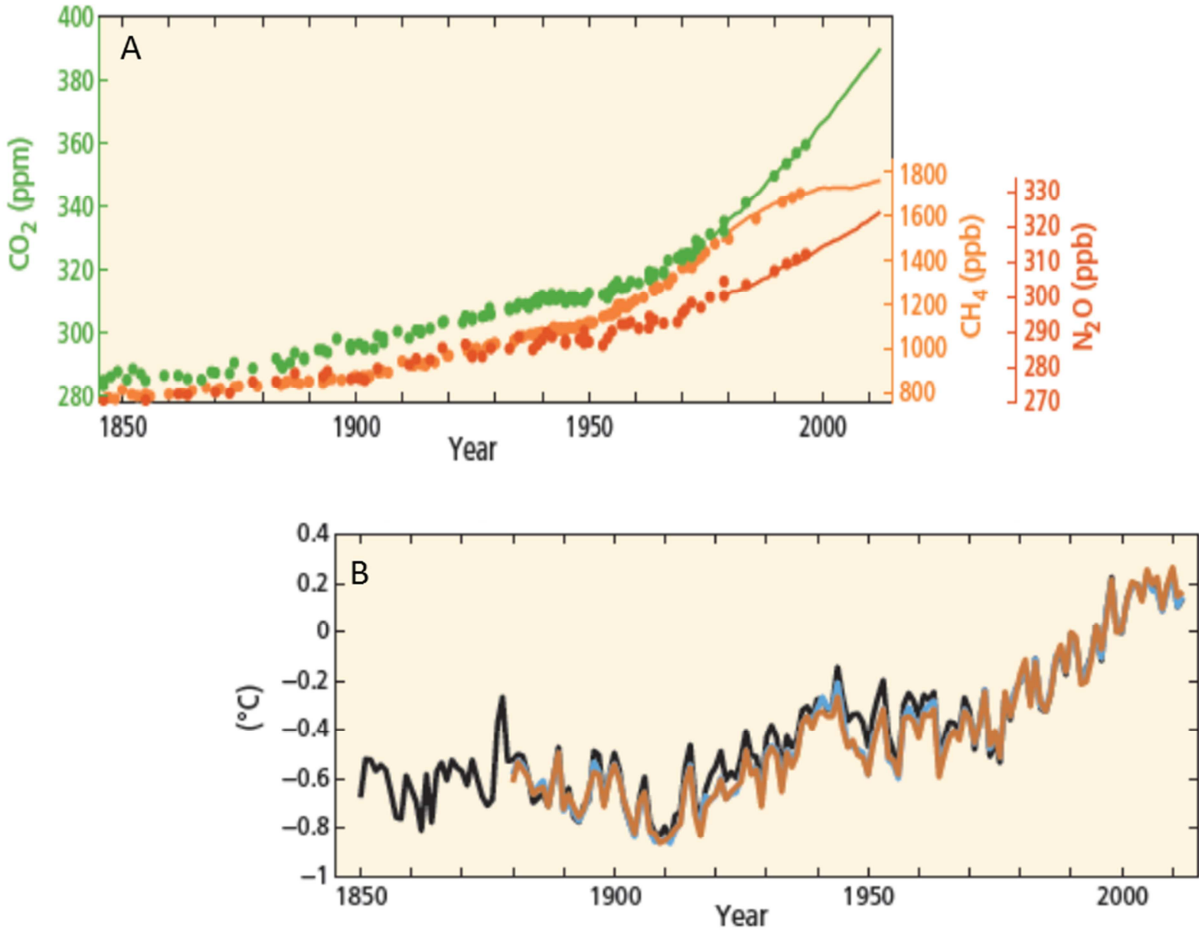


Figure A2 : Augmentation des gaz à effet de serre et ses conséquences. A) Evolution de la concentration moyenne à l'échelle du globe des principaux gaz à effet de serre. B) Evolution de l'anomalie de température moyenne à l'échelle du globe sur terre et dans les mers combinées. Rapport du GIEC 2013.

Les modifications que cela entraine sur la géosphère et la biosphère ainsi que sur l'Homme et la société sont mal cernées (Fig. A3). La France, ainsi que la plupart des pays occidentaux, intervient de manière prédominante dans le rejet massif de gaz à effet de serre et dans le réchauffement climatique (Matthews et al., 2014). Il est donc nécessaire de trouver des solutions, en particulier dans le domaine des transports qui totalisent à lui seul 14% des émissions de gaz à effet de serre (ADEME, 2014).

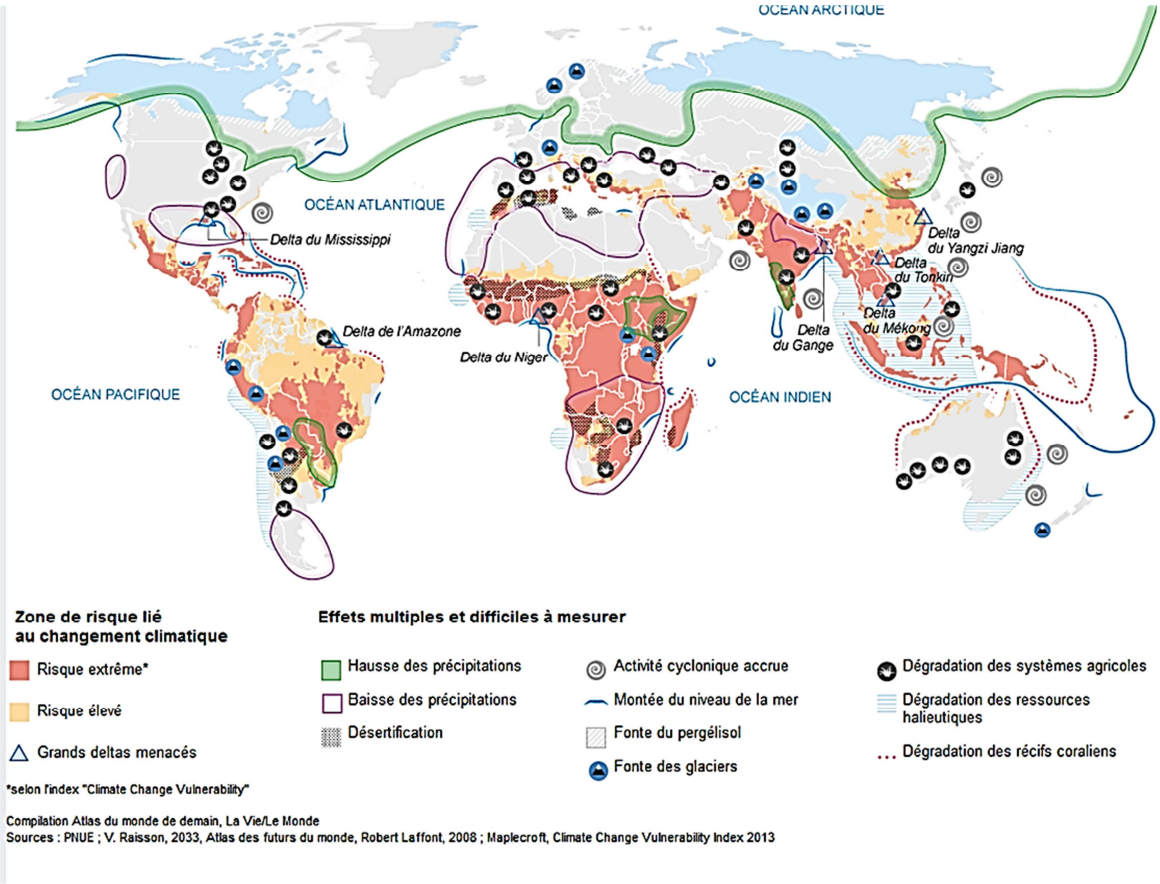


Figure A3 : Conséquence de l'augmentation des gaz à effet de serre à l'échelle mondiale sur l'Homme et son environnement. PNUE ; V Raisson, 2033 Atlas des futurs du monde, Robert Laffont, 2008.

II. Les biocarburants : un élément de réponse ?

i. Les biocarburants qu'est-ce que c'est ?

Un biocarburant est un carburant produit à partir de matériaux organiques non fossiles. En utilisant la biomasse végétale comme source d'énergie, les biocarburants permettent de limiter les émissions de CO_2. En effet, la biomasse pour croitre, fixe le CO_2 sous forme de carbone organique *via* la photosynthèse. Elle le libère ensuite lors de sa combustion tout en restituant l'énergie accumulée. Le bilan des émissions de CO_2 est donc, en théorie, nul. En pratique, lorsque l'ensemble du cycle de vie des biocarburants est considéré, ce n'est pas le cas. C'est d'ailleurs un des défis des recherches en cours et à venir. Les biocarburants peuvent être obtenus par deux procédés radicalement différents. Une approche physico-chimique permet, en utilisant habilement des contraintes physiques fortes (hautes températures, hautes pressions) et/ou des produits chimiques (catalyse acide, basique), de déstructurer la matière (pyrolyse, torréfaction, gazéification, liquéfaction hydrothermale). Elle se retrouve ainsi transformée soit directement en biocarburant soit en monomères fermentescibles qui seront eux-mêmes convertis en molécules d'intérêt par des microorganismes. Une deuxième approche, purement biologique, permet de produire des biocarburants en utilisant directement la biomasse ou après fermentation de monomère. Schématiquement, deux grands types de produits peuvent alors être obtenus, les alcools destinés aux moteurs à essence et des huiles/hydrocarbures destinés aux moteurs diesel (Fig. A4).

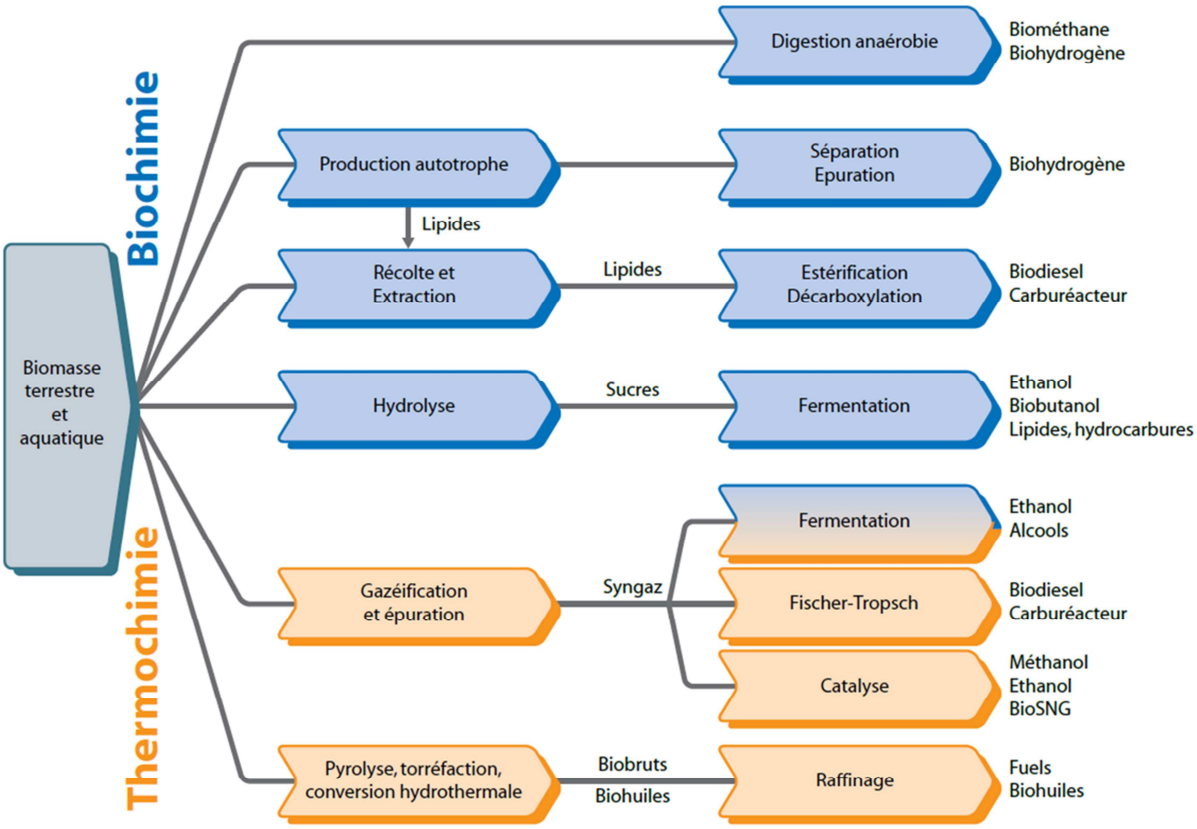


Figure A4 : Procédés de production de biocarburants à partir de différentes biomasses

Enfin, trois générations de biodiesel coexistent (c'est également vrai pour le bio-éthanol). Elles se différencient par leur degré de maturité et le type de biomasse utilisée. La première consiste à utiliser les organes de réserve de la plante (graines de tournesol, colza, lin, palme…) pour en extraire une huile qui sera ensuite trans-estérifiée en biodiesel. La seconde génération, généralement *via*, des procédés physico-chimiques, transforme la biomasse carbonée (résidus de culture, bois, etc…) en un condensa de pétrole. La première génération, déjà exploitée, ainsi que la seconde dont le degré de maturité est élevé, ont fait l'objet de polémiques, en particulier sur les problématiques de souveraineté alimentaire et de conflits d'usage. Néanmoins, il semblerait que l'impact de ces nouveaux débouchés agricoles sur les prix de la nourriture soit moins marqué que prévu. En effet, le prix des ressources alimentaires est principalement lié au cours du pétrole, et la production de biodiesel de première génération en Europe n'a augmenté le coût des aliments que de 4% jusqu'en 2010, et devrait se limiter à 10% d'ici l'an 2020 (Ecofys, 2013). Cela entraine par contre un changement d'affectation des sols (passage d'un type de couverture végétale à un autre), dont les

conséquences sur le climat sont particulièrement néfastes. Dans ce contexte houleux, les biocarburants de troisième génération à base de microorganismes et particulièrement les microalgues offrent une alternative prometteuse. En particulier, ils peuvent être produits sur des terres non arables, sans utilisation d'eau potable, avec des rendements bien supérieurs aux plantes terrestres (x10 à 30) et en réutilisant le CO_2 d'origine industrielle dans le cas de l'autotrophie (Cadoret & Bernard, 2009).

ii. L'utilisation des microalgues autour du monde aujourd'hui.

D'un point de vue historique, la première évocation de la consommation de microalgues remonte à l'époque du conquistador Cortès, qui rapporta dans ses mémoires la curieuse habitude des incas de promener à la surface des lacs, des filets très serrés pour récolter une boue verte qu'ils consommaient sous forme de galettes séchées. Bien plus près de nous, la culture industrielle à grande échelle de microalgues a débuté dans les années 1960 au Japon pour une application aquacole. Aujourd'hui, la production mondiale se situe aux alentours de 15 000 T pour un marché en 2010 estimé entre 600 millions et 3,3 milliards d'euros, soit un prix de revient moyen de la biomasse d'algues ou des molécules extraites se situant 40 et 220€.Kg^{-1} (étude ENEA & INRIA, 2014). A ce prix, la production industrielle de biocarburants à base de microalgues ne peut pas être une réalité. Les technologies, encore très jeunes, ne sont pas viables économiquement.

Par contre, pour des applications de plus hautes valeurs ajoutées, cette filière est en pleine émergence. Les produits issus des microalgues peuvent se répartir en trois catégories (Fig. A5). Les produits à faibles valeurs ajoutées dont les coûts de production actuels ne permettent toujours pas l'industrialisation. Les produits de moyenne/haute valeur ajoutée (10 - 80 $US.$kg^{-1}$), tels que ceux destinés à l'alimentation humaine, se développent déjà (algue entière). Enfin, les produits à très haute valeur ajoutée tels que ceux destiné à la cosmétique sont un débouché prometteur avec des molécules cibles comme le bêta-carotène (300 - 3000 $USkg^{-1}) ou l'astaxanthine (>2000 $US.$kg^{-1}$)

dont les prix dépendent de la pureté. Néanmoins, ces marchés sont très compétitifs, l'offre actuelle, issue de l'industrie pétrochimique, ayant souvent saturé le marché. En revanche, le marché de la nutrition humaine/santé avec des molécules telles que l'acide docosahexaenoique, DHA ou l'acide les acides gras polyinsaturés à longues chaines (typiquement, eicosapentaenoique, EPA), dont le prix oscille entre 50 et 4600 $US.kg^{-1} connaissent un réel essor, lié à l'épuisement des ressources halieutiques, principale pourvoyeur de ces molécules essentielles (Koller, Muhr, & Braunegg, 2014 ; Etude ENEA & INRIA, 2014). Les trois principales espèces produites sont *Spirulina sp* (5 kT.an^{-1}), *Chlorella sp* (2 kT.an^{-1}) et *Dunaliella sp* (1.2 kT.an^{-1}).

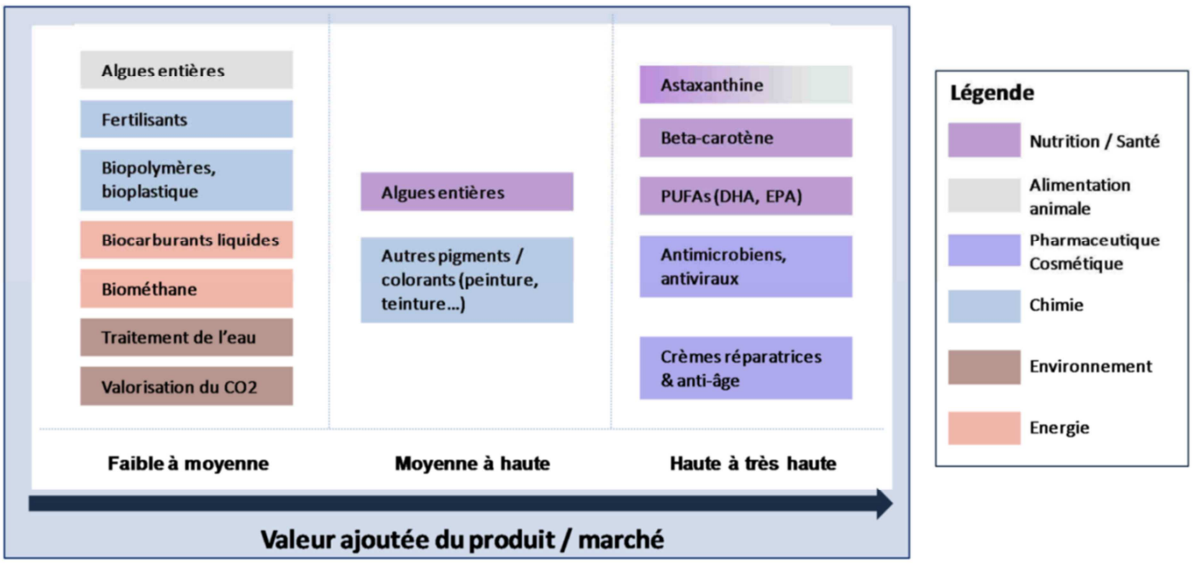


Figure A5 : principaux produits issus des microalgues par secteur d'application et valeur ajoutée

III. Biocarburants à base d'algues : des verrous nombreux sur toute la chaine de valeur.

De nombreux verrous technologiques rendent les coûts de production trop élevés (Fig. A6). Il est donc nécessaire d'optimiser l'intégralité du procédé vers un but finalement simple : produire plus d'énergie que requis par le procédé et limiter les intrants. En ne considérant que des technologies matures actuellement, les systèmes de culture produisent un gain net en énergie de +35% (Lardon, Hélias, Sialve, Steyer, & Bernard, 2009). Cette étude, la première du genre, montre l'importance de minimiser l'impact d'un certain nombre de paramètres clefs tels que l'apport en nutriment, l'énergie investie pour la récolte, le séchage de la biomasse, ou encore l'électricité pour homogénéiser les microalgues. Il est également essentiel de maximiser la productivité biologique en optimisant les conditions de culture. Plus en amont, la recherche d'espèces et l'utilisation de souches sélectionnées hyper-productives sont essentielles pour atteindre des productivités significativement accrues. Les méthodes de sélection s'affranchissant des OGM, représentent donc un défi important pour l'avenir de la filière microalgue.

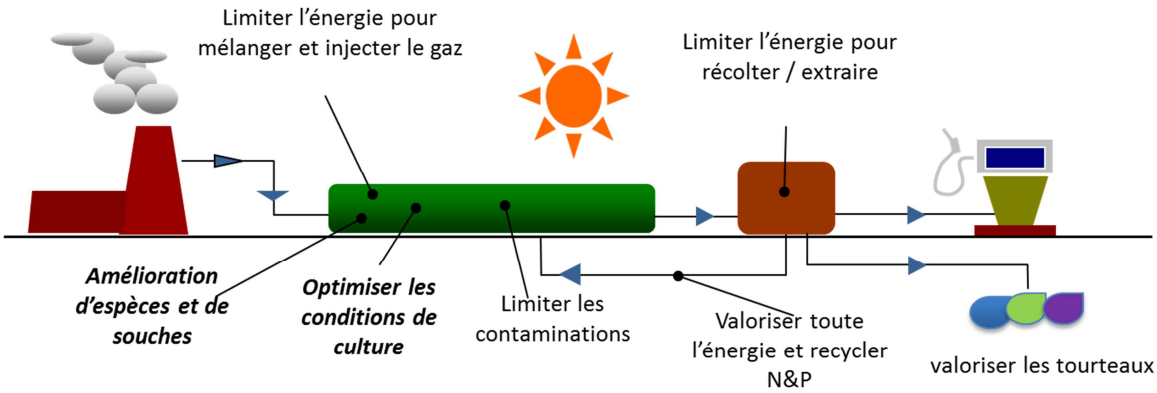


Figure A6 : la production des microalgues et les verrous associés à chaque étape

Partant de ce constat, le projet ANR Facteur 4 a vu le jour. Il vise à améliorer la productivité en lipides de souches de microalgues, *à minima* d'un facteur 4 sans recourir aux technologies OGM. Ce projet regroupe trois laboratoires. Le Laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues, (PBA ; IFREMER Nantes), a développé un protocole de 'mutation-sélection'. Le principe consiste à créer de la diversité génétique par mutagénèse (UV, chimique), puis à sélectionner et isoler les individus d'intérêt pour la production de lipides avec un outil clef, la cytomètrie en flux. Il permet, à l'échelle de la cellule, d'analyser et d'isoler les individus les plus riches en huile. Le second laboratoire impliqué dans ce projet et dans lequel j'ai réalisé ma thèse, est la Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer (LOV ; UPMC-CNRS). La sélection dirigée a été l'implication majeure de ce laboratoire dans ce projet. Il a fallu, dans un premier temps, développer un réacteur de culture dédié, robuste et automatisé: le sélectiostat. Ces nouveaux systèmes ont permis d'exercer une pression de sélection sur une culture continuellement renouvelée, pour faire émerger un nouveau génotype, plus productif. Enfin, le troisième laboratoire impliqué dans ce projet est l'équipe projet BIOCORE (INRIA, Sophia-Antipolis). Ce laboratoire s'est concentré sur le développement, la calibration et la validation de modèles physiologiques de productivité en lipides en fonction des conditions environnementales pour tester, 'in silico', les protocoles de sélection avant de mettre en place ces expériences, très longues. L'INRIA a également conduit un important travail de modélisation théorique de l'évolution des microalgues[1], permettant ainsi de prédire le devenir de mutants dans une population soumise à une pression de sélection. Ces modèles ont été mis en regard des expériences réalisées au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer.

Ce projet, qui touche à sa fin, peut être résumé en quelques résultats clefs. Un Facteur 4 de production de lipides a été obtenu par l'équipe PBA et d'importants travaux de caractérisation génétique sont en cours pour comprendre quels aspects ont été mutés. L'équipe BOCORE par la modélisation, a mis en évidence les effets de la température sur l'évolution des microalgues. Ces travaux ont permis d'optimiser la sélection de souches thermo-tolérantes à une gamme de

[1] Au travers des travaux de Ghjuvan Grimaud, doctorant BIOCORE sur le projet Facteur 4

températures souhaitée. Enfin, les expériences de sélection dirigée, réalisées au LOV, ont mené à une augmentation de la teneur en lipides des microalgues, de leur transparence ainsi que de la gamme de température permettant leur croissance, pour une productivité finale accrue.

IV. Objectif de la thèse

Un état de l'art sur les mécanismes de stockage des lipides et sur les techniques de sélection déjà existantes sera l'objet du chapitre B. Les méthodes et le matériel développés pour la culture et l'analyse des microalgues seront présentés dans la chapitre C. Le Chapitre E sera consacré aux nouveaux outils de mesure des lipides (Nile Red), ainsi qu'à l'étude d'un cas très simple de sélection : le screening d'une nouvelle souche plus productive en bêta-carotène.

Le premier objectif de cette thèse est de mieux comprendre certains aspects de la physiologie des microalgues. En particulier, nous chercherons comment les principaux paramètres forçant que sont la lumière, la température et la disponibilité en nutriments (azote) influent sur la production de biomasse et l'accumulation de molécules d'intérêt telles que les lipides et le bêta-carotène (chapitre D).

Le second objectif sera de sélectionner sur la base des connaissances acquises, des souches de microalgues plus productives. Ces techniques seront basées sur la sélection continue, qui consiste à exercer une pression croissante sur une population pour en faire émerger les individus qui présentent les propriétés recherchées (Chapitre F).

B. ETAT DE L'ART : LA COMPREHENSION DES MECANISMES D'ACCUMULATION DU CARBONE ET LEURS CONSEQUENCES POUR LA SELECTION DE SOUCHES PLUS PRODUCTIVES.

Il faut connaitre précisément la portée des esprits auxquels on parle :
cela demande une science fort solide et un grand discernement.
François de Salignac de la Mothe-Fénelon (1651 – 1715)

Ce chapitre présente dans un premier temps les microalgues utilisées au cours de cette étude. Dans une deuxième partie et après un bref rappel des bases de la biochimie des lipides, un point sur l'avancée des connaissances concernant les mécanismes d'accumulation du carbone et des lipides est réalisé. Enfin, la dernière partie permettra de faire un bilan sur les méthodes d'amélioration de souches de microalgues déjà existantes et, en particulier, la sélection dirigée par pression continue.

I. Quelles algues: rapide tableau de famille

i. *Dunaliella salina* : entre lipides et bêta-carotène

Le genre *Dunaliella sp* fut signalé pour la première fois dans les marais salins de Montpellier en 1838 par Felix Dunal, qui démontra par la même occasion que leur couleur si particulière n'était pas due à leurs conditions physico-chimiques mais bien à la présence de cet organisme. Cela s'avéra, par la suite, partiellement faux car cette coloration rouge est principalement due à la présence d'archae bactéries, halophiles (Oren & Dubinsky, 1994). En 1905, le genre fut indépendamment décrit par E.C. Teodoresco de Bucarest et Clara Hamburger de Heidelberg (Oren, 2005). *Dunaliella* appartient à la famille des Dunaliellaceae (phylum des Chlorophyta). Ce genre est le plus important producteur primaire en milieu hypersalin (salines, lagunes, mer morte, etc…). Le plus souvent de forme ronde ou en poire, il possède en conditions optimales de croissance deux flagelles pour la motilité, et est adapté à une très grande plage de salinités allant de l'eau saumâtre (0.5M) à l'eau saturée en sel (5M) (Chen, Jiang, & Wu, 2009). Très rapidement, plusieurs espèces ont été recensées, parfois très différentes, comme *Dunaliella viridis* qui n'a pas la capacité de produire du bêta-carotène, ou *Dunaliella salina* qui peut en produire jusqu'à 14% de son poids sec (Lamers, Janssen, De Vos, Bino, & Wijffels, 2008). De par ses propriétés particulièrement intéressantes, *D. salina* est la troisième microalgue la plus produite au monde et la seule source naturelle de bêta-carotène dont l'exploitation est économiquement viable. La souche de *D. salina* CCAP 19/18, utilisée pour notre

étude, fut isolée en 1982 par Kaethner, dans le lagon de Hutt, situé dans la partie occidentale de l'Australie (Tab. 1).

ii. *Tisochrysis lutea* W2X : une algue obtenue par mutation/sélection

Le genre Isochrysis appartient à la famille des Isochrysidaceae (phylum des Haptophyta). Ces organismes non calcifiants et sans paroi rigide sont sphériques, de petites tailles (2 – 6 µm), et possèdent 2 flagelles leur conférant une certaine motilité. En raison de son taux de croissance élevé (de 1 à 2 doublements de la biomasse par jour) et de sa tolérance à une large gamme de conditions physico-chimiques, *Isochrysis* est une espèce clef de l'aquaculture moderne. Sa haute teneur en omégas 3, tels que l'acide docosahexaenoïque (DHA), en font un aliment de qualité pour les premiers stades larvaires des poissons, ainsi qu'en conchyliculture. De plus, ses très hautes teneurs en lipides de réserve, en font un candidat d'intérêt pour des applications du type biocarburant (Tab B1). Les biomasses produites industriellement restent néanmoins faibles, et se cantonnent à une autoproduction pour les besoins de l'aquaculture. Une souche classiquement utilisée est *Isochrysis affinis galbana* clone Tahiti (CCAP 927/14), découverte en 1977 par Haines en Polynésie Française (Tahiti). Suite à de récentes études génétiques, la taxonomie du genre a été modifiée et la souche renommée *Tisochrysis lutea* CCAP 927/14 (Bendif, Probert, Schroeder, & de Vargas, 2013). Cette souche a subi une mutagenèse UV, puis les individus les plus riches en lipides ont été sélectionnés par cytométrie en flux (Bougaran et al., 2012). Ce travail, réalisé à l'IFREMER de Nantes, a permis d'obtenir une nouvelle souche (CCAP 927/17) produisant deux fois plus de lipides neutres, en carence azotée. C'est cette souche sur-accumulatrice que nous avons utilisée au cours de cette étude (Tab. 1).

iii. *Cylindrotheca closterium* : une diatomée benthique

Cylindrotheca closterium AC 170 de la famille des Bacillariaceae fut isolée en 1991 par C. Billard à la Tremblade, France. C'est une diatomée de forme très allongée dont le contenu cellulaire est au centre de la structure. Epipélique, cette diatomée se développe à l'interface eau-sédiment et possède la capacité d'y migrer en cas de stress lumineux. Son taux de croissance remarquablement haut, sa richesse en triglycérides et en omégas et sa sédimentation rapide lors de la récolte, en font un candidat d'intérêt pour les biotechnologies, malgré le manque de connaissance sur cette espèce qui demeure peu étudiée (Tab. 1).

	Dunaliella salina	*Tisochrysis lutea*	*Cylindrotheca closterium*
Température optimale (°C)	22°C (García, Freile-Pelegrín, & Robledo, 2007)	28°C (Marchetti, Bougaran, & Dean, 2012)	20°C (Affan, Heo, & Lee, 2009)
Intensité lumineuse saturante de la photosynthèse ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	450 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ (García et al., 2007)	75 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ (Marchetti et al., 2012)	Pas de données
pH optimum	8 (Thakur, Kumar, & Cowsik, 2000)	6.8 (Marchetti et al., 2012)	Pas de données
Salinité optimale	120 $g.L^{-1}$ (García et al., 2007)	Pas de données	30 $g.L^{-1}$ (Affan et al., 2009)
Taux de croissance moyen	0.7 j^{-1} (Lamers, Janssen, De Vos, Bino, & Wijffels, 2012)	0.8 j^{-1} (Lacour, Sciandra, Talec, Mayzaud, & Bernard, 2012b)	0.8 j^{-1} (Affan et al., 2009)
Contenue en lipides totaux (% dw)	10 – 20% (Griffiths & Harrison, 2009)	30 % (Griffiths & Harrison, 2009)	30% (Griffiths & Harrison, 2009)
Triglycérides	Pas de données	70% (% lipides totaux) (Bougaran et al., 2012)	7-12 % dw (J Pruvost, Vooren, Gouic, Couzinet-mossion, & Legrand, 2011)
DHA (%FFA Totaux)	-	6.8 (Bougaran et al., 2012)	0.7 (Soares et al., 2013)
EPA (%FFA Totaux)	-	0.3 (Bougaran et al., 2012)	8.3 (Soares et al., 2013)
Bêta-carotène (% dw)	10 (Lamers et al., 2008)	-	-

Table 1 : récapitulatif des principaux paramètres optimaux de culture ainsi que des quotas en différentes molécules d'intérêt.

II. Le stockage des lipides chez les algues, un phénomène complexe

i. Les lipides : distinction entre lipides de réserve et lipides structurels

Les lipides : une famille de molécules très hétérogènes. Les lipides forment une famille de molécules assez atypiques et hétérogènes dans la mesure où ils ne sont pas définis par rapport à une structure moléculaire particulière mais par rapport à une propriété chimique: ils sont insolubles dans l'eau. Dans le monde vivant, les lipides ont, entre autres, deux grandes fonctions directement issues de leur propriété hydrophobe. Premièrement, certains d'entre eux forment des bicouches lipidiques ou membranes, base structurelle de toutes les cellules et barrières entre les milieux extra- et intracellulaires. Ces lipides membranaires, polaires, sont donc des lipides structurels. Deuxièmement, d'autres classes de lipides constituent un stockage ultra-compact d'énergie et de carbone car affranchis de la présence d'eau (38 $KJ.g^{-1}$ contre 17 $KJ.g^{-1}$ pour les carbohydrates). Ces lipides neutres (triglycérides ou triacylglycérols) sont des lipides de réserve (Vítová, Bišová, Kawano, & Zachleder, 2015).

Les lipides représentent une très grande diversité de molécules impliquées dans des structures et des processus biologiques très variés (Fig. B1). Les classes principalement considérées dans cette étude seront les lipides saponifiables, lipides principaux des microalgues, dont certains (lipides de réserve) sont à la base de la production de biocarburant, ainsi qu'une famille particulière de lipides insaponifiables : les caroténoïdes.

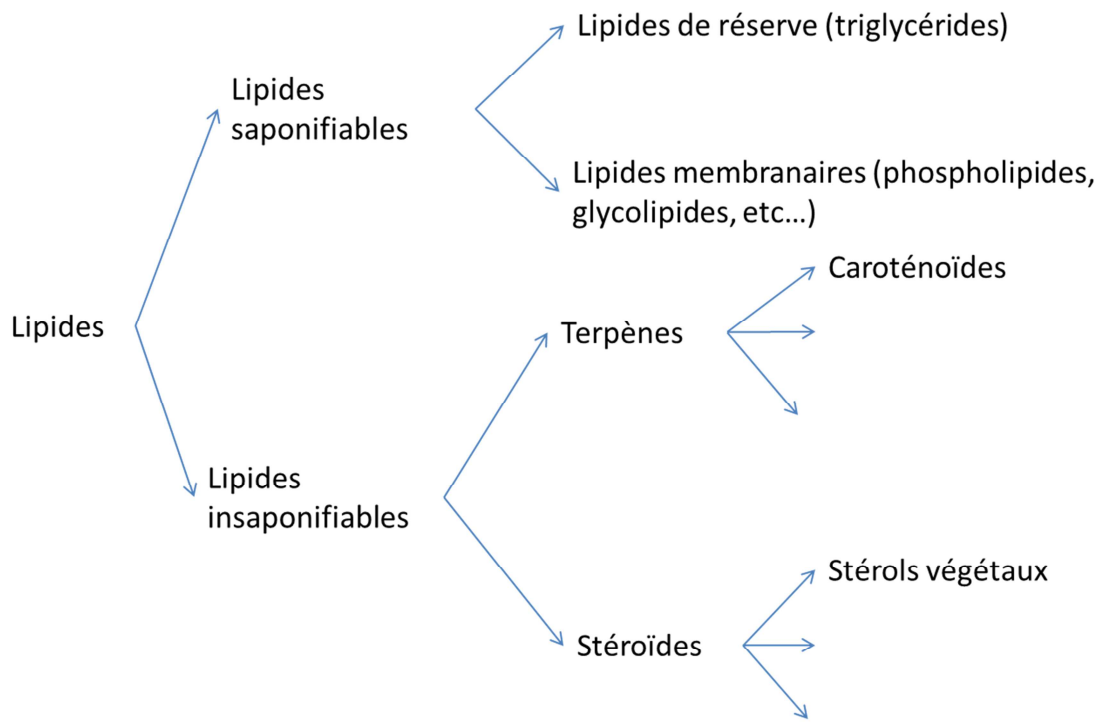


Figure B1 : classification fonctionnelle des lipides.

L'unité de base des lipides est l'acide gras. C'est un acide carbonique (groupement COOH) dont la longueur de la chaine carbonée varie entre 10 et 22 carbones. Chez les microalgues, les chaines carbonées sont paires et principalement constituées de C16 et C18, bien que cette composition varie largement d'un taxon à l'autre et avec les conditions de culture (Hu et al., 2008). Les lipides saponifiables sont dits amphiphiles. Ils se caractérisent par une queue apolaire composée d'acides gras saturés ou insaturés et par une tête hydrophile composée *à minima* d'un noyau glycérol et, dans le cas des lipides membranaires, d'un groupement polaire (sucre, alcool, phosphate, etc…). Les deux étant liés par une liaison ester riche en énergie (Fig. B2).

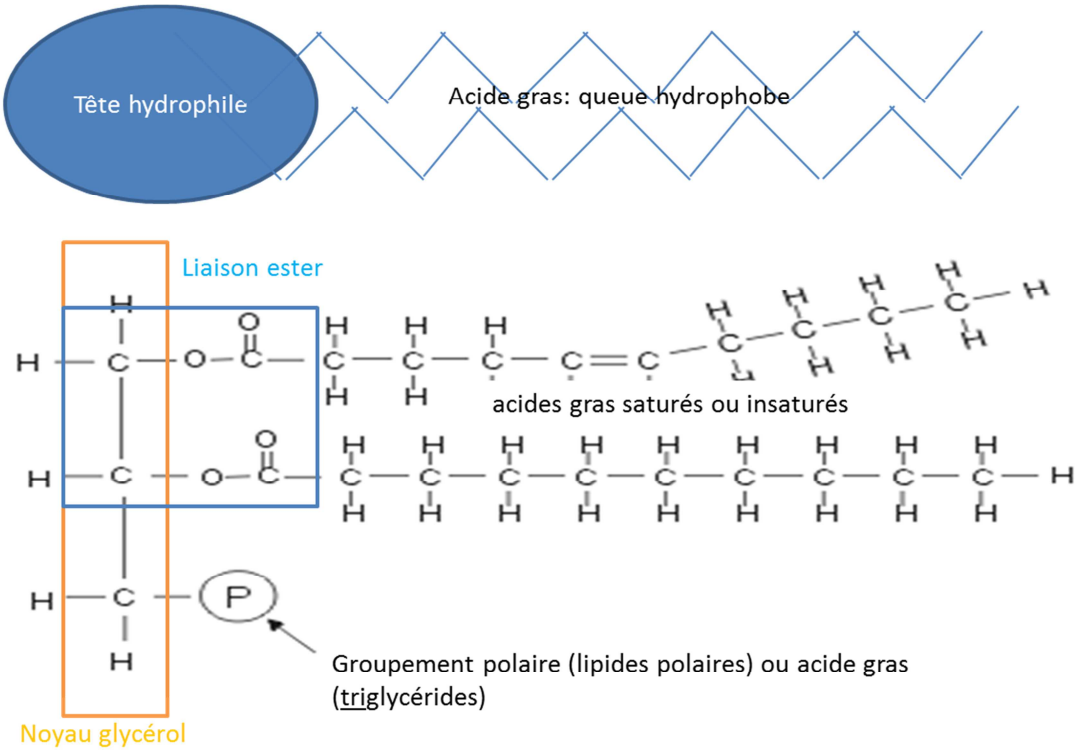


Figure B2 : Organisation schématique et détaillée d'un lipide complexe.

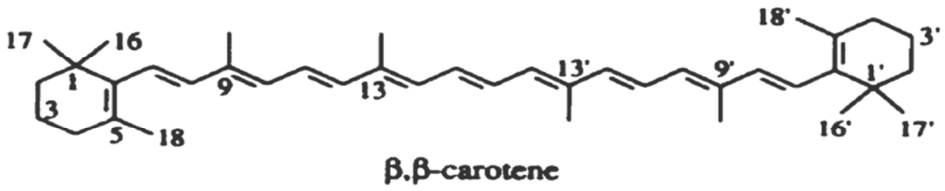
Les *lipides dits 'de réserve'* sont les triglycérides, une classe de lipides assez homogènes qui ne diffèrent que par la longueur et le degré de saturation de leurs acides gras. Les *lipides structurels*, par contre, forment une classe plus complexe et se différencient par le groupement polaire de leur tête hydrophile. Les phospholipides, principaux constituants des membranes plasmiques, se subdivisent en phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylcholine (PC), ainsi qu'en phosphatidyléthanolamine et phosphatidylserine. Dans cette famille, le groupement polaire est un phosphate lié à un alcool. Les glycolipides, principalement localisés dans les membranes des chloroplastes se divisent en monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et sulfoquinovosyldiacyl-glycérol (SQDG). Leur groupement polaire est un carbohydrate plus ou moins complexe. Ces lipides polaires jouent un rôle essentiel dans la structure et la fluidité des membranes, ils sont modifiés par les changements de paramètres environnementaux (lumière, température, etc…) et par le stress associé, pour que les membranes puissent conserver leur rôle biologique de support des réactions métaboliques. Dans un premier temps, la longueur des chaines des acides gras et leur degré d'instauration sont modifiés. Puis, si les paramètres environnementaux s'éloignent trop des

conditions optimales de croissance de la microalgue, c'est la proportion des différents lipides polaires qui est modifiée, pour un coût énergétique bien plus grand.

Les caroténoïdes, entre pigment et antioxydant. « Les caroténoïdes, plus qu'une autre classe de pigments, sont des substances aux caractéristiques très remarquables qu'aucun autre groupe de molécules ne possède » (Britton, 1995). Plus de 600 molécules de caroténoïde ont été isolées de diverses sources naturelles. Cette famille diversifiée possède néanmoins une structure commune : l'unité isoprène (5 carbones) qui, par une succession de polymérisations, permet d'obtenir un squelette à 40 carbones. Cette base est ensuite modifiée par i) cyclisation d'une ou deux extrémités, ii) modification du degré d'insaturation, et iii) addition de groupes fonctionnels contenant de l'oxygène. Si la molécule possède une ou plusieurs molécules d'oxygène, on parle de xanthophylle (ex : la lutéine), sinon de carotènes (ex : l'alpha-carotène). Dans notre travail, le principal caroténoïde étudié sera le bêta-carotène produit par *Dunaliella salina* (Fig. B3, A). Cette molécule possède deux stéréo-isomères : la forme *trans* et *cis,* aux propriétés biologiques différentes. La synthèse chimique ne produit qu'un iso-mélange de ces deux isomères. Le métabolisme cellulaire produit un mélange enrichi en l'une ou l'autre de ces fractions en fonction des conditions environnementales (Ben-Amotz, Lers, & Avron, 1988). La forme *trans* est néanmoins plus souvent retrouvée, car plus stable (Britton, 1995).

Le bêta-carotène est un pigment accessoire qui remplit trois grandes fonctions. En premier lieu, il protège les antennes photosynthétiques, en captant l'énergie lumineuse excédentaire pour la photosynthèse et en la dissipant sous forme de chaleur et de rayonnement (double liaison conjuguée). Deuxièmement, c'est un antioxydant. En cas de stress oxydatif, il protège les fonctions vitales de la cellule en neutralisant les radicaux libres produits (Fig. B3, B). Enfin, en condition de croissance déséquilibrée (fixation de carbone excédentaire par rapport à la fixation d'azote), le bêta-carotène constitue un puits capable d'emmagasiner l'excédent de carbone et d'énergie (Lamers et al., 2008; Britton, 1995).

A



B

$$ROO^{\bullet} + CAR \rightarrow ROO - CAR^{\bullet}$$

$$ROO - CAR^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROO - CAR - OOR$$

Figure B3 : A) formule topologique d'une molécule de bêta-carotène. B) réaction simplifiée entre le bêta-carotène et les radicaux libres (Britton, 1995)

ii. Le métabolisme des lipides chez les microalgues

La synthèse des lipides est un processus complexe qui commence par celle des acides gras. Leur synthèse *de novo*, se déroule dans le chloroplaste. La première étape consiste à convertir l'Acetyl-CoA en Malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par une enzyme clef, l'acetyl CoA carboxylase (ACCase). La Malonyl-CoA est ensuite rapidement transformée en Malonyl-ACP. Puis, suite à sa condensation avec une Acetyl-CoA et un jeu de réductions et de déshydratations, le précurseur de l'acide gras, le butyryl-ACP, est formé. Ensuite, les condensations successives de Malonyl-ACP allongent progressivement la chaine de deux carbones par cycle (Fig. B4). Il en résulte la formation d'un acide gras saturé, pair généralement en C16 ou C18. Pour produire un acide insaturé, une double liaison est introduite par une enzyme particulière, la stearoyl ACP désaturase. Le contrôle des différentes enzymes de cette synthèse est très mal connu. Des expériences sur *Cyclotella cryptica* ont montré que l'activité de l'ACCase augmente de 2 à 4 fois, après 4 et 15 heures de carence en silice respectivement, probablement à cause de modifications de la covalence de l'enzyme (Hu et al., 2008).

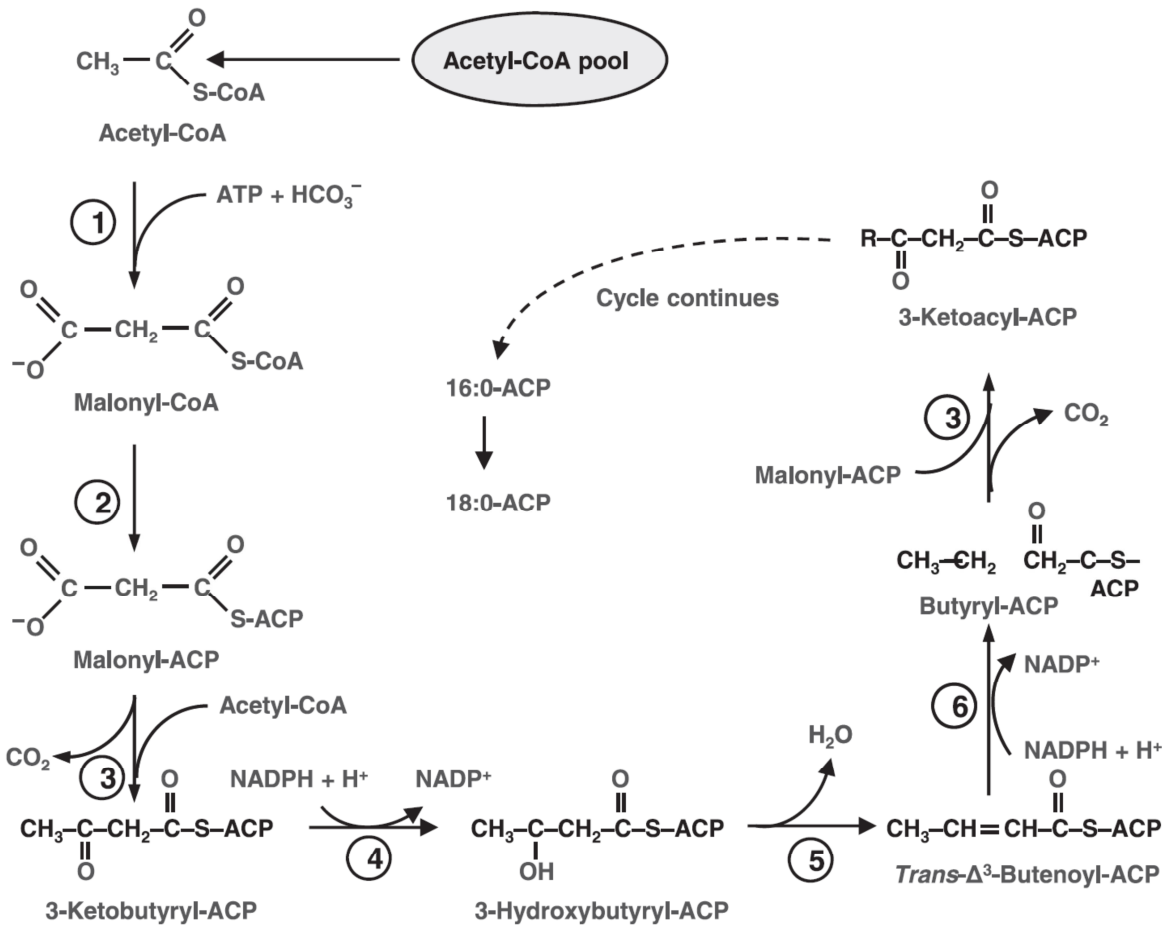
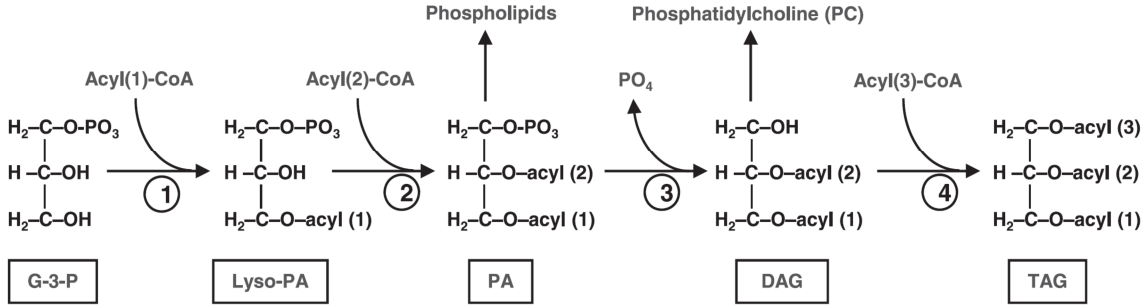


Figure B4 : Voies métaboliques de la synthèse *de novo* d'acide gras (Hu et al., 2008).

La synthèse des lipides complexes utilise probablement la voie métabolique du glycérol (glycolyse). Les acides gras produits sont transférés séquentiellement par une acyl-transférase du groupement acyle de l'acide gras jusqu'à la position 1 et 2 du glycérol-3-phosphate (G3P), formant ainsi un acide phosphatidique (PA) précurseur de nombreux phospholipides. Cet acide peut également être déphosphorilé, formant un diglycéride, élément de base pour la synthèse de la phosphatidylcholine et des glycolipides. Enfin, le diglycéride peut subir une dernière trans-estérification, avec un 3ième acyle gras formant un triglycéride (Fig. B5, A). Une voie indépendante de la synthèse d'acide gras a également été rapportée pour la synthèse des triglycérides. Elle consiste à utiliser les acides gras des phospholipides (donneur) pour les transférer à un diglycéride (accepteur). Cette voie pourrait devenir prédominante en cas de stress, et expliquer la dégradation des membranes observée au profit des triglycérides de réserve (Hu et al., 2008). A noter que chez les cyanobactéries, il n'y a pas de synthèse de triglycérides. La figure B5, B récapitule l'enchainement des différentes étapes qui

vont de la fixation du carbone à la synthèse d'une molécule de triglycéride chez des microalgues eucaryotes. L'importante compartimentation cellulaire de cette synthèse est mis en évidence (Ho, Ye, Hasunuma, Chang, & Kondo, 2014).

A



B

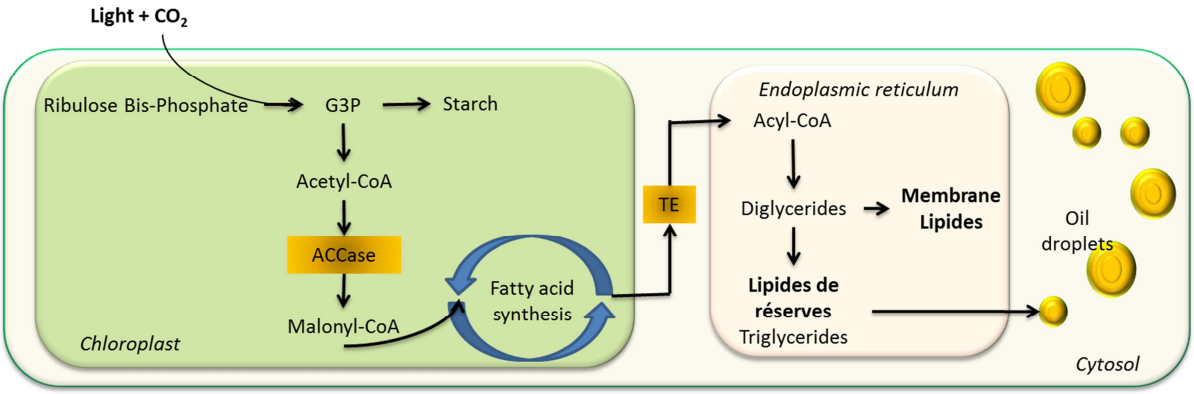


Figure B5 : A) Schéma simplifié de la synthèse des différents lipides complexes (Hu et al., 2008)**. B) Vision d'ensemble des voies d'anabolisme des lipides (G3P : glyceraldehyde 3 phosphate ; ACCase : acetyl-CoA carboxylase ; TE : thioestérase ; modifié à partir de** (Ho et al., 2014)**.**

Comme pour les lipides, les mécanismes déclenchant la synthèse du bêta-carotène chez *Dunaliella salina* sont encore mal connus. Un stress environnemental (forte intensité lumineuse, carence en nutriment, etc…) est détecté par la cellule *via* un/des récepteur(s) tel(s) qu'un photorécepteur UV, déclenchant une transduction du signal selon un facteur intermédiaire, par exemple un oxygène singulet. Les radicaux libres sont, en effet, connus pour déclencher la caroténogénèse (Shaish, Avron, Pick, & Ben-Amotz, 1993). Néanmoins le récepteur d'un tel facteur intermédiaire n'a encore été détecté chez aucun végétal. L'oxydation des lipides de la membrane du chloroplaste pourrait constituer un deuxième messager impliqué dans la cascade de transduction du signal, déclenchant l'activation des enzymes phytoène-synthase et désaturase. Ensuite, la formation des caroténoïdes dérive d'un jeu d'oxydation de la molécule de phytoène formée (Fig. B6 ; Lamers et al., 2008).

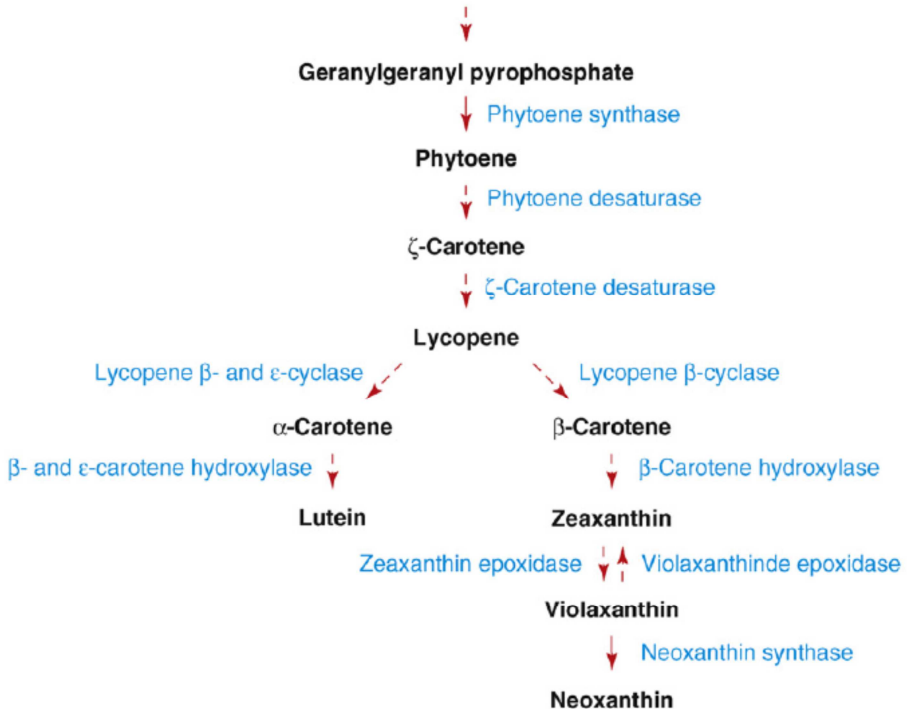
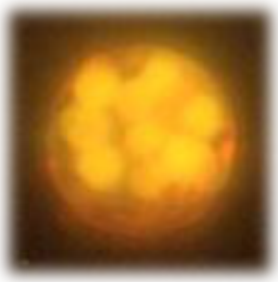


Figure B6 : Voies métaboliques de la synthèse des différents caroténoïdes (Lamers et al., 2008).

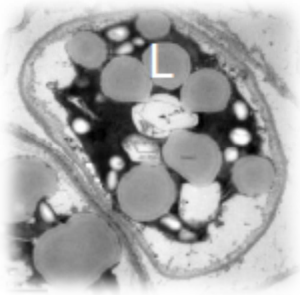
iii. Localisation des lipides et du bêta-carotène

Les lipides de réserve se localisent dans des structures particulières appelées « corps ou gouttelettes lipidiques » généralement situées dans le cytosol et visualisables via un fluorochrome comme le Nile Red (Fig. B7 ; Rumin et al., 2015). Ces organites sont constitués d'une monocouche de phospholipides, elle-même stabilisée par des protéines aux fonctions multiples et assez mal caractérisées (anticoagulant, contrôle du catabolisme et de l'anabolisme des lipides), à l'intérieur desquelles se situent les triglycérides (Katz, Jimenez, & Pick, 1995). L'idée que ces corps lipidiques n'ont pas seulement un rôle de stockage mais qu'ils constituent de véritables organites connectés émerge progressivement (Davidi, Katz, & Pick, 2012 ; Ladygin, 2014; Schmidt et al., 2006).

Chez *Dunaliella salina,* il existe probablement une forte corrélation entre triglycéride et bêta-carotène par le biais de ces organites (H Mendoza, Martel, Río, & Reina, 1999). Les gouttelettes lipidiques sont le lieu de stockage de ces molécules extrêmement hydrophobes, et pourraient même agir comme catalyseur de leur production. Le stockage dans les gouttelettes lipidiques déplacerait les équilibres des réactions enzymatiques vers la synthèse du bêta-carotène (Rabbani, Beyer, Lintig, Hugueney, & Kleinig, 1998).



A



B

Figure B7 : A) Détection des triglycérides à l'aide du fluorochrome Nile red. La fluorescence rouge est due à la chlorophylle, la fluorescence jaune représente les gouttelettes lipidiques. B) Image de microscopie électronique à transmission de *C. reinhardtii*, mutant sans amidon. (L) représente les gouttelettes lipidiques (Siaut et al., 2011)**.**

iv. Dynamique des réserves énergétiques durant le cycle cellulaire en conditions optimales de croissance

Le cycle cellulaire chez les autotrophes. Le cycle cellulaire suit différentes étapes consécutives : la croissance somatique, la réplication de l'ADN, la division du noyau et enfin la division cellulaire par fission binaire. La progression d'une cellule dans son cycle est jalonnée de points de transition dont le passage est subordonné par son niveau énergétique. Chez les organismes autotrophes, la progression d'une partie du cycle dépend de la dose de lumière reçue: la fixation de carbone et l'acquisition d'énergie *via* la photosynthèse se déroulent durant la phase de croissance somatique G1. La progression dans les parties restantes du cycle, indépendantes de la lumière, utilisent l'énergie produite par la respiration du carbone de réserve, en général durant la nuit (Fig. B8 ; Spudich & Sager, 1980). Cette séquence de processus est une adaptation des microalgues à l'alternance jour/nuit, lesquelles consacrent la phase éclairée de la journée à fixer du carbone et à réaliser la nuit des activités indépendantes de la lumière (Vítová et al., 2015).

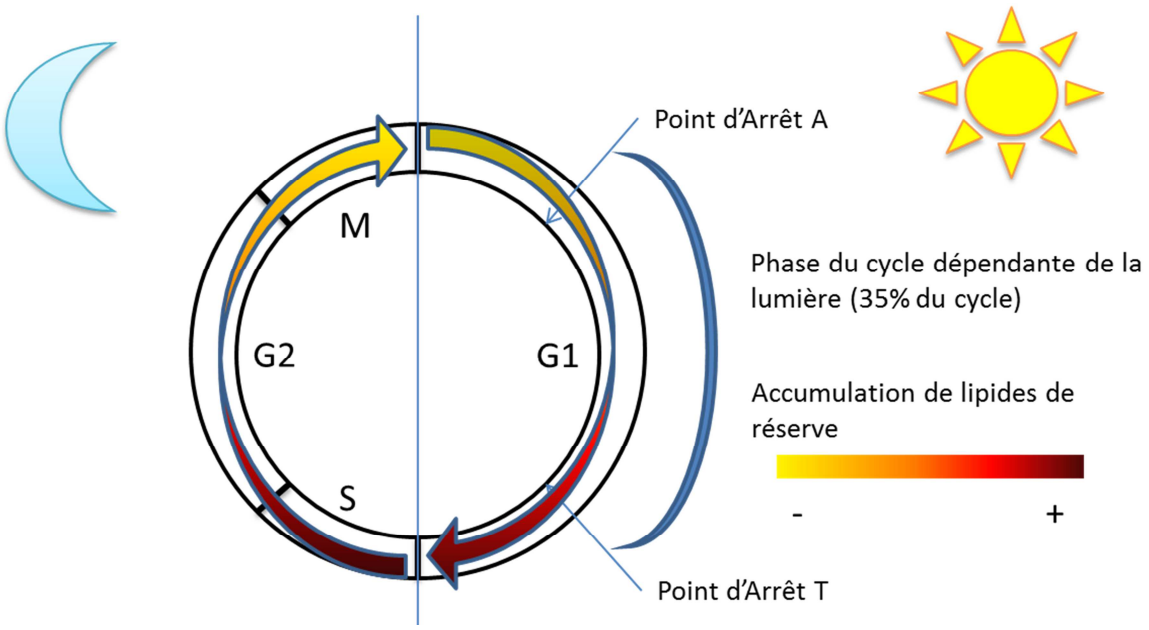


Figure B8 : schéma d'un cycle cellulaire.

Evolution des lipides au cours d'un cycle cellulaire. Alors que la dynamique cellulaire des carbohydrates de réserve a été largement documentée (Vítová et al., 2015), l'accumulation de lipides au cours d'un cycle cellulaire, chez des cultures synchronisées par un cycle lumineux, est un phénomène qui a été relativement peu décrit (Lacour, Sciandra, Talec, Mayzaud, & Bernard, 2012 ; Sukenik & Carmeli, 1990 ; Fabregas, Maseda, Dom, Ferreira, & Otero, 2002 ; Shifrin & Chisholm, 1981). De plus, les lipides de réserve sont trop souvent amalgamés aux lipides totaux. Les études différenciant lipides de réserve et lipides membranaires sont encore trop rares (Lacour et al., 2012 ; Sukenik & Carmeli, 1990). Comme ces deux grandes classes de lipides assurent des fonctions très différentes au cours du cycle cellulaire, elles ont des cinétiques souvent différentes, voire opposées. Chez des cellules non carencées par l'azote, la concentration de lipides membranaires par unité de biomasse reste constante au cours du cycle diurne, car ils ne sont pas mobilisés pour produire de l'énergie. Il en est de même pour les lipides totaux qui, dans ces conditions non carencées, sont principalement constitués de lipides membranaires (Shifrin & Chisholm, 1981). Il en va autrement des lipides de réserve. Leur concentration augmente le jour en conséquence de la photosynthèse pour atteindre un maximum à la fin du jour. Durant la phase nocturne, leur consommation permet d'alimenter le métabolisme cellulaire en substrats carbonés et en énergie (Lacour et al., 2012a).

Evolution du béta-carotène au cours d'un cycle cellulaire. En l'absence de carence nutritive et de stress oxydatif, le bêta-carotène, produits principalement le jour et, dans une moindre mesure, la nuit évolue comme tous les autres pigments. Sa concentration par cellule est divisée par deux lors de la division nocturne (Wegmann & Metzner, 1971).

v. Facteurs modifiant l'accumulation des réserves

La lumière comme facteur de modification de la teneur en lipides. La lumière a un impact important sur l'accumulation des lipides totaux (Vítová et al., 2015). Le passage d'une faible à une forte intensité lumineuse provoque un accroissement de plus de 40% des lipides totaux (Guihéneuf et al. 2010), ainsi qu'une forte augmentation des lipides neutres et une diminution des lipides membranaires (Gordillo, Goutx, Figueroa, & Niell, 1998 ; Hu et al., 2008). Cela favorise également la teneur en acides gras saturés aux dépens des acides gras insaturés (Vítová et al., 2015 ; S. M. Renaud et al., 1991 ; Lamers et al., 2010 ; Hu et al., 2008). Ces effets sont néanmoins à nuancer, car toutes les espèces de microalgues ne semblent pas réagir de la même façon (Molina-Grima, Camacho, Pérez, & Sánchez, 1994). De plus, l'impact de l'intensité lumineuse sur le carbone de réserve dépend du niveau d'avancement de la cellule dans son cycle (Hirokawa, Hata, & Takeda, 1982). Enfin, la corrélation positive entre intensité lumineuse et teneur en lipides est probablement fonction du statut nutritif de la cellule (lui-même influençant la progression du cycle cellulaire). Ceci est particulièrement vrai en phase de croissance, alors que les effets semblent moins marqués lorsque la culture est en phase stationnaire (Van Wagenen et al., 2012).

Le bêta-carotène répond très fortement aux variations d'intensité lumineuse en tant que photoprotectant. Une augmentation de l'intensité lumineuse de 150 à 650 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ entraine chez *D. salina* une augmentation de la concentration en bêta-carotène de plus de 350 % (Lamers et al., 2010).

La température. La température est un paramètre qui influence la cinétique de l'ensemble des protéines cellulaires, parmi lesquels les enzymes du métabolisme. La réponse des lipides totaux à la température n'est pas très claire (Hu et al., 2008), ce qui traduit la complexité de l'action de ce paramètre. Une augmentation des lipides totaux a pu être observée en réponse à une diminution de la température, ainsi qu'aux températures extrêmes (Ras, Steyer, & Bernard, 2013 ; Gigova, Ivanova, Gacheva, Andreeva, & Furnadzhieva, 2012 ; Van Wagenen et al., 2012 ; Converti, Casazza, Ortiz,

Perego, & Del Borghi, 2009 ; Thompson, Guo, & Harrison, 1992). Dans d'autres cas, la teneur en lipides totaux est maximale à la température optimale de croissance et une forte corrélation avec le taux de croissance est observée (Roleda et al., 2013 ; Vítová et al., 2015 ; Guschina & Harwood, 2006). La composition en acides gras des lipides, mieux connue, est largement fonction de la température. Le degré d'insaturation augmente avec la température pour permettre à la cellule de conserver une bonne fluidité membranaire, siège de nombreuses réactions métaboliques (Susan M Renaud, Zhou, & Parry, 1995 ; Susan M Renaud, Thinh, Lambrinidis, & Parry, 2002 ; Thompson, Guo, Harrison, & Whyte, 1992). Enfin, il n'existe que très peu d'information sur la réponse des différentes classes de lipides à la température (lipides de réserves, lipides membranaires, etc…).

Les faibles températures semblent augmenter la teneur en bêta-carotène chez *Dunaliella salina* (Gomez & Mariela, 2005 ; Orset & Young, 1999 ; Héctor Mendoza & Río, 1996). Néanmoins, les observations sont souvent divergentes, et il existe trop peu de résultats à ce jour pour dégager une tendance significative (García et al., 2007). De plus, il est très probable que la production de bêta-carotène soit davantage fonction d'un niveau de stress oxydatif de la cellule (forte concentration en radicaux libres) que la réponse spécifique d'un paramètre abiotique (Krol, Maxwell, & Huner, 1997).

Le dioxyde de carbone. La disponibilité en substrat carboné influence en tout premier lieu le taux de croissance. L'aération de cultures denses avec uniquement de l'air (0.04 % de CO_2) n'étant pas suffisante, il est nécessaire d'injecter de 2 à 5% de CO_2 dans l'air bullé (Vítová et al., 2015). De plus en plus souvent, l'injection de CO_2 est asservie à un pH de consigne pour satisfaire la demande en carbone. D'une manière générale, l'accumulation des lipides est réduite par une limitation en CO_2. Inversement, les lipides de réserves semblent positivement corrélés à l'augmentation de la teneur en CO_2 dans l'air injecté, cet effet étant exacerbé par une carence en azote (Gordillo et al., 1998). Certaines études ont mis en évidence que des stress de pH basique, en réduisant la croissance, entrainaient une augmentation de la teneur en lipides totaux. Ces mêmes stress exacerberaient

également les effets de la carence sur l'accumulation de lipides totaux ou de réserve (Santos, Janssen, Lamers, Evers, & Wijffels, 2012 ; Gardner, Peters, Peyton, & Cooksey, 2011).

Il est à noter que la plupart des études donnent des informations sur les teneurs en CO_2 de l'air bullé, mais rarement sur la concentration en carbone inorganique dissous dans le milieu d'enrichissement ou dans la culture. Cette lacune s'explique par la difficulté à doser le CO_2, de même que par la présence d'ions Ca^{++} et Mg^{++} qui entrainent la formation de carbonates insolubles non disponibles pour la croissance des microalgues et difficilement mesurables. Il en résulte que les effets de la disponibilité en carbone inorganique sur le stockage des lipides restent mal documentés. L'apparition de nouvelles sondes à CO_2 dissous, devraient progressivement résorber cette lacune.

La salinité. La plupart des microalgues ne tolèrent qu'une faible gamme de salinité, sa modification entrainant un fort stress oxydatif ainsi qu'une destruction des cellules par choc osmotique. D'une manière générale, un faible choc osmotique entraine une augmentation de la teneur en lipides totaux (Ho et al., 2014). Par exemple *Chlorococcum sp* voit sa teneur en lipides multipliée par trois pour une augmentation de la salinité de 0 à 2% de NaCl (Harwati, Willke, & Vorlop, 2012).

Néanmoins, *Dunaliella salina* peut, par un habile jeu de production d'osmolites tels que le glycérol, supporter des salinités allant de 0.2 à 5 M (saturation de l'eau en sel ; Jahnke & White, 2003). Ces salinités extrêmes entrainent d'importantes modifications métaboliques, parmi lesquelles l'accumulation de lipides (Takagi, Karseno, & Yoshida, 2006), et surtout de bêta-carotène, cet effet pouvant être amplifié par un stress lumineux supplémentaire (a Ben-Amotz & Avron, 1983).

La carence en azote, déclencheur de la synthèse des lipides. La carence en azote a été la plus étudiée. La plupart des microalgues y répondent en surproduisant des lipides de réserve (Griffiths & Harrison, 2009 ; Hu et al., 2008). L'absence d'azote inorganique dans le milieu entraine un arrêt de la synthèse de protéines et donc de la division cellulaire (Breuer, Lamers, Martens, Draaisma, & Wijffels, 2012). La photosynthèse continue néanmoins de fonctionner sur le pool préexistant d'enzymes, entrainant une fixation excédentaire d'énergie et de carbone. Les effets résultant du

déséquilibre entre flux de carbone et d'azote sont partiellement compensés par une production accrue de molécules énergétiques, riches en carbone mais non azotées, comme les lipides, le bêta-carotène ou encore l'amidon. Chez *Neochloris oleoabundans* par exemple, la carence en azote multiplie par 4 la concentration des lipides par unité de biomasse. La carence entraine également une augmentation du rapport lipides de réserve : lipides membranaires. Enfin, elle modifie la répartition des acides gras, leur degré d'insaturation décroissant en réponse à la diminution des acides gras polyinsaturés au profit d'acides gras saturés, et particulièrement de l'acide oléique (Breuer et al., 2012).

Si la carence en azote augmente la teneur en lipides de réserve, elle diminue parallèlement le taux de croissance de la biomasse (Breuer et al., 2012 ; Pruvost, Van Vooren, Cogne, & Legrand, 2009), de sorte que la productivité en lipides (Taux de croissance x Concentration en lipides par unité de biomasse x Biomasse) ne s'en trouve pas forcément augmentée. La production industrielle de lipides procède souvent en deux étapes. Dans un premier temps, les cultures sont placées en conditions optimales de croissance pour leur permettre d'atteindre rapidement des biomasses importantes. Dans un deuxième temps, une carence en azote est provoquée, qui stoppe la croissance mais augmente la concentration de lipides. Une autre approche, consiste à induire une limitation et non pas une carence. Cette condition est obtenue en renouvelant le milieu de culture et donc l'azote apporté de manière sub-optimale. Cela permet de stimuler la production de lipides tout en maintenant une croissance significative (Lacour, Sciandra, Talec, Mayzaud, & Bernard, 2012b ; Rodolfi et al., 2009 ; Klok, Martens, Wijffels, & Lamers, 2013).

Autres carences, mêmes résultats. La carence en phosphate peut également induire une accumulation de lipides. Chez *Nannochloropsis sp*, par exemple, cette carence entraine une augmentation de la teneur en lipide de 200% (Rodolfi et al., 2009). Le phosphate est l'un des constituants majeurs des acides nucléiques. Son absence déclenche, comme pour l'azote, un arrêt rapide de la production de macromolécules (ARN, ADN, protéines) et de la croissance, ainsi qu'un

déséquilibre des flux de carbone et d'énergie entrainant une accumulation de molécules de réserve, non phosphatées. Se met alors en place une importante restructuration des membranes plasmiques. Les phospholipides, leurs constituants principaux, disparaissent au profit de glycolipides non phosphatées et de bétaines (Guschina & Harwood, 2006). Chez certaines espèces (*Scenedesmus sp, Chlorella ellipsoidea, Chlorella vulgaris, Dunaliella primolecta, Haematococcus pluvialis*…), cette carence modifie le type de carbone de réserve, les microalgues accumulant des lipides au lieu d'amidon (Vítová et al., 2015).

Chez les diatomées, la carence en silice entraine également une très forte accumulation de lipides. Chez *Cyclotella cryptica*, les teneurs en lipides totaux et en lipides neutres se retrouvent multipliées par 2 (Sriharan, Bagga, & Nawaz, 1991).

La carence en soufre, plus rarement étudiée a, sur le métabolisme, des effets analogues à ceux d'une carence en phosphate. La division cellulaire est très rapidement stoppée, principalement à cause de l'arrêt de la réplication de l'ADN. La carence en soufre semble avoir un effet très fort sur la suraccumulation d'amidon. L'effet semble moins marqué sur les lipides, mais peu d'études existent sur le sujet (Vítová et al., 2015).

D'une manière générale, les mécanismes de stockage des carbohydrates ont été davantage étudiés que pour les lipides de réserve (Vítová et al., 2015). En raison de la difficulté d'analyser les différentes classes de lipides, les études se sont principalement portées sur les lipides totaux. Néanmoins, ces derniers cachent une très forte disparité dont on ne perçoit que l'effet résultant. Leur seule étude n'est donc pas suffisante pour comprendre la physiologie des microalgues. Enfin, il existe de nombreux effets synergiques entre tous les paramètres présentés précédemment, qui ont été étudiés la plupart du temps comme s'ils étaient indépendants.

La partie D de ce manuscrit essayera de caractériser plus en détail, les mécanismes du stockage des lipides chez *Dunaliella salina*, en se focalisant sur l'étude de l'influence du cycle cellulaire, de l'intensité lumineuse et de la température.

III. La sélection, qu'est-ce que c'est ? Concepts et avancées

La modification des conditions de culture peut entrainer une forte augmentation de l'accumulation de molécules d'intérêt, dans la limite de la capacité d'acclimatation de la souche. L'acclimatation est la capacité d'un organisme à modifier sa physiologie en réponse à un changement de son environnement. Ces modifications, dites phénotypiques, résultent de l'activation/désactivation de voies métaboliques, et s'accomplissent dans des limites inscrites dans le génome de l'organisme. En revanche, lorsque les conditions deviennent trop éloignées de la niche écologique de l'organisme, l'acclimatation ne suffit plus et des mécanismes plus complexes d'adaptation, dite génotypique, se mettent en place. Les mutations rares et aléatoires, qui en permanence modifient durablement le génome de l'organisme, vont permettre l'apparition d'individus plus aptes à résister à la nouvelle pression. Ces individus plus performants vont transmettre cette modification à leur descendance. Notre objectif ici, est bien de sélectionner de nouvelles souches aux caractéristiques génétiques différentes du génotype sauvage. Dans la suite de cet état de l'art, nous nous intéresserons donc à la sélection, terme qui revêt dans la littérature de très nombreuses significations, et qu'il convient de clarifier (Tab. 2). Nous détaillerons plus particulièrement le type de sélection par pression continue.

Sélection par screening	Recherche dans un mélange d'organismes d'origine naturelle des espèces/souches les plus productives, en analysant un à un chaque organisme.	(Rodolfi et al., 2009)
Modification par OGM	Création d'organismes génétiquement modifiés en bloquant, sur-exprimant, insérant des voies métaboliques d'intérêt.	(Siaut et al., 2011)
Sélection mutationnelle	Méthode de sélection/mutation. Création de diversité génétique par des outils mutationnels (UV, etc...) puis screening des souches les plus productives.	(Bougaran et al., 2012)
Sélection par pression continue	Application d'une pression de sélection artificielle sur une population pour éliminer les individus aux caractéristiques non désirées, et faire ainsi émerger une nouvelle souche après un certain nombre de générations.	(Reboud & Majerus, 2007)

Table 2 : Différentes significations du mot sélection dans la littérature.

i. De Malthus à Darwin: la sélection naturelle

Charles Robert Darwin (1809 – 1882) est l'un des pères de la biologie moderne. En écrivant l'un de ses livres les plus fameux, « On the Origin of Species » (1859), il introduit l'idée, forte pour l'époque, que la sélection naturelle est la principale force dirigeant l'évolution innovante. Darwin transpose dans le cadre plus large de l'écologie, des concepts déjà exposés par le pasteur Thomas Robert Malthus dans son « Essai sur le principe de population » : i) Il naît toujours plus d'êtres vivants que le milieu ne peut en supporter, ii) il s'en suit une lutte pour la vie (struggle for life), et une compétition entre les individus de la même espèce pour des ressources *de facto*, rares, de sorte que seuls survivent les plus adaptés à ces conditions (survival of the fittest), iii) les variations avantageuses sont retenues par cette sélection naturelle, les autres, éliminées ; iv) leur accumulation par la transmission héréditaire a pour conséquence la transformation des espèces. Il est intéressant de noter que Darwin commence son ouvrage par un chapitre intitulé « de la variation des espèces à l'état domestique ». Il y expose ses observations sur l'apparition de races domestiques qu'il dit ne pouvoir être due au hasard, mais bien résultant d'une action consciente ou inconsciente de l'homme: « Nous ne pouvons supposer, en effet, que toutes ces races ont été soudainement produites avec toute la perfection et toute l'utilité qu'elles ont aujourd'hui […]. Le pouvoir de sélection, d'accumulation, que possède l'homme, est la clef de ce problème ; *la nature fournit les variations successives, l'homme les accumule* dans certaines directions qui lui sont utiles ». Il expose ensuite les différents critères qui, selon lui, aboutissent à une sélection efficace : « Une *grande faculté de variabilité* est évidemment favorable, car elle fournit tous les matériaux sur lesquels repose la sélection ; toutefois, de simples différences individuelles sont plus que suffisantes pour permettre, à condition que l'on y apporte beaucoup de soins, l'accumulation d'une grande somme de modifications dans presque toutes les directions. Les variations manifestement utiles ou agréables à l'homme ne se produisent qu'accidentellement, on a d'autant plus de chances qu'elles se produisent, quand on *élève un plus grand nombre d'individus*. Le nombre est, par conséquent, un des grands éléments de succès. […]. Mais le point le plus important de tous est, sans contredit, que l'animal ou la plante soit assez utile à

l'homme, ou ait assez de valeur à ses yeux, pour qu'il y apporte l'attention la plus scrupuleuse. […]. Il importe, pour la formation de nouvelles races d'animaux, *d'empêcher autant que possible les croisements*, tout au moins dans un pays qui renferme déjà d'autres races. […] ». Darwin ajoute sur les limites de la sélection : « Quelques auteurs ont affirmé que la limite de la variation chez nos animaux domestiques est bientôt atteinte et qu'elle ne saurait être dépassée. Il serait quelque peu téméraire d'affirmer que la limite a été atteinte. […]. Il serait également téméraire d'affirmer que les caractères, poussés aujourd'hui jusqu'à leur extrême limite, ne pourront pas, après être restés fixes pendant des siècles, varier de nouveau dans de nouvelles conditions d'existence. Sans doute, comme l'a fait remarquer M. Wallace avec beaucoup de raison, on finira par atteindre une limite… ».

Le point de vue de Darwin sur la sélection naturelle apparait, 150 ans plus tard, totalement visionnaire. Darwin a été parmi les premiers (avec Alfred Russel Wallace qui publia peu ou prou la même théorie la même année), mais beaucoup d'autres le suivirent en introduisant entre autres, les théories mutationnistes. C'est le point de vue qui a été adopté dans ce travail de thèse. Il convient cependant de noter que je n'ai pu prendre en considération le processus de reproduction sexuée au cours de mes expériences, phénomène dont le déterminisme reste mal connu et peu maitrisé chez les microalgues. Permettant le croisement entre individus, il a pu interférer au cours de mes expériences, mais je ne disposais pas des outils analytiques permettant de le vérifier.

ii. Pas de sélection sans élimination : la culture en continu, base de la sélection de microorganismes.

La sélection des microalgues ne peut avoir lieu que si les individus les moins aptes sont progressivement éliminés pour, *in fine*, disparaitre au profit des individus recherchés. C'est précisément ce que la culture en continue permet de réaliser contrairement à la culture en batch.

La culture en batch. Dans ce type de culture, système semi-fermé où les seuls échanges de matière possibles sont de nature gazeuse, les conditions de croissance évoluent constamment. Ainsi, le taux de croissance ne peut se stabiliser que sur des intervalles de temps restreints, la culture passant par différentes phases caractéristiques. La *phase de latence*, qui suit l'inoculation, traduit l'acclimatation des microalgues à leurs nouvelles conditions de culture. Elle est suivie par une *phase de croissance exponentielle*, pendant laquelle les conditions environnementales sont non limitantes pour la croissance, et les propriétés physiologiques des cellules considérées comme constantes. Cette phase de croissance dite "équilibrée" est suivie par la *phase stationnaire* durant laquelle la densité cellulaire ne varie plus, soit que la croissance brute est nulle, soit qu'elle est contrecarrée par une mortalité équivalente. Cet état est dû à l'apparition de diverses limitations (nutritives, lumineuses, toxiques) induisant des conditions de culture non optimales. Puis, une phase de sénescence peut avoir lieu, durant laquelle la population décline, la mortalité l'emportant sur la croissance (Fig. B9).

Ce mode de culture, traditionnellement utilisé pour étudier l'écophysiologie des microalgues, n'est cependant pas optimal, car il ne permet pas de discerner facilement les états d'équilibre physiologique des états transitoires. En outre, étant fermé, il permet aux différents génotypes introduits initialement de cohabiter, ce qui constitue un frein à la sélection. Deux autres types de cultures "ouvertes" ont donc été utilisés.

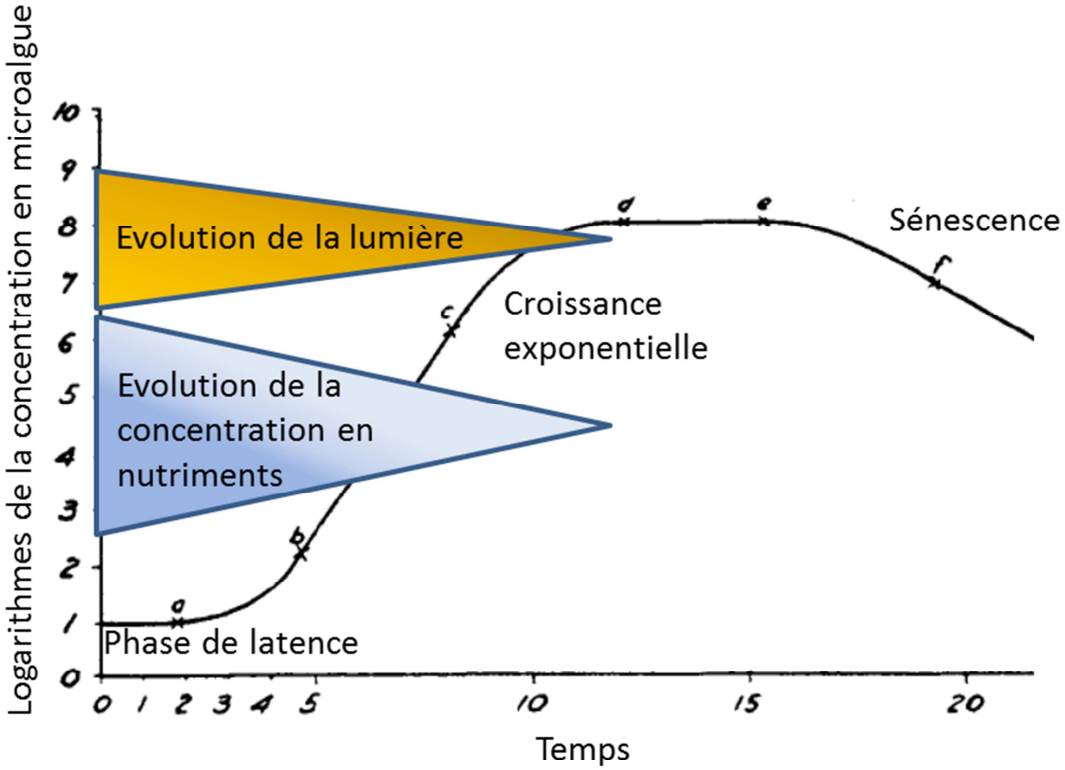


Figure B9 : système de culture des microalgues historique : le batch.

Le chemostat. Dans ce mode de culture, le renouvellement continu (ou semi-continu) du milieu par une pompe permet de maintenir les conditions de croissance constantes. La population atteint spontanément un état d'équilibre pour lequel l'apport d'une ressource nutritive (le facteur limitant) équivaut à son utilisation par les microalgues. Le taux de croissance à l'équilibre est donc égal au taux de renouvellement (ou taux de dilution) de la culture, et celui-ci ne doit pas dépasser le taux de croissance maximal de la population, sous peine de la faire disparaître. L'intérêt de ce mode de culture est de pouvoir stabiliser durablement une population de micro-organismes à des niveaux de croissance choisis. Développé conjointement par Monod (1950) et Novick & Szilard (1950), pour l'étude des bactéries, c'est aussi un puissant outil pour étudier les états transitoires, ainsi que les phénomènes de compétition pour une ressource entre différentes populations. Il a ainsi été théoriquement démontré et expérimentalement vérifié que dans une communauté d'espèces en compétition pour une même ressource, celle qui l'utilise le plus efficacement va progressivement

envahir le milieu et supplanter les autres (Hansen & Hubbell, 1980). Néanmoins ce mode de culture ne permet la sélection que dans le cadre spécifique de la compétition pour une ressource, ce qui n'est pas le plus judicieux pour faire émerger des individus plus productifs en lipides (Fig. B10, A).

Le turbidostat. Dans ce mode de culture, c'est la densité de la population, que l'on peut estimer d'après sa turbidité, qui définit le critère de stabilisation. La densité de la population à l'équilibre est déterminée pour que sa croissance ne puisse pas être limitée par un élément nutritif (contrairement au chémostat). En l'absence de limitation par une ressource nutritive, il existe deux façons de maintenir un équilibre dans une culture continue. L'une se rapproche du mode chémostat: le taux de dilution est fixé et la population va se stabiliser à un niveau où l'éclairement, régi par le niveau de turbidité à cause de l'auto-ombrage, devient le facteur limitant. Dans l'autre, la culture est stabilisée à un niveau choisi par dilution à un taux égal à son taux de croissance maximal. Il n'y a pas d'incidence de la densité de la culture sur ce taux de croissance tant que son niveau n'altère pas les ressources lumineuses (cas précédent) ou nutritives (cas du chémostat). C'est ce mode de culture en turbidostat qui sera utilisé dans nos expériences de sélection. La culture, non limitée, se développe dans des conditions optimales qui correspondent à la phase de croissance exponentielle des cultures en batch. Les individus les plus aptes à bénéficier de ces conditions se multiplient plus rapidement que les autres, ce qui accroit la probabilité pour leurs descendants de rester dans la culture malgré son renouvellement (Masci, Bernard, & Grognard, 2008 ; Fig. B10, B). Plus complexe à mettre en œuvre et à modéliser, il n'en demeure pas moins un outil particulièrement bien adapté pour la sélection (Jiménez & Benítez, 1988; Brown & Oliver, 1982).

Le Fed-Batch. Ce mode de culture, intermédiaire entre le batch et la culture en continue, consiste à renouveler par intermittence une partie du milieu. Plus le renouvellement est fréquent, plus ce mode se rapproche d'un mode de culture continue, et moins il est fréquent, plus il s'apparente au mode de culture en batch. Plus facile à mettre en œuvre que le mode continu, le fed-batch reste néanmoins moins performant et ne permet en général pas d'atteindre un véritable état d'équilibre.

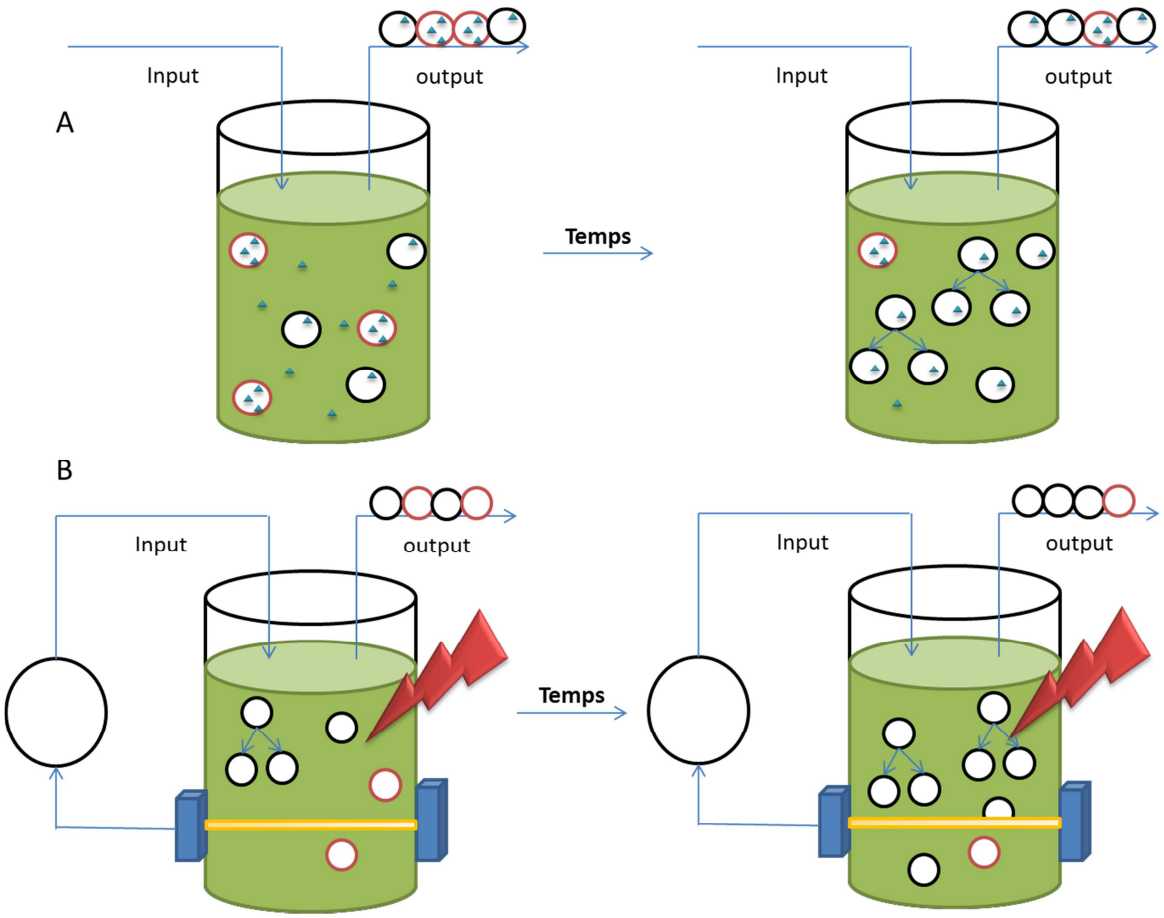


Figure B10 : Deux modes de culture en continu : A) le chemostat, où une compétition pour la ressource limitante se met en place, sélectionnant les individus l'utilisant au mieux, B) Le turbidostat, où suite à l'application d'un stress, les individus poussant le plus vite vont être sélectionnés.

iii. La compréhension fondamentale des mécanismes d'évolution : utilisation des microorganismes comme modèle d'étude

Historiquement, les premiers travaux de sélection dirigée sur des microorganismes cherchaient à mieux comprendre les mécanismes l'évolution et de la sélection naturelle. Ces organismes se reproduisant en quelques jours, voire quelques heures, il était possible d'acquérir des résultats d'expériences rapidement. De nombreux travaux ont ainsi été réalisés sur des bactéries (*Escherichia coli*) ou sur des levures (*Saccharomyces cerevisiae*). En étudiant pendant 300 jours l'adaptation d'une population d'*Escherichia coli* à un nouveau milieu de culture, Lenski, Rose, Simpson & Tadler (1991) mettent en évidence un "fitness" (ici gain du taux de croissance) de +37% entre le phénotype sauvage (wild type : WT) et le mutant. Jasmin, Dillon & Zeyl (2012) étudient chez *Saccharomyces cerevisiae* cultivée pendant 5000 générations, le coût de son adaptation à un milieu limité en glucose. Ils concluent que le corolaire d'une performance accrue pour une voie métabolique est une performance dégradée sur une autre voie métabolique, en vertu des lois de conservation de la thermodynamique. On parle alors de compromis (trade-off). En l'occurrence, dans cette expérience, le gain en « vitesse de croissance » entrainait une diminution de la productivité.

L'approche néo-darwiniste, largement acceptée pour les organismes pluricellulaires, stipule que l'évolution adaptative consiste avant tout à sélectionner des variations génétiques préexistantes dans une population (pre-selective mutation), et non à faire émerger de nouveaux phénotypes par mutations induites durant la pression de sélection (adaptative mutation ; Lewontin, 1974). C'est également le cas chez les organismes unicellulaires. Luria & Delbrück (1943) ont montré que l'apparition d'une résistance aux virus chez *E. Coli* était davantage due à la présence d'une variabilité génétique préexistante à la contamination qu'à l'apparition aléatoire de mutants lors la contamination.

Ces travaux fondamentaux ont par la suite été appliqués aux microorganismes autotrophes, révélant d'importantes similitudes sur les résultats. Ils ont ensuite donné lieu à des approches plus appliquées

permettant par exemple de comprendre les effets de pollutions anthropiques sur l'évolution de la biodiversité aquatique (polluants, réchauffement climatique, etc...). Ces notions commencent également à être exploitées en biotechnologies pour améliorer des organismes d'intérêt industriel (microalgues à vocation biodiesel, cosmétique, etc…).

iv. La sélection des microalgues appliquée aux biotechnologies

La sélection aux herbicides comme témoin de l'apparition de résistances. L'utilisation intensive des herbicides depuis la fin de la seconde guerre mondiale a suscité de très nombreuses inquiétudes concernant l'apparition de plantes résistantes. Les microalgues, modèle d'organisme photosynthétique à croissance rapide, sont donc adaptées à l'expérimentation sur la résistance aux herbicides. Reboud & Majerus (2007) montrent qu'après 140 jours de traitement à l'Atrazin, l'ED_{50} (50% d'inhibition du taux de croissance) de *Chlamydomonas reinhardtii* passe de 0,6 µM pour le phénotype sauvage (Wild Type ; WT), à 77 µM pour le mutant. D'autres auteurs ont également montré, pour d'autres espèces (*Emiliania huxleyi, Isochrysis galbana, Phaeodactylum tricornutum, Scenedesmus intermedius, Dictyosphaerium chlorelloides, Microcystis aeruginosa*) et pour des temps de sélection allant jusqu'à 200 jours, qu'une résistance finissait toujours par apparaitre (Huertas, Rouco, López-Rodas, & Costas 2010 ; López-Rodas et al. 2007 ; Marvá et al. 2010).

La sélection aux polluants chimiques : un moyen de bio-remédiation. Suite aux nombreuses pollutions de nature chimique qui ont détérioré les côtes marines et les rivières, la question de la résilience des écosystèmes est devenue un objet d'étude prioritaire. De plus en plus de travaux se penchent sur la capacité des microalgues à évoluer et à s'adapter à des pollutions chimiques (Semple, Cain, & Schmidt, 1999 ; Carrera-Martínez, Mateos-Sanz, López-Rodas, & Costas, 2010 ; Carrera-Martinez, Mateos-Sanz, Lopez-Rodas, & Costas, 2011). Romero-Lopez et al. (2012) ont sélectionné, *via* un protocole dédié, une souche de *Scenedesmus intermedius* capable de croitre dans

de l'eau contenant 21% de pétrole contre 9% pour la souche sauvage. Il ne fallait qu'un pas pour que cette capacité d'adaptation des microalgues soit utilisée en bioremédiation. González, García-Balboa, Rouco, Lopez-Rodas, & Costas (2012) ont sélectionné une souche de microalgue résistante au lindane (croissance à 40 contre 5 $mg.l^{-1}$), puis l'ont utilisée pour purifier de l'eau polluée. Les taux d'efficacité variaient entre 75 et 99% en fonction de la concentration initiale en lindane.

La sélection par la température : une conséquence du réchauffement climatique. L'acclimatation phénotypique des microalgues à la température a été étudiée expérimentalement (Thompson, Guo, Harrison, et al., 1992 a ; Thompson, Guo, & Harrison, 1992 b) et quantifiée par des modèles mathématiques (Eppley, 1972 ; Bernard & Rémond, 2012 ; Béchet, Shilton, & Guieysse, 2013). La courbe de réponse des microalgues à la température peut être caractérisée par 3 températures cardinales T_{min}, T_{max} et T_{opt}, qui sont respectivement les températures en deçà et au-delà desquelles, elles ne peuvent plus croitre, et la température optimale de croissance. T_{min} et T_{max} délimitent la niche thermique de l'espèce (Fig. B11 ; Bernard & Rémond, 2012). Toutefois, la réponse adaptative des microalgues et plus généralement, celle des microorganismes à des modifications de la température, est très mal connue et aucun consensus clair n'émerge sur l'évolution de la courbe de réponse à la température suite à des modifications de température moyenne. Une hypothèse classique est celle du compromis thermique ('trade-off'). Elle distingue les organismes spécialisés (thermal specialist) ayant une niche thermale étroite mais un taux de croissance élevé et les organismes généralistes (thermal generalist) qui ont une niche thermale large mais des taux de croissance plus faibles. Le corolaire de cette hypothèse est l'obtention d'une aire sous la courbe de réponse à la température constante, ainsi qu'une corrélation négative entre la température optimale de croissance d'un organisme et la taille de sa niche thermale. Il en résulterait aussi qu'un organisme adapté à une niche thermale plus grande verrait son taux de croissance diminuer (Levins, 1968 ; Huey & Slatkin, 1976). Néanmoins, de plus en plus de travaux tendent à remettre en cause ce postulat. Knies, Kingsolver & Burch (2009) montrent qu'il est possible d'adapter des phages pour augmenter à la fois leur niche thermique et leur température optimale de croissance. Tout comme Eppley, (1972),

ils montrent que plus la température optimale de croissance est élevée, plus le taux de croissance associé l'est aussi (hotter is better). De même, Bennett & Lenski (1993) montrent que la température optimale de croissance d'*E. coli* peut augmenter sans modification de sa niche thermique, ce qui modifie l'aire sous la courbe.

Concernant les microalgues, bien peu de travaux existent. Huertas, Rouco, López-Rodas, & Costas, (2011) montrent que les microalgues sont capables de modifier leur T_{max}. En augmentant progressivement la température moyenne des cultures, ils parviennent à faire pousser une souche *d'Isochrysis galbana* à 35°C (température supérieure au T_{max} de la souche sauvage) au bout d'un nombre de générations assez réduit (50). Eduardo Costas et al (2014), en utilisant un protocole de sélection différent, parviennent aux mêmes conclusions sur la forte capacité d'adaptation des microalgues à la température. Il en déduise également le taux de mutation des microalgues soumises à un stress en température, environ 10^{-6} mutation.cell^{-1}.génération^{-1}. Ce taux, qui dépend de l'espèce considérée ainsi que de la pression de sélection appliquée, varie entre 10^{-5} et 10^{-7} mutation.cell^{-1}.génération^{-1} (González et al., 2012).

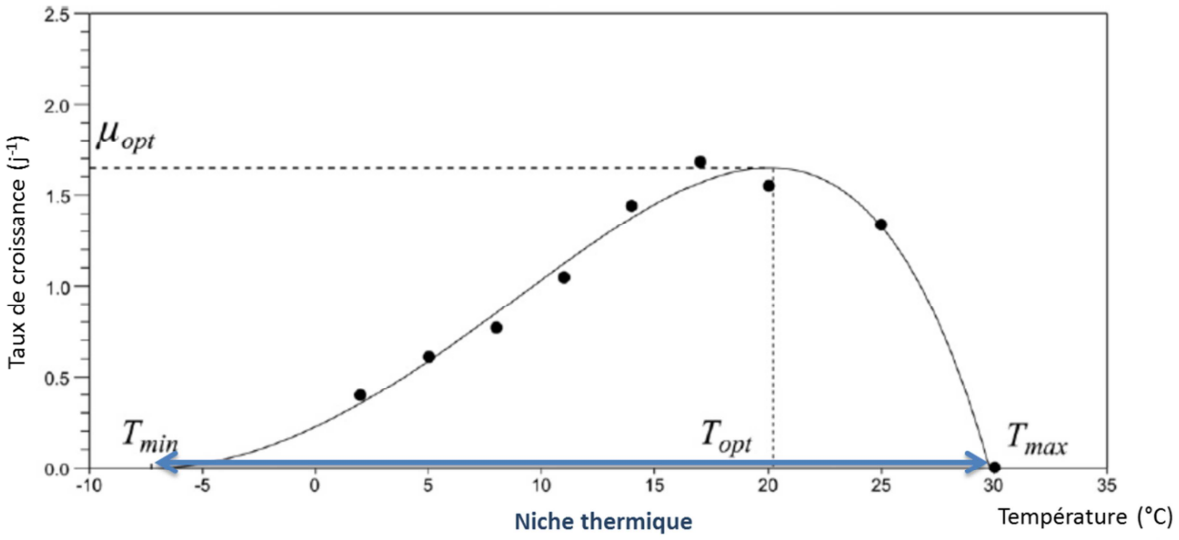


Figure B11 : courbe de réponse des microalgues à la température mesurée et modélisée pour *Asterionella formosa d'après* Bernard & Rémond, (2012)**.**

La sélection par le CO_2 : conséquence directe de l'augmentation des gaz à effet de serre. Un autre aspect de l'évolution des microalgues commence à être étudié et concerne leur adaptation à des pressions partielles de CO_2 croissantes. Collins & Bell, (2004), en soumettant des souches de *Chlamydomonas reindhardtii* à des concentrations de 1050 ppm de CO_2 échouent à les adapter à de plus hautes concentrations. Certaines lignées montrent néanmoins des signes de modifications de l'appareil photosynthétique et ont des taux de croissance plus réduits à faibles pressions partielles de CO_2 (sans pour autant être plus performants aux hautes). Ces changements pourraient être dus à une modification des mécanismes de concentration du carbone dans les cellules, les microalgues adaptées ayant une affinité au CO_2 plus faible, à hautes concentrations (Collins, Sültemeyer, & Bell, 2006).

La sélection par les nitrates pour augmenter la teneur en métabolites de réserve. La carence en azote entraine, conjointement à l'augmentation de la concentration en lipides, une diminution du quota en azote dans les cellules (q, µmolN.cell^{-1}). En fonction du degré de limitation azotée, ce quota varie entre deux valeurs, caractéristiques à chaque espèce, le quota maximal q_m, obtenu en conditions optimales de croissance et q_0 le quota minimum (dit aussi 'quota de subsistance') atteint lors d'une carence prolongée (Fernandes et al., 2013 ; Mairet, Bernard, Masci, Lacour, & Sciandra, 2011). Le rapport $\frac{q_m}{q_0}$, a été évoqué comme étant un indicateur de la capacité de production de lipides d'une espèce de microalgues (Lacour, 2010). Plus sa valeur est haute, plus le potentiel de production de lipides est importante (Fig. 12 ; Shifrin & Chisholm, 1981 ; Lacour 2011). La sélection de souches ayant un rapport $\frac{q_m}{q_0}$ élevé parait donc une voie prometteuse.

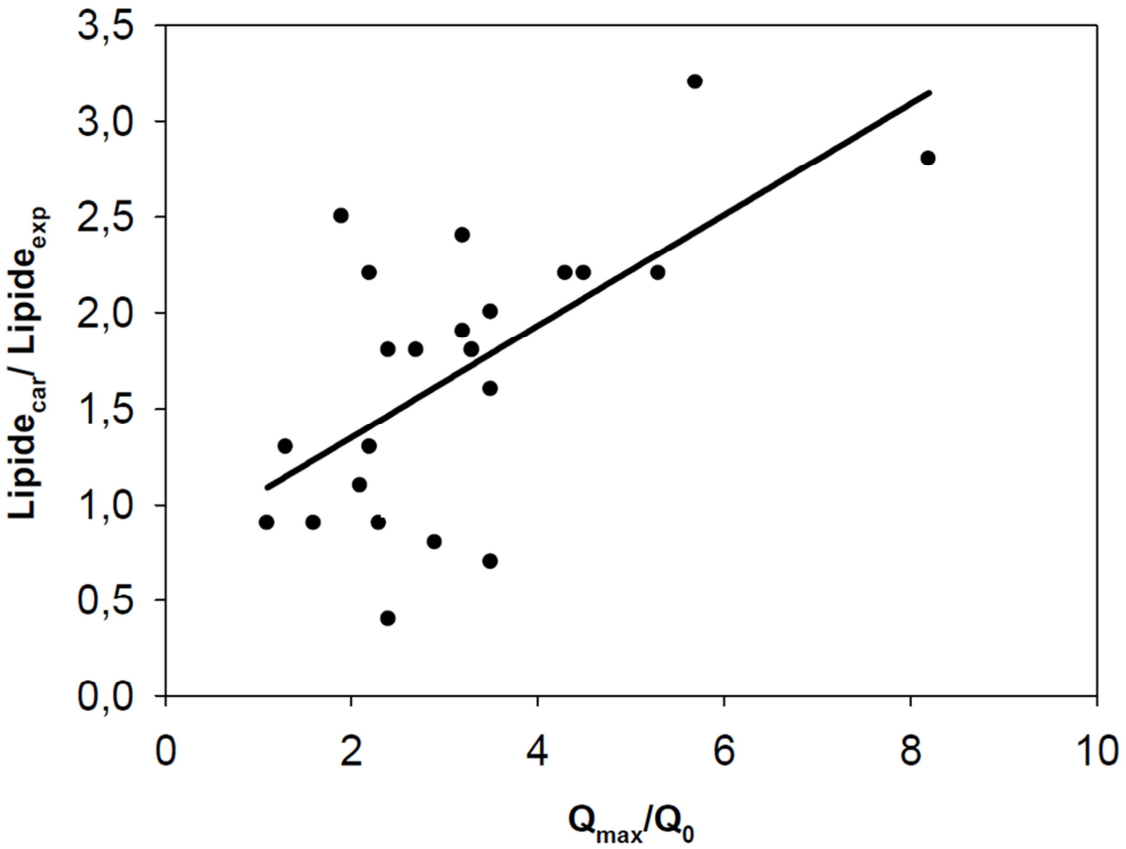


Figure B12 : relation entre quota en azote et potentiel de production de lipides. Chaque point correspond à une espèce de microalgue différente (Lacour, 2011)**.**

Néanmoins, très peu d'auteurs ont exploré cette voie. En utilisant un système original de sélection basé sur l'accès aux nutriments, P R. Mooij & Kleerebezem (2013) ont sélectionné au sein d'une communauté naturelle de microalgues, les espèces les plus riches en carbone de réserve (survival of the fattest). Le protocole consiste à alimenter en carbone inorganique la culture durant la phase lumineuse, sans apport d'azote, ce qui conduit à une carence temporaire et à une accumulation de carbone de réserve. La culture est ensuite diluée et alimentée en azote durant la phase obscure. Ainsi, les individus qui ont accumulé davantage de carbone durant la phase lumineuse se multiplient plus rapidement durant la phase obscure en présence d'azote, et finissent par prédominer. Ce mode de culture utilisé pendant plusieurs mois entraine une réduction de la diversité génétique (une à deux espèces différentes) et une productivité en carbohydrates équivalente aux meilleures productivités obtenues pour des cultures monoclonales (Peter R. Mooij, de Graaff, van Loosdrecht, & Kleerebezem, 2014 ; Peter R Mooij, Stouten, Loosdrecht, & Kleerebezem, 2015). A ce jour, c'est la

seul étude ayant tenté d'exploiter le lien entre quota cellulaire en azote et augmentation de la teneur en carbone de réserve.

L'intensité lumineuse: une clef évolutive puissante. A faible intensité, le taux de croissance est positivement corrélé à l'intensité lumineuse jusqu'à un niveau I_s, dit photo-saturant. Ce paramètre est défini comme étant l'intensité lumineuse à partir de laquelle le taux de croissance maximal est atteint. Pour des valeurs plus faibles, la croissance des microalgues est photo-limitée et pour des valeurs plus élevées, elle est photo-saturée, l'augmentation de l'intensité lumineuse n'entrainant plus de modification du taux de croissance. Enfin, si l'intensité lumineuse augmente encore, des effets délétères sur les processus photosynthétiques et métaboliques se mettent en place, conduisant à la photoinhibition (Fig. B13, A ; Baroli & Melis, 1996). La photoinhibition se traduit, au niveau cellulaire, par la dégradation des protéines associées au fonctionnement du centre réactionnel des photosystèmes (protéine D1, D2, D3) et par l'évacuation de l'énergie excédentaire *via* l'émission de fluorescence et de chaleur (Non Photochemical Quenching ; NPQ). Ces dommages ne sont toutefois pas irréversibles et un équilibre dynamique existe entre restauration et dégradation, la photoinhibition ne survenant que lorsque le taux de dégradation excède le taux de réparation (Baroli & Melis, 1996).

Pour s'adapter aux variations d'intensité lumineuse caractéristiques de leur environnement, les microalgues ont développé une capacité de photo-acclimatation extrêmement impressionnante. Chez *Skeletonema costatum*, le passage d'une faible (50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) à une forte intensité lumineuse (environ 1500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) entraine une diminution de la concentration en chlorophylle a (chl a) d'un facteur 4 et une augmentation du rapport chl a/chl b de 4 à 15, manifestation de nombreuses modifications de l'appareil photosynthétique (Anning et al., 2000). En premier lieu, le nombre de photosystèmes se trouve drastiquement réduit et il ne reste que 7% des photosystèmes I (PS I) et 65 % des photosystèmes II (PS II) par rapport aux conditions de faibles intensités lumineuses. Leur taille (taille des antennes) est également diminuée. Le PS II passe de 500 molécules de chlorophylle a à 60

alors que le PS I passe de 250 à 100 en moyenne. De plus, du fait de l'importante dégradation des PS II, seulement 20 à 25% de ces derniers sont fonctionnels, les autres étant photoinhibés.

Ces modifications affectent également les performances photosynthétiques. L'intensité lumineuse photosaturante I_s augmente à fort éclairement. Cela s'accompagne néanmoins d'une diminution du taux de photosynthèse maximal (P_{max}), ainsi que d'une diminution du rendement quantique de la photosynthèse (α). Les microalgues deviennent moins sensibles à la photoinhibition, mais le coût associé est une diminution des capacités photosynthétiques (Melis, Neidhardt, & Benemann, 1998 ; Smith et al., 1990 ; Melis et al., 1998). Le retour à des conditions d'éclairement faible entraine dans un laps de temps allant de la demi-journée à la semaine, un retour aux caractéristiques photosynthétiques initiales (Neidhardt, Benemann, Zhang, & Melis, 1998).

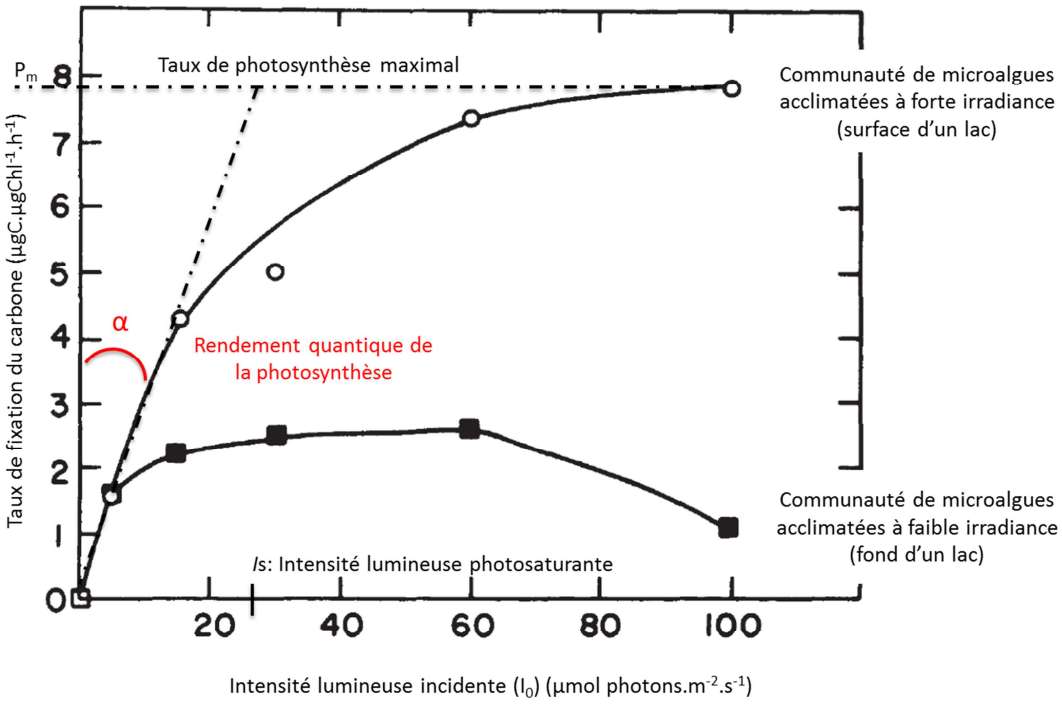
Enfin, l'intensité et la cinétique de cette acclimatation à la lumière est dépendante de l'espèce. Il pourrait exister deux grands types de photo-acclimatation. Les 'chlorella types', répondant par des modifications de la teneur en pigments et les 'cyclotella types', où la photo-acclimatation serait plus due à une modification des teneurs en protéines photosynthétiques (Falkowski, 1980).

En conclusion, les microalgues présentent en réponse à l'intensité lumineuse, une plasticité pigmentaire très forte. Lors de variations périodiques de l'intensité lumineuse ou de gradient de lumière au sein d'une culture, cette réponse de l'appareil photosynthétique se fait en fonction de l'intensité lumineuse moyenne perçue (I_m) (Combe et al., 2015). Cette caractéristique est particulièrement importante dans le cas des cultures denses, essentielles pour un avenir économiquement viable de la filière. Dans ce cas, le gradient lumineux s'accompagne de conditions de croissance extrêmement hétérogènes, soit photo-inhibitrices en périphérie, soit photo-limitantes au centre du réacteur, réduisant la productivité du système (Fig. B13, B ; Molina-Grima, Fernández Sevilla, Sánchez Pérez, & García Camacho, 1996).

La sélection de microalgues à antennes réduites (tronquées) apparait donc, en théorie, comme une solution prometteuse pour limiter les problèmes de photo-ombrage. Ces nouvelles souches, plus

"transparentes", en permettant une meilleure pénétration de la lumière au sein du réacteur ainsi qu'une meilleure résistance à la photoinhibition, favoriseront un gain en biomasse et donc en productivité (Fig. B13, B ; Melis, 2009). Néanmoins, la complexité du système photosynthétique est telle que seuls quelques auteurs ont tenté cette approche, par l'utilisation d'OGM ou de protocoles de mutagénèse. Nakajima & Ueda (1997), à l'aide d'un mutant de *Synechocystis* déficient en phycocyanine, ont obtenu des productivités supérieures de 50%, uniquement à très hautes intensités lumineuses (> 1500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). En divisant par presque 3 la concentration en chlorophylle a dans un mutant de la diatomée *Cyclotella*, Huesemann et al. (2009) ont augmenté de 45% la biomasse finale dans leur raceway ouvert, et ont démontré par la même occasion que la diminution du contenu cellulaire en chlorophylle entrainait bien une augmentation de la biomasse. Dans le même ordre d'idée, Polle, Kanakagiri, & Melis (2003), après avoir caractérisé et modifié le gène tla 1 sensé agir sur la taille des antennes photosynthétiques, sont parvenus à diviser par 3 le contenu en chl a de *Chlamydmonas reinhardtii.* Plus récemment, la même équipe, en élucidant plus en détails les mécanismes génétiques impliqués dans la régulation de la taille des antennes (Mitra, Kirst, Dewez, & Melis, 2012) et en modifiant un autre gène, est parvenue à diviser par 6 la concentration cellulaire en chlorophylle (Kirst, Garcia-Cerdan, Zurbriggen, Ruehle, & Melis, 2012). Enfin, Perin et al., (2015), par un protocole de mutation/sélection (i.e. Tab. 2), obtiennent un mutant dont la teneur en chlorophylle a est divisée par 2. Ils vont plus loin en montrant que cette diminution mène bien à une augmentation de la productivité en biomasse (+21%). Cette étude souligne également que se contenter de modifier la teneur en chlorophylle, n'est pas suffisant pour justifier d'un gain en productivité puisque cela entraine très régulièrement une importante restructuration de l'appareil photosynthétique. Il faut donc systématiquement valider les nouvelles souches obtenues en caractérisant leur nouvelle réponse photosynthétique et leur gain effectif en productivité par une expérience de comparaison avec le phénotype sauvage (T. De Mooij et al., 2015).

A



B

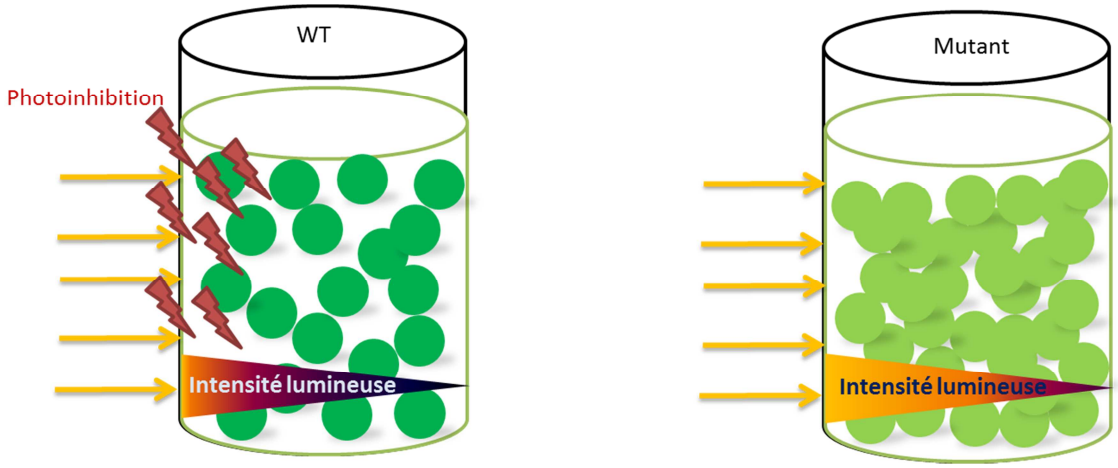


Figure B13 : A) courbes de réponse à l'intensité lumineuse de microalgues acclimatées à différents niveaux d'éclairements, modifié de Falkowski, (1980)**. B) Représentation schématique des conséquences de l'utilisation d'un mutant ayant des antennes photosynthétiques tronquées.**

C. MATERIELS ET METHODES

C'est véritablement donner des batailles, que de tâcher à vaincre toutes les difficultés et les erreurs qui nous empêchent de parvenir à la connaissance de la vérité.
René Descartes (1596 – 1650)

I. Préparation du milieu de culture et inoculation

Le milieu de culture est préparé dans des bidons de 20 L (Nalgen) remplis avec de l'eau de mer préalablement vieillie pendant au moins 3 semaines, filtrée sur 0.22 µm (SpiralCap, Gelman) puis autoclavée (120°C, 40 min). Une fois refroidie, l'eau de mer est enrichie avec du milieu f/2 (Guillard, 1975).

Avant toute inoculation, les systèmes de culture sont nettoyés avec de l'éthanol, passés à l'eau milliQ, fermés hermétiquement, puis stérilisés avec du HCl à 10%. Ils sont ensuite rincés avant d'être remplis avec du milieu de culture filtré sur 0.22 µm. Ce protocole permet de maintenir des cultures monospécifique, mais non axéniques.

II. La culture des algues : utilisation de deux types de photobioréacteurs

i. Un logiciel de gestion des cultures commun : ODIN

Odin est une plateforme numérique développée par BIOCORE dans le but de contrôler des bioréacteurs. Ce logiciel centralise l'information des différents capteurs et l'enregistre. Il est également capable, en fonction de cette information, d'envoyer grâce à des algorithmes de control, des consignes préalablement programmées à des actionneurs pour gérer automatiquement les bioréacteurs de façon dynamique, et ainsi optimiser leur utilisation. Les expériences de sélection étant longues, complexes et dynamiques, ce système était absolument nécessaire pour assurer leur bon déroulement.

ii. Des photobioréacteurs cylindriques en verre pour la compréhension de la physiologie

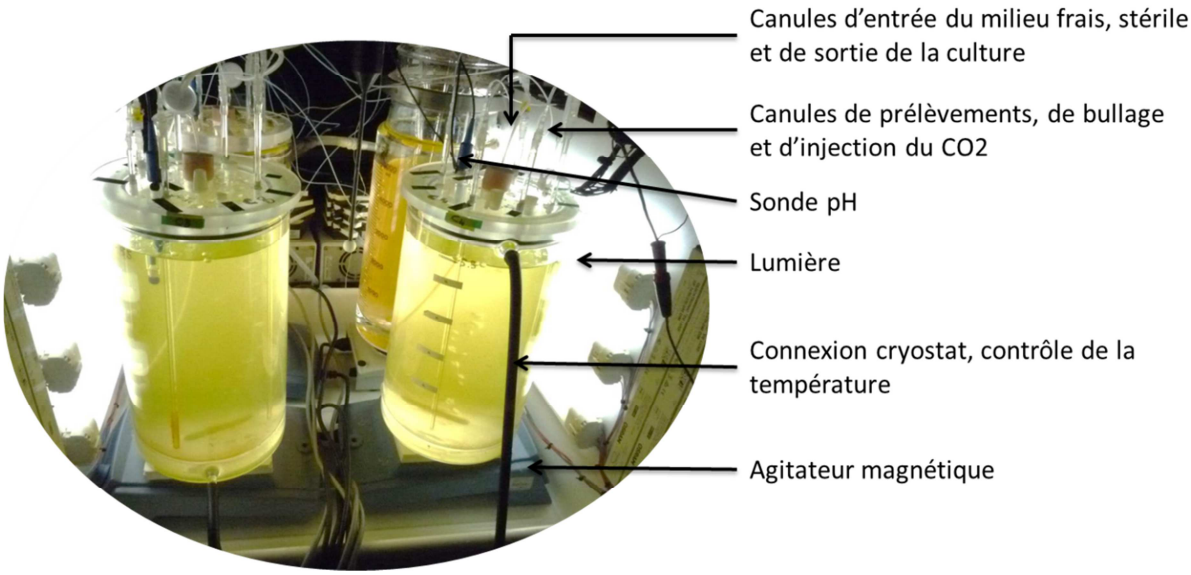


Figure C1 : photobioréacteurs cylindriques en verre.

Des réacteurs cylindriques en verre d'un volume de 2 ou 5 litres sont utilisés pour les expériences de physiologie (Fig. C1). Leur double paroi en verre, alimentée en eau par un cryostat (Lauda RE 415G), permet leur régulation thermique. L'intensité de la lumière, dispensée par 2 rangées de 6 tubes néons de 50 cm de long (Dulux®1, 2G11, 55W/12-950, lumilux de lux, daylight, OsramSylvania), est modulable. Une sonde PAR, généralement située à l'extérieur des réacteurs enregistre en continu l'intensité lumineuse. Le pH, contrôlé par ordinateur, est maintenu à une valeur de 8.2 par micro-additions de CO_2 pur. Un léger bullage d'air, associé à une agitation douce assurée par un barreau aimanté, permet d'homogénéiser les cultures et d'optimiser les échanges gazeux. Le mode culture continu est assuré par une pompe péristaltique (Gilson) qui alimente les bioréacteurs en milieu de culture stérile et filtré sur 0.22 µm. L'enceinte de culture permet de maintenir entre 2 et 6 réacteurs simultanément.

iii. Des photobioréacteurs plans, les sélectiostats, pour la sélection par pression continue.

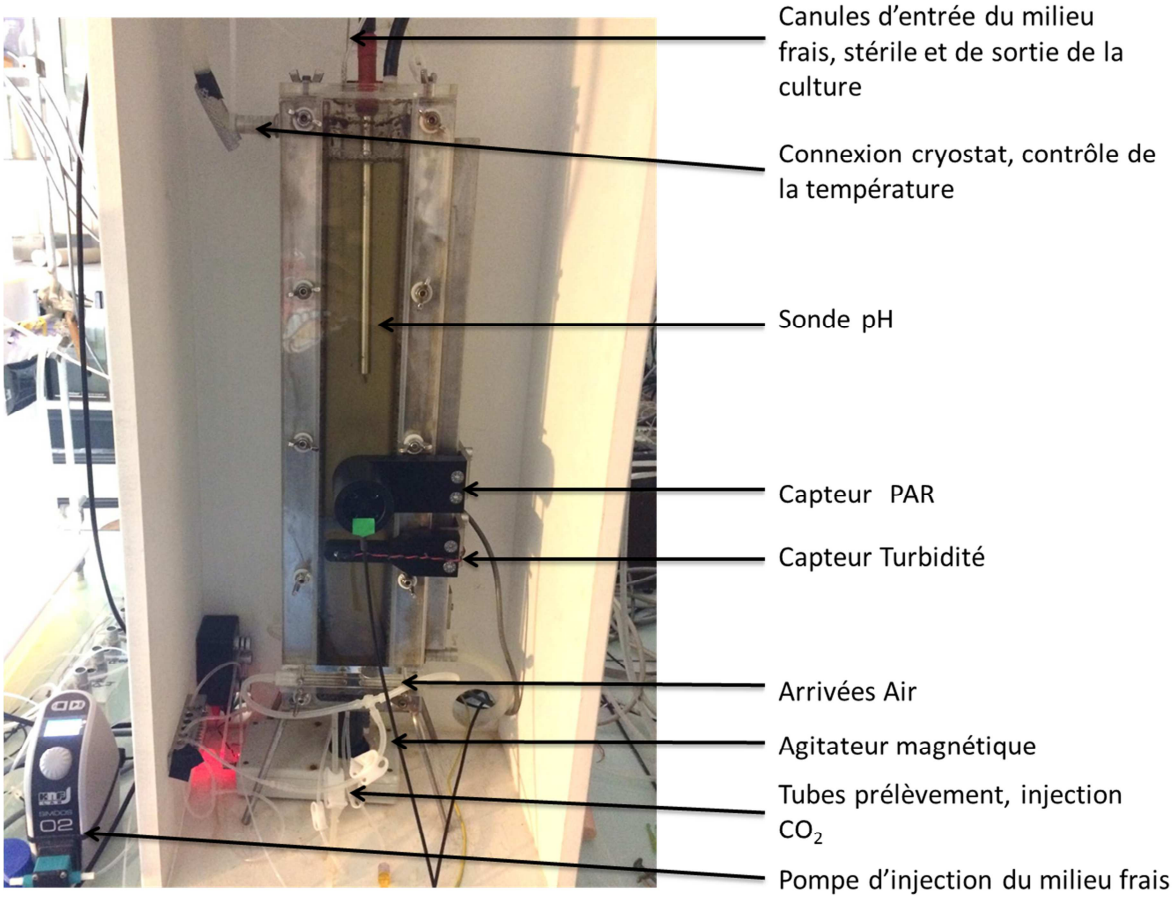


Figure C2 : photobioréacteur plan, le sélectiostat.

Des réacteurs de culture plans, d'un volume utile de 1.9 litres sont utilisés pour les expériences de sélection (Fig. C2). Leur double paroi latérale en acier, alimentée en eau par un cryostat (Lauda RE 415G), permet une régulation dynamique très précise de la température. Chaque unité est placée dans un caisson en mélaminé blanc. Une rampe de LED (Nichia NVSL219BT 2 700°K), placée au fond du caisson et refroidie par de l'air pulsé procure une lumière type spectre solaire, dont l'intensité est pilotée par ordinateur. La longueur de la rampe de LED, assure un éclairage homogène du réacteur. Le logiciel ODIN®, assure la régulation du pH à une valeur constante de 8.2 par micro-addition de CO_2 pur. Ce logiciel permet également de maintenir la turbidité des cultures constante, en asservissant dynamiquement leur dilution à des mesures de turbidité acquises en continu par un capteur optique

calibré (Fig. C3). L'apport de milieu de culture stérile et filtré sur 0.22 µm est assuré par de pompes de type "stepdose" (SIMDOSE 02). La valeur de consigne fixée pour la turbidité est choisie pour satisfaire deux conditions. D'un côté, la densité de microalgues doit être suffisamment élevée pour que les analyses biochimiques puissent être réalisées sur des prélèvements de faible volume et que le processus de sélection soit optimisé par la présence d'un grand nombre de cellules dans la culture. De l'autre, la densité algale ne doit pas atteindre des niveaux pouvant induire des phénomènes de limitation non-désirée (carence, photo-ombrage). Quatre bulleurs d'air, situés sur les panneaux en plexiglas transparents ainsi qu'une agitation douce *via* un barreau aimanté permet de ralentir la formation de biofilm, d'homogénéiser la culture et de faciliter des échanges gazeux. Le bullage, piloté par ODIN®, est arrêté pendant la mesure optique de turbidité.

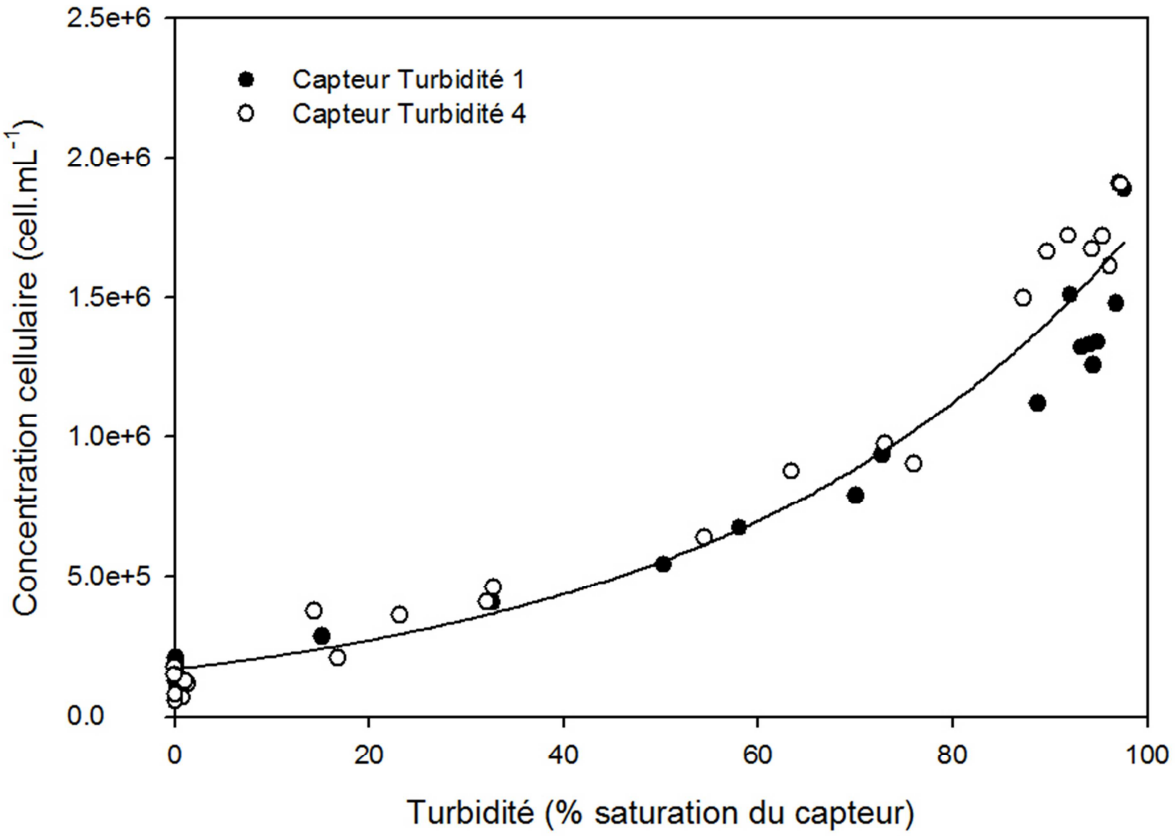


Figure C3 : calibration des capteurs turbidités

III. Les mesures automatiques.

L'ensemble du système de culture est schématisé sur la figure C4. En fonction des besoins expérimentaux, tout ou partie seulement des fonctionnalités du système sont utilisées.

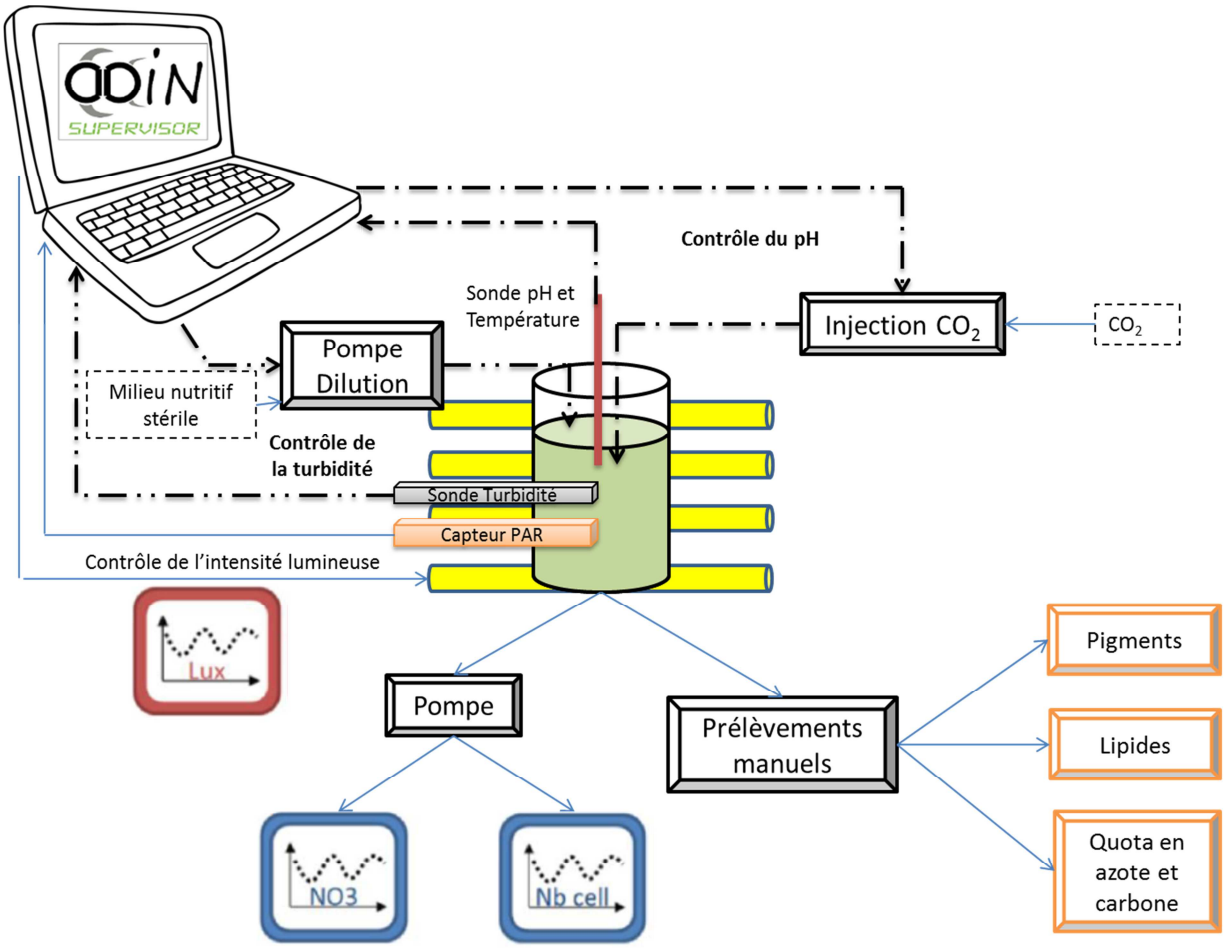


Figure C4 : schématisation du système de culture.

i. Densité cellulaire et taux de croissance

La concentration cellulaire est estimée grâce à un compteur optique de particules (HIAC – Royco ; Pacific Scientific Instruments). Le principe de ce compteur repose sur l'occultation d'un faisceau laser par chaque particule qui coupe sa trajectoire. Une photodiode comptabilise chaque événement et enregistre un signal proportionnel à la surface projetée de la particule. En fonction de la position de la cellule dans le faisceau laser, le signal peut varier d'une cellule à l'autre, si celles-ci ne sont pas sphériques. Un automate contrôlé par ordinateur prélève des échantillons dans les différentes cultures, et les dilue préalablement à leur analyse par le compteur (pour éviter les phénomènes de coïncidence). L'ensemble du dispositif (automate + compteur) est programmé pour assurer des séries de 3 mesures consécutives (triplicatas) dans les différentes cultures, chaque série pouvant être espacée de 1 à plusieurs heures. Des séquences de rinçage à l'HCl à 10% et à l'eau milliQ permettent, à la fin de chaque cycle de comptages, de nettoyer le système de prélèvement ainsi que le compteur.

Un autre compteur de particules a également été utilisé, le Coulter Counter (Beckman). Son principe, qui repose sur la variation de résistivité induite par le passage d'une particule entre deux électrodes, présente sur le HIAC l'avantage d'estimer avec plus de justesse le diamètre cellulaire, car le signal est proportionnel au volume de la particule (indépendant de sa position). Néanmoins son utilisation est plus contraignante. Une inter-calibration entre ces deux appareils a été réalisée (Fig. C5). Elle montre qu'ils fournissent des estimations de la concentration cellulaire comparables, ce qui n'est pas le cas du diamètre cellulaire. L'importante variabilité de la mesure de la densité pour le Coulter Counter, résulte du très faible volume d'échantillon utilisé pour chaque analyse. Il est donc essentiel de multiplier les réplicas (au moins 6), contrairement au HIAC qui n'en nécessite que 3.

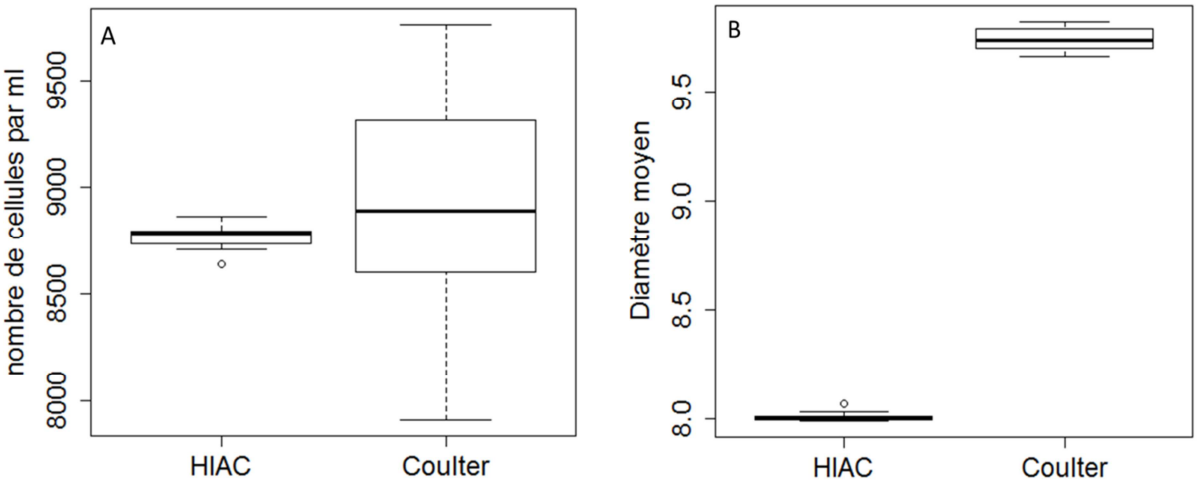


Figure C5 : inter-calibration de 2 compteurs particulaires. A) comparaison des concentrations cellulaire. B) comparaison des diamètres cellulaires moyens

La variation instantanée de la densité cellulaire dans une culture continue s'écrit:

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

avec µ le taux division (j^{-1}), *x* la concentration cellulaire ($cell.L^{-1}$), et *D* le taux de dilution (j^{-1}). A noter qu'en mode batch (culture fermée), D = 0 j^{-1}, et qu'en turbidostat (culture ouverte) à l'équilibre, µ = D.

Le taux de croissance, calculé sur l'intervalle de temps $\Delta t = t_2 - t_1$, est :

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right)}{t2 - t1} + D$$

Si la fréquence des prélèvements est suffisante, un lissage des données peut être réalisé à l'aide d'une fonction de type Savitzky Golay (Savitzky & Golay, 1964), ce qui permet d'obtenir un calcul quasi-continu du taux de division.

ii. Mesure de la concentration en nitrates et nitrites

Les nitrates et nitrites sont mesurés par dosage colorimétrique à l'aide d'un Technicon Auto-analyzer. Un premier canal permet de doser la somme des nitrites présents dans l'échantillon et de ceux issus de la réduction des nitrates présents dans l'échantillon, un second permet de doser uniquement les nitrites. La différence de ces deux mesures donne la concentration en nitrates ($\mu mol.L^{-1}$). Un système de prélèvement couplé à un système de filtration permet une acquisition automatique à haute-fréquence dans plusieurs cultures (Bernard, Malara, & Sciandra, 1996).

IV. Les analyses biochimiques

i. Carbone et azote particulaires

Un volume connu de culture est filtré en triplicats sur des filtres en fibre de verre (Watman GF/C, Maidstone, UK) préalablement calcinés à 450°C pendant 12h. Les échantillons filtrés sont conservés à l'étuve (60°C) dans des tubes en verre également calcinés, jusqu'à l'analyse au CHN (2400 Series II CHNS/O, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Le taux net de fixation de carbone ou d'azote par unité de carbone s'écrit:

$$\rho_{C,N} = \frac{1}{[C]_{t_2}}\left(\frac{[C,N]_{t_2} - [C,N]_{t_1}}{(t_2 - t_1)} + D\,.\,[C,N]_{t_2}\right)$$

où $[C,N]_t$ est la concentration en carbone ou en azote particulaire ($\mu g.mL^{-1}$) au temps t. Le taux de fixation de carbone par unité de carbone (j^{-1}) correspond au taux de croissance de la biomasse. Comme pour le taux de division, le calcul peut porter sur un lissage des points si la fréquence des prélèvements est suffisante.

ii. La méthode classique de dosage des lipides, lente mais précise

a) Une extraction aux solvants halogénés : Bligh and Dyer.

Les lipides totaux sont extraits *via* la méthode de Bligh and Dyer modifiée (Bligh & Dyer, 1959). 200 ml de culture sont centrifugés (JOUAN G 412) pendant 10 min à 2000 tour.min^{-1}, et le culot est conservé à -80°C. Une première extraction est réalisée à l'aide d'un mélange monophasique de chloroforme : méthanol : eau salée à 0.7% dans les proportions 1 :2 : 0.8 v.v^{-1}. Le mélange extractant ainsi que le culot d'algue sont mixés 1 min dans de la glace pour permettre une destruction totale des membranes plasmiques. La deuxième étape, qui consiste dans l'ajout de chloroforme et d'eau pour des proportions finales 2 : 2 : 1.8 v.v^{-1} de chloroforme : méthanol : eau salée à 0.7% respectivement, permet d'obtenir un mélange bi-phasique. La phase chloroforme contient les lipides totaux purifiés alors que la phase méthanol : eau contient les impuretés hydrophiles (protéines, sucres, etc…). Le chloroforme est ensuite évaporé sous diazote à 37°C pour éviter l'oxydation des lipides. Les lipides totaux obtenus sont déterminés par voie gravimétrique, puis stockés à -80°C sous diazote jusqu'à analyse.

b) Le cas particulier du bêta-carotène, une étape supplémentaire.

D. salina peut, sous certaines conditions, contenir jusqu'à 10% de son poids sec en bêta-carotène (Lamers et al., 2012). Ce composé, qui diminue la précision de la mesure des différentes classes de lipides, pose un réel problème pour leur quantification. Un protocole de séparation a donc été adapté (Nelson, 1967). Des micro-colonnes (Grace Davison, Silica 500 mg, 8 mL) sont activées et nettoyées par la séquence de solvant suivante : hexane : di-éthyléther (1.6%), chloroforme, méthanol, chloroforme, hexane : di-éthyléther (1.6%). L'échantillon de lipides totaux est repris dans 500 µL d'hexane: di-éthyléther (1.6%) puis déposé dans la colonne. 1 volume de colonne d'hexane : di-éthyléther (1.6%) est ensuite ajouté pour éluer le bêta-carotène (fraction A), puis 5 et 3 volumes de colonne de chloroforme : méthanol (1 :1) et méthanol respectivement sont ajoutés pour éluer les

autres lipides (fraction B). Les deux fractions obtenues sont stockées sous diazote à -80°C jusqu'à analyse. La fraction A, bêta-carotène, est déterminée gravimétriquement et sous-estimée de 8% du fait de la séparation imparfaite laissant une faible proportion de bêta-carotène sur la colonne qui se retrouve ensuite entrainée dans la fraction B.

c) Séparation des classes de lipides par chromatographie couche mince et analyse par Iatroscan-FID

Une masse connue de lipides est déposée par un automate (SES A4100 Autospotter puis NTS Iatroscan autospotter) sur des bâtonnets de silice (silica coat rods ; Chromarod-SIII). Un premier bain hexane : benzène : acide formique (80:20:1) de 24 min permet de séparer les lipides neutres des lipides polaires. Un second bain hexane : diéthyl-éther : acide formique (97:3:1.5) de 23 min permet d'affiner la séparation, et de séparer les différents lipides neutres. Un séchage à 110°C pendant 10 min est effectué avant de déterminer les classes de lipides à l'aide du Iatroscan-FID (Iatroscan New MK 5 from Iatron, softwear : Chromstar from SES Analysesystem ; Ackman 1981). La variabilité d'un triplicat est inférieure à 3% pour les composées majoritaires, et 15% pour les composés minoritaires (moins de 5% des lipides totaux).

iii. Le dosage des piments

Un volume connu de culture est filtré sur des filtres en fibre de verre (Watman GF/C, Maidstone, UK), lesquels sont stockés à -80°C jusqu'à analyse. Les pigments sont extraits dans l'obscurité à l'acétone pendant 1 heure à 4°C avec de fréquentes agitations. Après une centrifugation (JOUAN G 412) de 5 min à 2000 tour.min^{-1}, le surnageant est analysé au spectrophotomètre (Perkin Elmer UV/Vis Spectrophotometer Lambda2). La chlorophylle a, b et les caroténoïdes totaux sont estimés d'après la méthode de Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987) qui utilise les valeurs d'absorbance à 470, 644,8 et 661,6 nm. Une lecture de l'absorbance à 750 nm permet par ailleurs de s'assurer de la bonne centrifugation du mélange. La variabilité des triplicats est inférieure à 7%.

Dans le chapitre D (Etude de la réponse de *D. salina* aux effets concomitants de variations périodiques de lumière et de température), les pigments ont été dosés par HPLC (Agilent Technologies 1200). Un volume connu de culture est filtré, puis conservé à -80°C. Les pigments sont extraits 2 heures dans du méthanol 100% contenant de l'acétate de tocophéryle (vitamine E) comme standard interne. Les solutions contenant le filtre sont ensuite passées aux ultrasons et clarifiées par filtration (GF/F whatman) avant analyse.

V. La sélection

Les protocoles de sélection sont tous très spécifiques et seront explicités au cours de ce manuscrit dans les parties correspondantes. Néanmoins, ils obéissent au même schéma, lequel comporte une succession de cycles de sélection. Au cours du premier cycle, la culture est placée dans des conditions optimales de croissance, sans pression de sélection, permettant de caractériser le système à t = 0 j. Au cours des cycles suivants, la pression de sélection est progressivement augmentée par paliers. Si le taux de croissance moyen mesuré sur un cycle est non nul, le cycle suivant de sélection est entamé, pour maintenir en permanence une pression sur les cultures en cours d'adaptation, maximale. Dans le cas contraire, les cultures restent dans le même cycle de sélection avec une pression inchangée (Fig. C6).

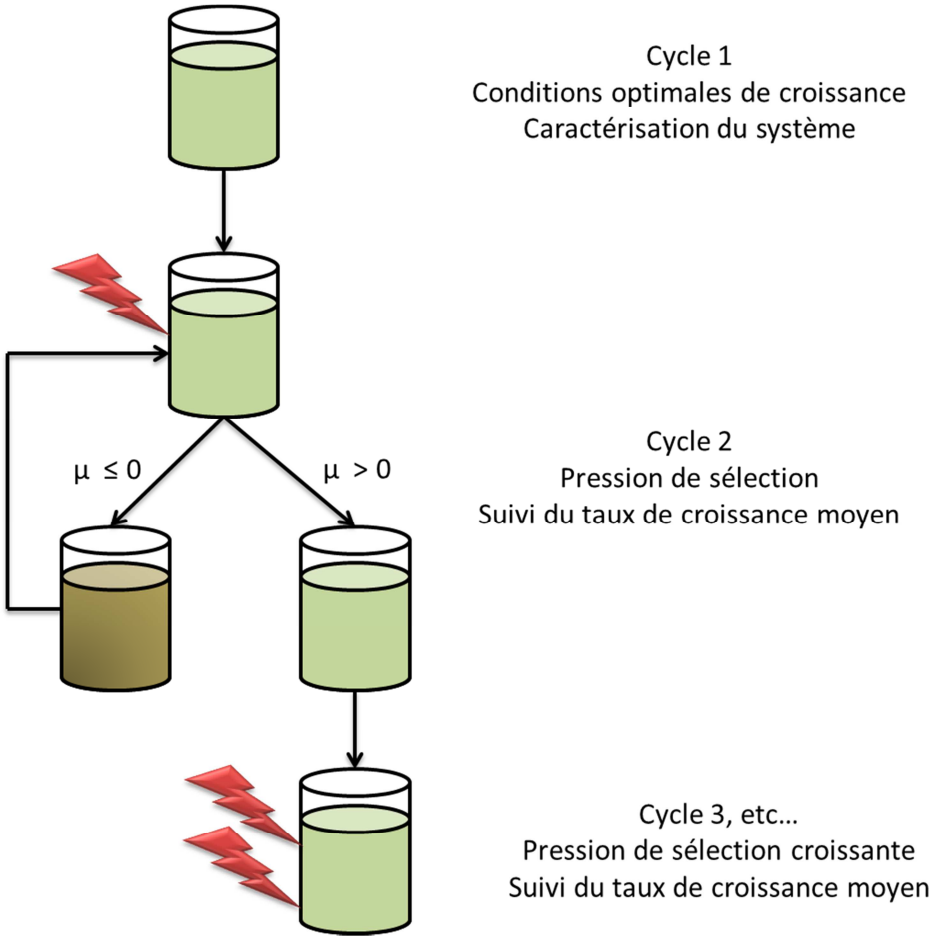


Figure C6 : Représentation simplifiée d'une expérience de sélection.

D. LA COMPREHENSION DE LA PHYSIOLOGIE DES ALGUES : UNE PREMIERE ETAPE VERS LA SELECTION

Dans tous ce que la nature opère, elle ne fait rien brusquement.
Jean-Baptiste De Lamarck (1744 – 1829)

I. La température : un paramètre clef, au cœur des mécanismes biochimiques, trop souvent reléguée au second plan.

Algal Research
Bonnefond H[a], Moelants N[a], Talec A[a], Bernard O[b], Sciandra A[a,b]
[a] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSU-CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, 181 Chemin du Lazaret, 06230 Villefranche-sur-mer, France
[b] INRIA BIOCORE, 06902 Sophia Antipolis, France

i. Introduction

Microalgae have developed numerous mechanisms to permanently adapt to a fluctuating environment. Key points for survival in periodic conditions are cell cycle synchronization with light and temperature (Spudich & Sager, 1980). The first consequence of this adaptation is the modulation of carbon and nitrogen acquisition during the cell cycle (Mocquet, Sciandra, Talec, & Bernard, 2013). The second comprises daily dynamics of storage metabolites like lipids (Lacour et al., 2012a ; Sukenik & Carmeli, 1990). The green microalgae *D. salina* grows in salt lakes or in shallow salterns and tolerates wide ranges of salinity, between 0.5 M to 5 M (H. Chen et al., 2009). Due to low water depth, this species has adapted its metabolism and cell cycle to high temperature and light variations over a course of a day. To survive within a changing environment, *Dunaliella sp* produces different compounds. Carotenoids, such as beta-carotene and lutein, are accessory pigments used as photoprotectors. *D. salina* is among the organisms containing the highest concentrations of carotenoids after metabolic stress (a Ben-Amotz & Avron, 1983). This species can also produce triglycerides (TAG) to store energy and carbon to sustain growth during the night. In addition, *Dunaliella sp* synthesizes glycerol as an osmo-regulator when grown in hypersaline environments (H. Chen et al., 2009). Industrially, this is the third most important microalgae produced in terms of dry weight (1200 t/year) after *Arthrospira* sp. and *Chlorella* sp (Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006). It is grown mainly for its carotenoids which have strong antioxidant properties that are utilized in the cosmetic and nutritional markets. Its ability to accumulate triglycerides as a potential source of biofuel is also gaining interest.

Photosynthesis is impacted by temperature and light fluctuations. The effect on inorganic carbon acquisition is direct for light, and indirect for temperature, which modulate enzymatic activity. The simultaneous impact of these factors needs to be studied to better understand the daily pattern of carbon acquisition and storage, but also, over a longer time scale, to comprehend its evolution with seasonal variations (Béchet, Shilton, Park, Craggs, & Guieysse, 2011). Some studies have been carried out with *D. salina* to investigate the individual effects of light or temperature on growth and metabolites(Chen et al., 2009 ; Béchet et al., 2011 ; García et al., 2007), but the effects resulting from their concomitant variations have not yet been studied. Thus the aim of this study was to investigate the effects of concomitant realistic evolution of temperature and light on the metabolic response of *D. salina,* mainly in terms of carbon and nitrogen acquisition and pigment and triglyceride content. These experimental results were compared to a control experiment where temperature was kept constant.

One of our key observations is that a periodic temperature evolution, which is rarely experimentally tested, seems to strongly impact cell dynamics. The cyclic effect of temperature also had a positive impact on carbon fixation.

ii. Materials and methods

Culturing system. *D. salina* (CCAP 18/19) was grown in duplicate 5L, temperature-controlled water-jacketed vessels previously washed with 10%HCl and rinsed with milli-Q water and sterile medium. The enrichment medium was prepared in 20 L tanks (Nalgen) filled with 3 weeks matured natural seawater filtered on 0.1 µm, and autoclaved at 110°C for 20 min. After cooling, f/2 medium was added (Guillard, 1975). Nitrates were added separately to the end concentration of 400 µM. Fresh medium filtered through a 0.22 µm sterile filter (SpiralCap, Gelman) was introduced into the continuous cultures with peristaltic pumps (Gilson) at a dilution rate equal to daily growth rate (Tab. 1). After inoculation, the starting cell concentration was about $2x10^4$ cell.mL^{-1} and cultures were first grown in batch mode to allow the algal population to increase rapidly. Then, the turbidostat mode was initiated to stabilize the population at $3x10^5$ cell.mL^{-1}, a concentration sufficiently high to allow accurate biochemical analyses on small volume samples, and sufficiently low to prevent nutrient limitation and light shading. Each day, the dilution rate (D) was checked by weighting with a precision balance the input flow during 2 min and adjusted, when necessary, to maintain a constant daily cell concentration. The pH was measured every minute and prevented from exceeding pH 8.3 by computer-controlled micro-addition of CO_2 in the bubbling air (see Le Floc'h, Malara, & Sciandra, 2003). Homogenous cultures were maintained by gentle magnetic stirring.

Light and temperature. Light was provided by two arrays of six 50 cm fluorescent tubes (Dulux®1, 2G11, 55W/12-950, lumilux de lux, daylight, OsramSylvania) placed on each side of the vessels. Photosynthetically active radiation (PAR) was measured by a 4π spherical collector (QSL-100, Biospherical Instruments) placed between or in the two turbidostats to assure that no light limitation occurred. Temperature was controlled and monitored using a temperature control unit (Lauda RE 415G). Light and temperature were recorded every minute.

Culture conditions. A typical meteorological pattern from a meteorological station located in the Laboratory of environmental biotechnology (INRA-LBE Avenue des Etangs F-11100 Narbonne, south of France), was used as a concrete example of daily natural variability impacting the culture in June. The daily change of temperature in the ponds was calculated by the model of Béchet et al. (2011), based on this meteorological data. The L/D (14L:10D) cycle was approached by a truncated sinus square function. These conditions were applied in the duplicate cultures C1-LT and C2-LT (LT, for light and temperature variations), while constant temperature (at the value of 27°C) was applied in the duplicate cultures C3-L and C4-L (L, for light variation only; Tab. 3). The light intensity was determined to reproduce the averaged irradiance in the pond. Using the Beer-Lambert law for light attenuation, the average light intensity was calculated from the light at the surface, as detailed in Bernard & Mairet, (2015).

$$I_{av} = \frac{I_{inc}}{\ln\left(\frac{I_{inc}}{I_{out}}\right)}\left(1 - \frac{I_{out}}{I_{inc}}\right) \quad (1)$$

where I_{inc} is the incident light intensity (µmol quanta.m^{-2}.s^{-1}) impinging the pond, and I_{out} the light at the bottom of the raceway. We assumed here that I_{inc} at noon was such that the photosynthesis rate at the bottom of the pond equaled the respiration rate, corresponding to the (optimal) compensation condition defined by Takache, Christophe, Cornet, & Pruvost, (2010). The compensation condition for *D. salina* was determined for I_{out} = 23 µmol quanta.m^{-2}.s^{-1} (a Ben-Amotz & Avron, 1983). From (1), it followed that, for the maximal incident light intensity in Narbonne, I_{inc} was 1364 µmol quanta.m^{-2}.s^{-1} and the averaged light intensity I_{av} at noon was equal to I_{inc}.× 0.22 = 300 µmol quanta.m^{-2}.s^{-1}. These conditions were obtained by a computer-controlled cultivation device able to maintain long term continuous cultures (Le Floc'h et al., 2003).

Cell population. Cell concentration and size distribution were monitored every two hours by an automated optical particle counter (HIAC - Royco; Pacific Scientific Instruments). The variability between triplicate measurements was routinely lower than 5 %. The mean cell diameter of the population was calculated from its size distribution. Due to high frequency acquisition, continuous functions could be fitted to cell density data using Stavitzky Golay filter (Savitzky & Golay, 1964). The division rate μ (d^{-1}) was then derived according to the following equation.

$$\mu = \frac{Ln(\frac{n_2}{n_1})}{t_2 - t_1} + D$$

where n_1 and n_2 are the cell concentrations ($cell.ml^{-1}$) at time t_1 and t_2, respectively, and D the dilution rate (d^{-1}).

Nutrient analysis. As described in Part C.

Lipids and pigments content analysis. As described in Part C.

Statistical analysis. Standard deviation was calculated using physical duplicates of the bioreactors (C1-LT, C2-LT and C3-L, C4-L). The two successive periods of 24 hours where superimposed. Finally, the presented points over 24 hours are the average over the two cycles and the duplicate reactors. The hypothesis of linear correlation was accepted considering a p-value > 0.05.

iii. Results

Light and temperature variations. Fig. E1 presents the variations of light and temperature in this experiment. It was noticeable that diel variations of temperature were able to reach high amplitudes, ranging from 24 to 33°C. The maximum of temperature (33°C) occurred at the end of the light period, whereas the minimum was reached at the end of the dark period. Contrary to the light regime, temperature variation was not symmetrical as it increased faster than it decreased.

	C-LT		C-L	
	C1-LT	C2-LT	C3-L	C4-L
Maximum light intensity (µmol.m-2.s-1)	278	289	297	273
Light pattern	Sinus square function 14L:10D			
Temperature (°C)	Periodic variations (24.4°C - 32.9°C)		Constant (27°C)	
Dilution rate (d-1)	0.69	0.70	0.42	0.45
Average cell concentration (cell/L)	2.01x108	2.24 x108	2.20 x108	2.51 x108

Table 3: Experimental conditions applied to the different continuous cultures.

Cell number and diameter. Cell division in C-LT as in C-L cultures occurred preferentially during the dark period with a major event of cell division at the end of the dark period (Fig. E2A). This shows that populations were partially synchronized by the light cycles. In C-LT, cell number increased during the dark period by 32 ± 4.7 %. Cell diameter increased quickly during the light period in C-LT, reflecting the important somatic growth induced by carbon photosynthetic fixation. It decreased more slowly during the dark period, reflecting both carbon respiration and cell division. Cell diameters increased only several hours after the onset of the light period, as cell division was still active during this time. Average cell diameter was significantly higher for C-LT (9.62 ± 0.01 µm) than for C-L (8.54 ± 0.01 µm; Fig. 2B).

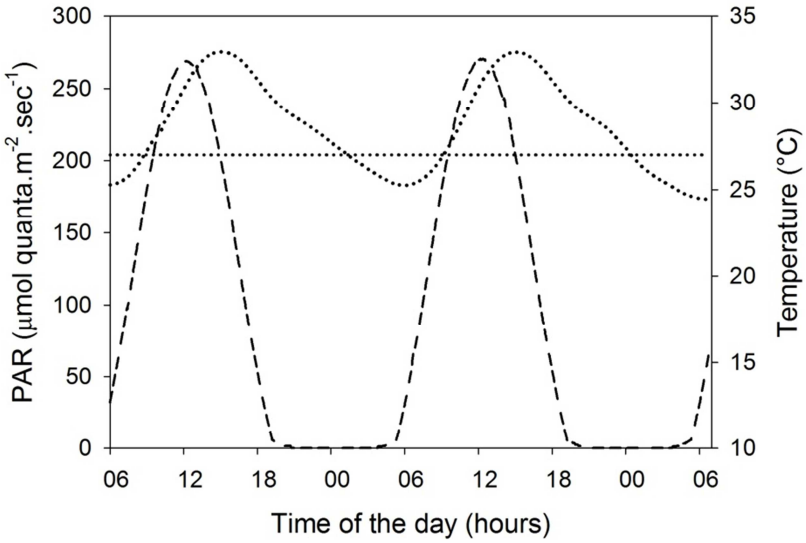


Figure D1 : PAR (dashed line) applied to cultures C-LT and C-L. Temperature was maintained constant at 27°C in C-L cultures (horizontal dotted line), whereas it varied in C-LT cultures (dotted curve).

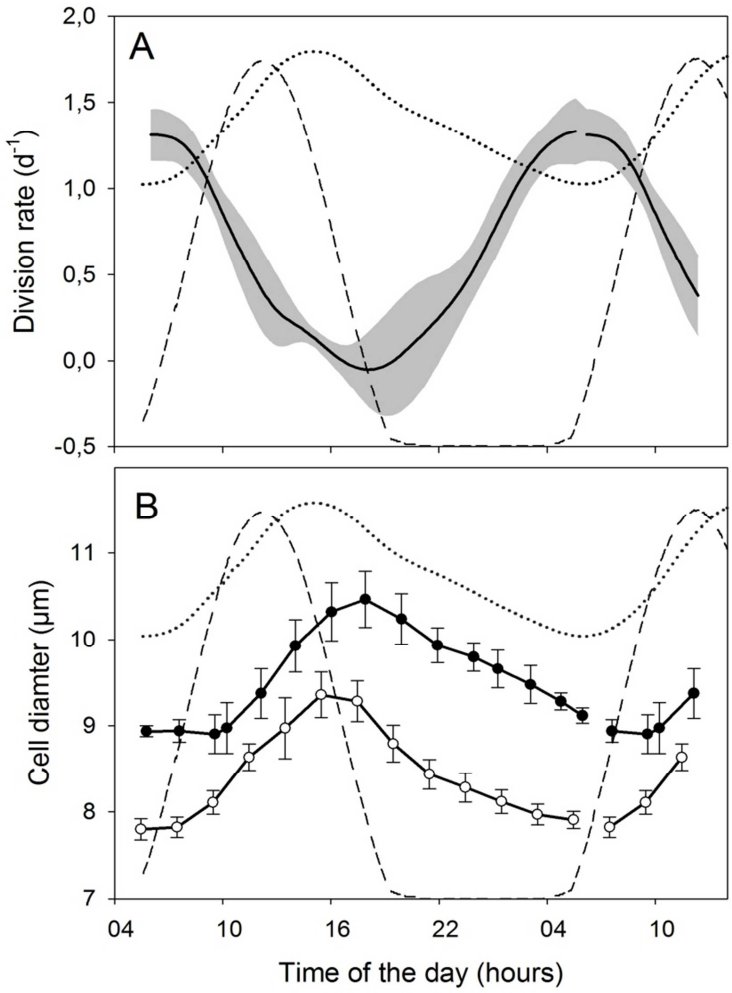


Figure D2 : A: mean cell division rate (continuous black line) +/- one SD (grey area) in C-LT cultures. B: mean cell diameter in C-LT (closed symbol) and C-L (open symbol) cultures. Temperature variations (dotted line), light variations (dashed line).

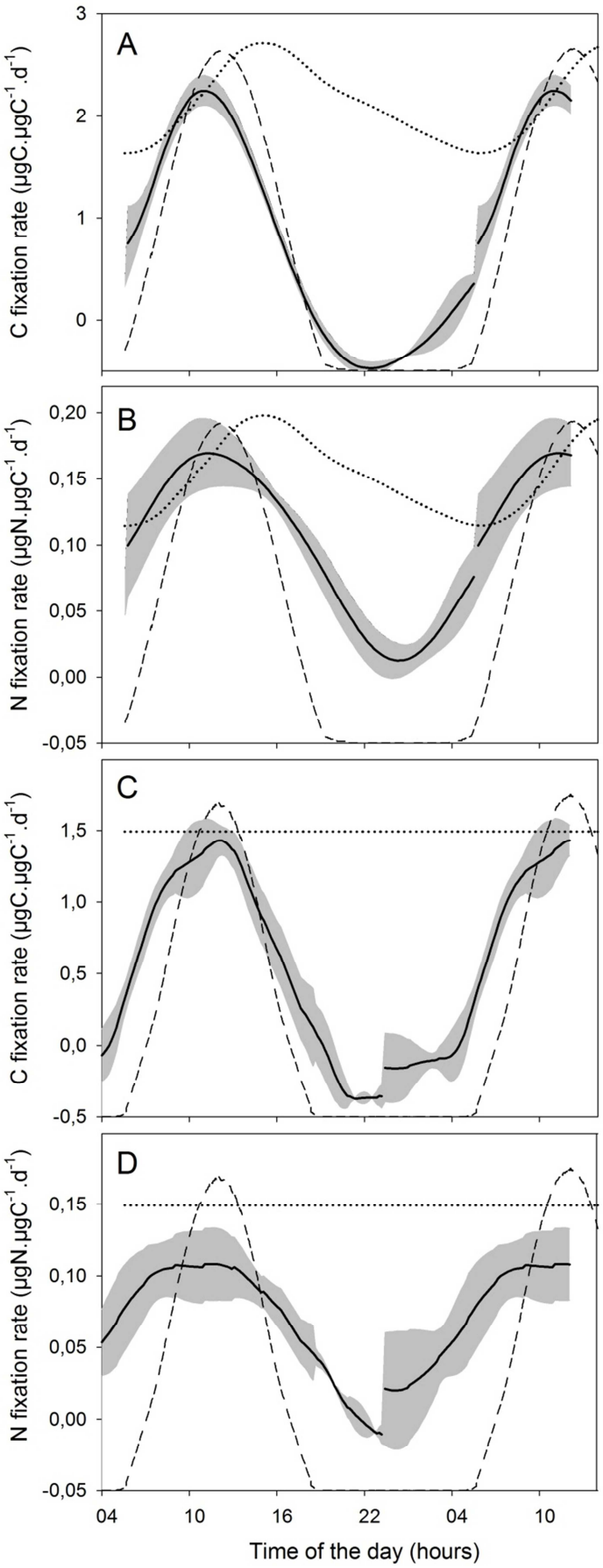


Figure D3 : Averaged values of carbon fixation rate in C-LT (A) and C-L (C) cultures, and of nitrogen fixation rates in C-LT (B) and C-L (D) cultures. Temperature variations (dotted line), light variations (dashed line).

C and N fixation. The daily-averaged carbon fixation rate (ρ_C) in C-LT was 0.66 ± 0.036 µgC.µgC^{-1}.d^{-1}. ρ_C values were lower in C-L, 0.53 ± 0.048 µgC.µgC^{-1}.d^{-1} in accordance with lower division rate. In the C-LT cultures, ρ_C was strongly correlated with the light intensity ($R^2 > 0.99$, p-value > 0.01, n > 20) with a maximum value observed just before noon, leading to a significant increase of cell C during the light period. The same trend was observed in C-L cultures ($R^2 > 0.95$, p-value > 0.01, n > 20; Fig. E3 A; Fig. E3 C; Fig. E6). At the end of the dark period, the respiration was responsible for C loss averaging 14.5 ± 2.9 % and 12.9 ± 0.48 % of the carbon accumulated during the previous 14h light phase, respectively in the C-LT and C-L cultures. Nitrogen fixation rate ρ_N was between five and tenfold lower than carbon fixation rate in all experiments (Table 4). In the C-LT cultures, nitrogen fixation also presented a diel cycle, leading to a significant increase of cell nitrogen during the light period (Table 4), but in contrast to carbon, significant fixation rates were also observed during the dark period (Fig. E3B). For the C-L cultures, nitrogen fixation rate followed approximately the same trend but with much lower rates (Fig. E3D).

	C1-LT	C2-LT	C3-L	C4-L
	C-LT		C-L	
Carbon fixation rate (µgC.µgC^{-1}.d^{-1})	0.66 ±0.036		0.53 ± 0.048	
Nitrogen fixation rate (µgN.µgC^{-1}.d^{-1})	0.094 ±0.010		0.069 ± 0.012	
Min cell carbon quota (µgC.cell^{-1})	8.89 ± 0.62 x10^{-5}		9.34 ±0.48 x10^{-5}	
Max cell carbon quota (µgC.cell^{-1})	1.49 ± 0.2 x10^{-4}		1.76 ± 0.13 x10^{-4}	
Min cell nitrogen quota (µgN.cell^{-1})	1.49 ± 0.14 x10^{-5}		1.4 ±0.08 x10^{-5}	
Max cell nitrogen quota (µgN.cell^{-1})	2.11 x10^{-5} ±0.22 x10^{-5}		2.36 ± 0.17x10^{-5}	
N dark period fixation (%) on 24h	19.0 ± 2.54		25.0 ± 1.17	
C dark period losses (%) on the previous 14h of light period	14.5 ± 2.9		12.9 ± 0.48	
24h C fixation (µgC.µgC^{-1})	0.66 ± 0.031		0.43 ± 0.0099	
14h light period C fixation (µgC.µgC^{-1})	0.76 ± 0.043		0.51 ± 0.025	
10h dark period C fixation (µgC.µgC^{-1})	-0.10 ± 0.028		-0.06 ± 0.018	
Max TAG quota (µg.µgC^{-1})	1.8 ±0.013 x10^{-2}	8.7 x10^{-3} ± 1.8 x10^{-3}	NA	NA
Min TAG quota (µg.µgC^{-1})	5.5 ± 1.0 x10^{-3}	3.21 ± 0.34 x10^{-3}	NA	NA
Max carotenoids quota (µg.µgC^{-1})	4.52 ± 0.23 x10^{-3}	NA	NA	NA
Min carotenoids quota (µg.µgC^{-1})	2.96 ± 0.048 x10^{-3}	NA	NA	NA

Table 4 : evolution of the different rates cell quotas (± standard deviation).

Chlorophylls and carotenoids. The pigments to carbon ratio (Fig. E4 A, B) increased during the dark period and decreased sharply at the beginning of the light period. During the dark period, the amount of pigments per cell did not change significantly until cell division induced significant reduction (data not shown). In all experiments, the Carotenoids: Chlorophyll ratio reached its maximum value a few hours after the light maximum (Fig. E4 C).

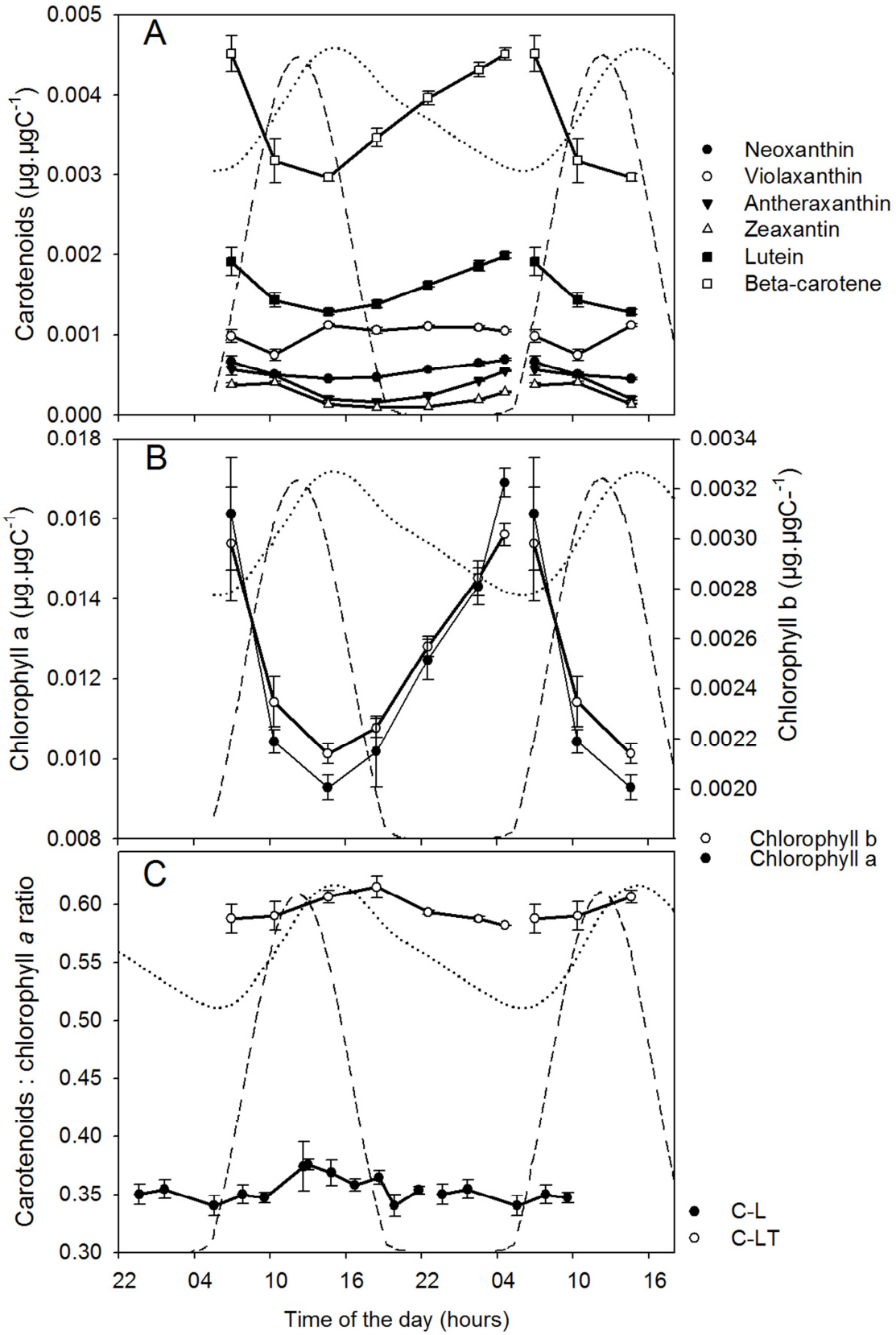


Figure D4 : A) quota of xanthophylls and beta-carotene in C-LT cultures. B) Quotas of chlorophylls *a* and *b* in C-LT cultures. C) Carotenoids: chlorophyll *a* ratio in C-L and C-LT cultures. Temperature variations (dotted line), light variations (dashed line).

Lipid response in C-LT cultures. Total lipids represented about 32 ± 4.8% of the cell carbon. In C-LT, the main lipid class was polar lipids. They represented 85 ± 3.3%, of total lipids, and were constitutive of cell membranes (phospholipids, glycolipids, galactolipids…). B-carotene and triglycerides contributed for 5 ± 3% and 3 ± 1% of total lipids, respectively. This distribution was conserved during the L/D cycle. The polar lipids: carbon ratio showed small diel variations (± 13 %) in response to the L/D regime, but the variations were much more marked for the triglycerides (± 36%; Fig. E5). Triglyceride concentrations increased throughout the light period reaching a maximum at the beginning of the dark period, and then decreased during the dark period (Table 4). Triglycerides by carbon unit were higher in C1-LT than in C2-LT.

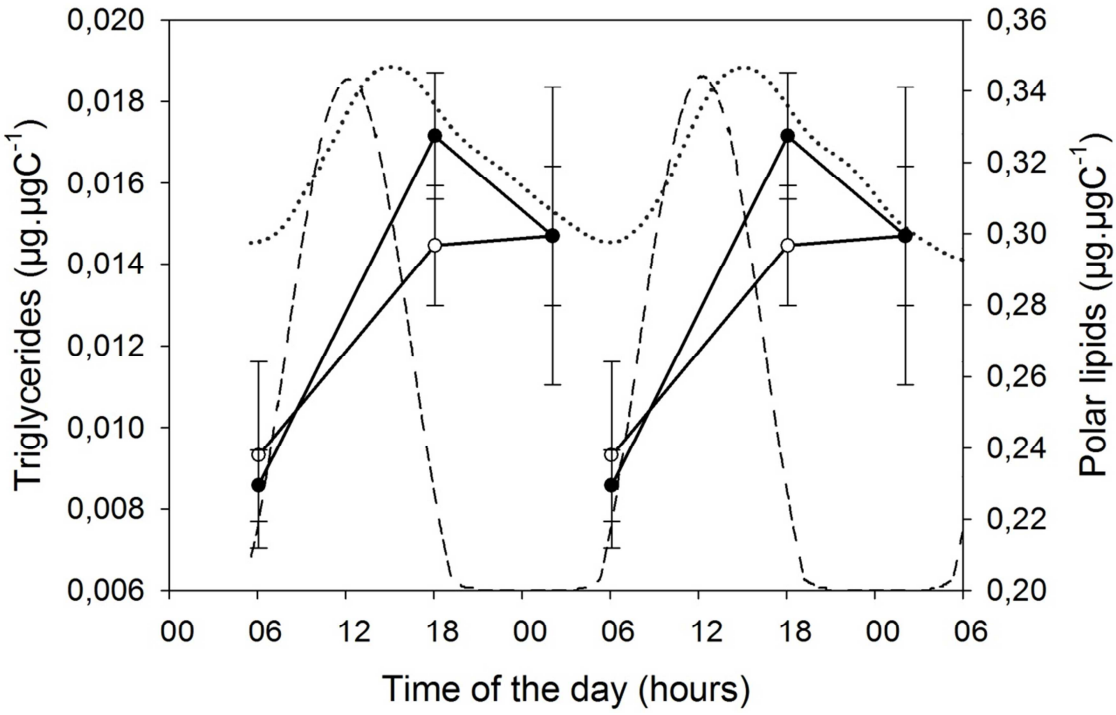


Figure D5 : Quotas of polar lipids (open symbol) and triglycerides (closed symbol) in C-LT cultures. Temperature variations (dotted line), light variations (dashed line).

iv. Discussion

Responses of nitrogen and carbon quotas to light and temperature. In all experimental conditions, the specific carbon fixation rate ρ_C was tightly linked with the photon flux density (PFD), and the maximum fixation rate coincided with the light peak (Fig E3A, E3C). The linear relationship between ρ_C and PFD suggests that the light level applied to the cultures was neither saturating nor photo-inhibiting (Fig. E6). In contrast, nitrogen fixation rate ρ_N was much less correlated with PFD, even if higher rates were observed during the light period (Fig E3C, E3D). This reflects the fact that, in non-limited cultures, nitrogen fixation is principally controlled by both the energetic status and the cell cycle (Mocquet et al., 2013). In the current experiments, the decrease in nitrogen fixation during the dark phase could be partly explained by the very low level of carbon storage. Since the energy and carbon necessary for dark fixation of nitrogen can also be provided by the respiration of carbohydrates (not measured), it is questionable to attribute the decrease in nocturnal nitrogen fixation to the low level of triglycerides reached during the night, even if this status can potentially contribute to the depression of dark nitrogen fixation. Another not exclusive explanation is that nitrogen fixation is repressed during mitosis just before cell division (Mocquet et al., 2013).

The C:N ratio in the CL-T cultures was maximum at the end of the light period, i.e. when temperature and level of stored lipids were maximal, and nitrogen uptake begins to decrease. The C:N ratio was not influenced by temperature. There was no difference in the C:N ratio between C-LT and C-L across the L/D cycle.

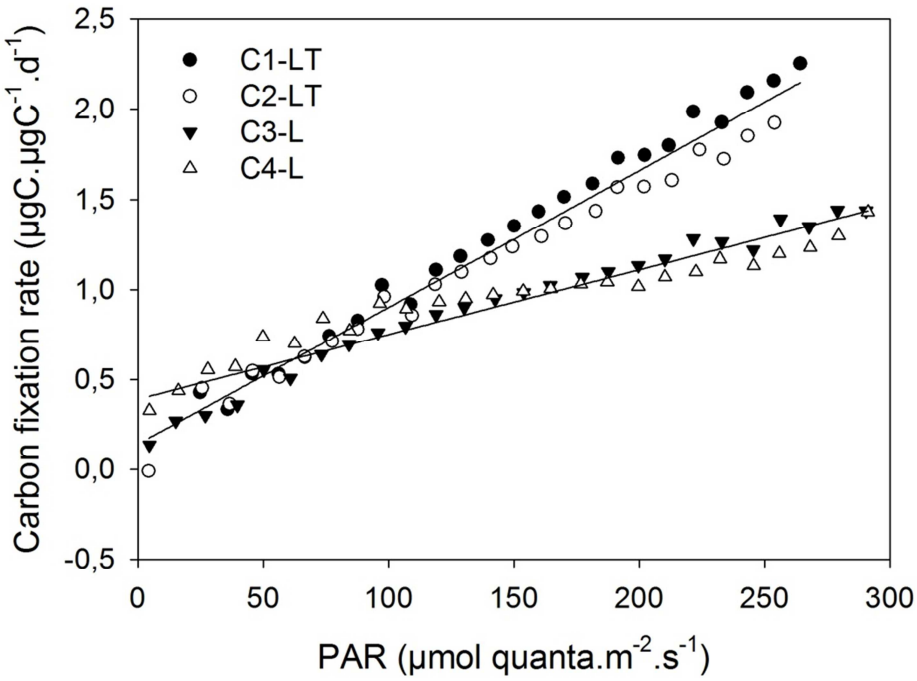


Figure D6 : Correlation between the specific carbon fixation rate and PAR in C-LT and C-L cultures.

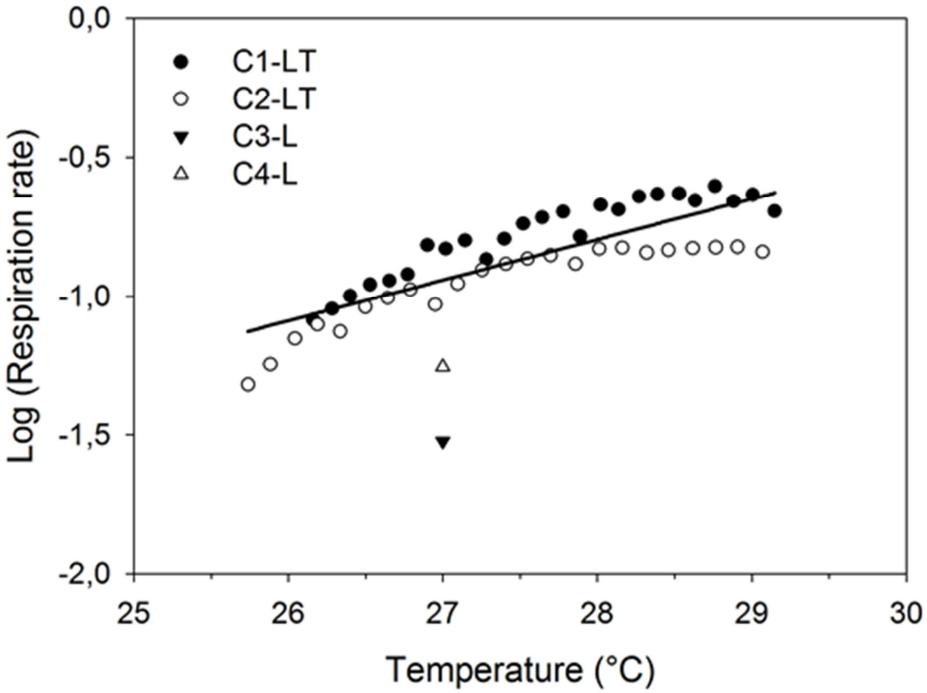


Figure D7 : Arrhenius plots of respiration rate measured during the dark period only, in C-LT and C-L cultures.

Why the growth rate difference between C-LT and C-L? Despite the fact that the same light regime was applied to the cultures, the daily net carbon fixation rate was significantly higher in C-LT than in the C-L culture, i.e. by 25% (Tab. 4). Such a marked difference of carbon fixation rates between 2 sets of cultures where the daily averaged temperature differed by only 1.8°C was clearly unexpected. Using the data of García et al. (2007) for *D. Salina* and the model of Bernard & Rémond, (2012), it was shown that, all things being equal, a difference of 1.8°C can change the growth rate by about ± 10%, which is much less than the +25% observed in this study. Our hypothesis to explain this discrepancy may be that the temperature in C-LT cultures was not constant but cycling. Indeed, some authors have shown that periodic light variations increased growth rate when compared with constant conditions (Nielsen, 1992). Temperature could act similarly. Towards a better understanding of the underlying phenomena, we examine here if the differences of measured carbon fixation and dark respiration between C-LT and C-L cultures can explain their difference in net carbon fixation.

Firstly, it is worth noting that the difference in ρ_C between C-LT and C-L cultures increased when PFD exceeded 100 µmol quanta.m^{-2}.sec^{-1}. The difference was maximum at 300 µmol quanta.m^{-2}.sec^{-1} (Fig. E6). This also corresponded to higher temperatures in C-LT than in C-L. During this part of the light period, the carbon fixation rate was more stimulated in the C-LT cultures by high temperatures, leading to a 50% higher total amount of carbon fixed than in C-L (Table 4). This suggests that the temperature increase in C-LT during the light period had a clear positive synergetic effect on carbon fixation, compared to C-L at this temperature range.

Secondly, the potential difference in respiration for different temperature regimes during the dark period may explain the difference between C-LT and C-L. Under L/D cycle and constant temperature, the dark respiration rate is dependent on both the light phase duration and light intensity, and is also correlated to the incubation temperature by an Arrhenius law (Grobbelaar & Soeder, 1985). Under dynamic temperature variations, respiration during the dark period was still correlated to the

temperature through the same relationship, with a high level of confidence ($R^2 = 0.70$, p-value > 0.05, n > 20, C-LT; Fig. E7). This is not surprising as respiration is under the control of enzymes that are tightly controlled by temperature (Devos, Ingouff, Loppes, & Matagne, 1998). In C-L cultures, such a relationship could not be revealed, as the temperature was maintained constant at 27°C. Mean respiration rates were lower in C-L than in C-LT cultures, confirming the fact that under L/D cycles, respiration is related to the temperature experienced during the light period (Grobbelaar & Soeder, 1985).

In conclusion, the higher temperature during the light period in C-LT leads to a higher carbon fixation rate and a higher respiration rate during the dark period than in C-L. The resulting balance of these opposite terms was a higher net C fixation in C-LT.

Lipid storage: a consequence of C-N imbalance uptake in C-LT. In non-limiting conditions, the major lipid class is polar lipids (Fig. E5). In agreement with Lacour et al. (2012a), polar lipids per carbon unit did not significantly change during the L/D cycle, whereas polar lipids per cell showed a marked minimum observed during the major cell division event (dark period). This preponderantly membrane lipid class is related to cell volume that varied during the L/D cycle ($R^2 = 0.83$, p-value < 0.01, n = 14). In C-LT, the total lipid content was 32 ± 4.8 $\mu g.\mu gC^{-1}$ on average (representing 17 % in dry weight, calibration curves not shown), in accordance with the data of Griffiths & Harrison, (2009). The contribution of energetic lipids, mainly triglycerides, represented only 5% of the total lipid, confirming that under replete nitrogen conditions, triglycerides are not the main form of carbon storage in this strain of *Dunaliella*. The amount of triglycerides per carbon unit reached a maximum at the end of the light period. This reflects the imbalance between nitrogen and carbon fixations observed during the light period (Tab. 2) where the excess of fixed carbon could be reallocated in N-free molecules like triglycerides. This mechanism similarly drives the lipid accumulation in nitrogen starvation (Vítová et al., 2015). In this scenario, cells adapt to the diel cycle by using the energy stored during the light period to proceed to division during the dark phase.

Pigment evolution across a light dark cycle. To our knowledge, no data on carotenoid~~s~~ evolution across a L/D cycle has been published for *D. salina*. In C-LT, the measured concentrations of beta-carotene per carbon unit reached an average value of 0.004 $\mu g.\mu gC^{-1}$ (2% of the dry weight), that is 10-fold lower than the measurements of (García et al., 2007) measured at constant light. This unexpected low level cannot be solely explained by the replete nitrogen conditions in our experiment, but is also probably a characteristic of the chosen strain. There was an increase of beta-carotene content per carbon unit during the dark period due to a decrease in carbon by respiration. This corresponded to a specific beta-carotene fixation rate high and constant (0.7 $\mu g_{Beta\text{-}Carotene}.\mu g_{Beta\text{-}Carotene}.d^{-1}$). At the end of the dark period, during cell division, this increase ceased and the pigment content per carbon unit decreased corresponding to a sharp decrease in the specific beta-carotene fixation rate until the value of 0.5 $\mu g_{Beta\text{-}Carotene}.\mu g_{Beta\text{-}Carotene}.d^{-1}$. The same behavior was observed for all the pigments except zeaxanthin. Beta-carotene did not play any role in respiration. Under L/D cycle and nitrogen replete conditions, beta-carotene does not function as carbon storage molecules, in contrast to what happens during nitrogen starvation (Lamers et al., 2008). Moreover, in synchronized cultures, beta-carotene, as the other pigments, was continuously produced by cells except during the cell division event when nitrogen acquisition stopped (Mocquet et al., 2013). The carotenoids: chlorophylls a (car:chla) ratio has been suggested as a possible indicator of stress level [24, 5]. In previous nitrogen deprivation experiments, with constant light and temperature, carotenoids: chlorophylls a ratio of 13.2 was reached, whereas for nitrogen replete cultures, a ratio of 0.52 was measured (data not shown). In C-LT, the carotenoids: chlorophylls a ratio evolved between 0.58 ± $1.23x10^{-2}$ g:g at the beginning of the light period to 0.62 ± $9.13x10^{-3}$ g:g, whereas, the evolution was between 0.34 ± $9x10^{-3}$ g:g and 0.38 ± $4x10^{-3}$ g:g g/g in C-L (Fig. E4). These low ratios confirmed the absence of photo-limitation in this experiment. The increase of this ratio was concomitant with light and reached its maximum a few hours after the light maximum. The temperature evolution did not seem to have impacted this ratio but the sampling frequency was probably too low to observe significant differences.

v. Conclusion

This study highlights the growth dynamics of *D. salina* under diel fluctuations of light and temperature, and provides some insights towards understanding the growth dynamics under realistic outdoor conditions. In particular, the importance of temperature variations on cell metabolism is highlighted, suggesting that this parameter should be more often taken into account in addition to light in experimental studies. Additional realistic experiments should support modeling attempts, since, to date, there is no reliable model able to predict algae production in outdoor cultivation systems subjected to concomitant and large variations of light and temperature.

vi. Acknowledgements

H. Bonnefond acknowledges the support of an ADEME grant. The experiments were carried out in the framework of the FUI Salinalgue project. He equally gratefully acknowledges B. Rémond for her kind help during sampling and Q. Béchet for his intellectual honesty.

II. La production de lipides et de caroténoïdes chez *D. salina* sous limitation et carence en azote.

Algal Research
Bonnefond H[a], Moelants N[a], Talec A[a], Bernard O[b], Sciandra A[a,b]
[a] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSU-CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, 181 Chemin du Lazaret, 06230 Villefranche-sur-mer, France
[b] INRIA BIOCORE, 06902 Sophia Antipolis, France

i. Introduction

In the context of global warming and oil shortage, researches have targeted photosynthetic organisms as a source of biofuel, since they incorporate CO_2 using light energy. The biodiversity of microalgae contains promises to achieve high production yields with a reduced environmental footprint. Among the species of interest for biofuel production, *Dunaliella salina* is an halotolerant green algae able to grow in extreme saline environment between 0.5 and 5.0 M NaCl, limiting the contaminations by competitors and predators (Karni & Avron, 1988 ; Oren, 2005).

D. salina can produce high amounts of triglycerides, depending on the growth conditions (6.0 to 25.0 % dw ; Mata, Martins, & Caetano, 2010). Moreover, some studies have highlighted the relationships between triglycerides and beta-carotene accumulations in *D. salina* (H Mendoza et al., 1999 ; Lamers et al., 2012). Triglycerides synthesis could trigger beta-carotene production but this link rests poorly understood and documented. *D. salina* is the microalgae with the highest content in beta-carotene, reaching 10% dw under stress conditions. Pathways of beta-carotene biosynthesis are now understood but control mechanisms rest unclear (Lamers et al., 2008). Beta-carotene is produced in thylakoids as a photosynthetic product and accumulated into lipids droplets located in the inter-thylakoid spaces (Vorst, Baard, & Mur, 1994), in the chloroplast (a. Ben-Amotz, Katz, & Avron, 1982) and/or in the cytoplasm (Rabbani et al., 1998 ; Govender, Ramanna, Rawat, & Bux, 2012b). Lipids droplets are surrounded by a stabilizing monolayer of phospholipids and specific proteins and formed connected organelles (Katz et al., 1995).

Carotenoids constitute a class of natural terpenoid pigments derived from a 40-carbon polyene chain. This backbone is complemented by cycles and oxygenated functional groups (Britton, 1995). Its characteristics are the important number of double bonds enabling them to absorb the excess energy from other molecules and light. The nature of the functional groups of carotenoids affects polarity, chemical properties and oxidation degree.

Over production of lipids and beta-carotene by nitrogen starvation is well documented (Lamers et al., 2012). Nevertheless, no information is available concerning triglycerides and beta-carotene productions under nitrogen limitation. Nitrogen starvation and limitation induces very different physiological responses. We use the definition of these states, by MacIntyre & Cullen, (2005) : ‘‘limitations refers to acclimated growth in which the growth rate is reduced as a result of nutrient availability; starvation refers to unbalanced growth in response to recent depletion of a nutrient; stress is the inclusive generic term that covers both conditions’’.

This paper focus on the lipid storage strategy faces to nitrogen deprivation, in *D. salina*. It provides some hints to a better understanding of the coupling between triglycerides and beta-carotene. The chemostat mode is a very good tools to study different nutrient limitations at equilibrium and to address these questions (M. Droop, 1966). As beta-carotene was a very special molecule, a new methodological approach was developed to analyze accurately beta-carotene and lipids content.

ii. Materials and methods

Culturing system. *Dunaliella salina* (CCAP 18/19) was cultivated in two duplicates, 5l water-jacked cylindrical photobioreactors connected to a cryostat (Lauda RE 415G) maintaining a constant temperature of 25°C. Light was provided by two arrays of six 50 cm fluorescent tubes (Dulux®1, 2G11, 55W/12-950, Lumilux de lux, daylight, OsramSylvania, Danvers, MA, USA). Photosynthetic active radiation (PAR), continuously recorded with a 4π spherical collector (QSL-100, Biospherical Instruments, San Diego,CA, USA) placed between the two photobioreactors, was adjusted at 400 µmol quanta.m².s^{-1}. Air filtered through active charcoal and 0.1 µm Whatman filter was continuously bubbled. pH was maintained at 8.3 by computer-controlled micro-injections of CO_2 in the bubbled air (Sciandra et al., 2003). Before starting nitrogen limitation treatment, microalgae were grown in the photobioreactors during 15 days in replete conditions in order to stabilize biomass, growth rate and to let algae acclimate to the culturing conditions.

Nitrogen control. The enrichment medium was prepared in 20 L tanks (Nalgen) filled with 3 weeks matured sea water pumped at the surface of the Villefranche's bay (France), filtered on 0.1 µm and autoclaved at 110°C for 20 min. After cooling, f/2 medium (Guillard, 1975) was added. NO_3^- was lowered to obtain a final concentration (s_0) of 260 µM in the inflowing medium. This concentration allowed the cultures biomass to be stabilized at a level where self-shading was low and cell density sufficient to obtain accurate biochemical analysis from small volume samples. Renewing medium was added into photobioreactors by peristaltic pumps (Gilson), after online filtration on 0.22 µm sterile filter (SpiralCap, Gelman). Dilution rate (D) was checked daily and adjusted if necessary. Various intracellular nitrogen status were obtained by adjusting D. (i) N replete conditions were obtained by setting D equal to the maximum growth rate measured during the pre-cultivation phase. (ii) Different levels of N limitation were obtained by setting D at 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 d^{-1} respectively. (iii) N starved cultures were obtained in batch mode (D = 0, Fig. D8). Nitrates and nitrites were routinely

measured with a Technicon Auto-analyzer coupled to an automated sampling and filtering device (Bernard et al., 1996).

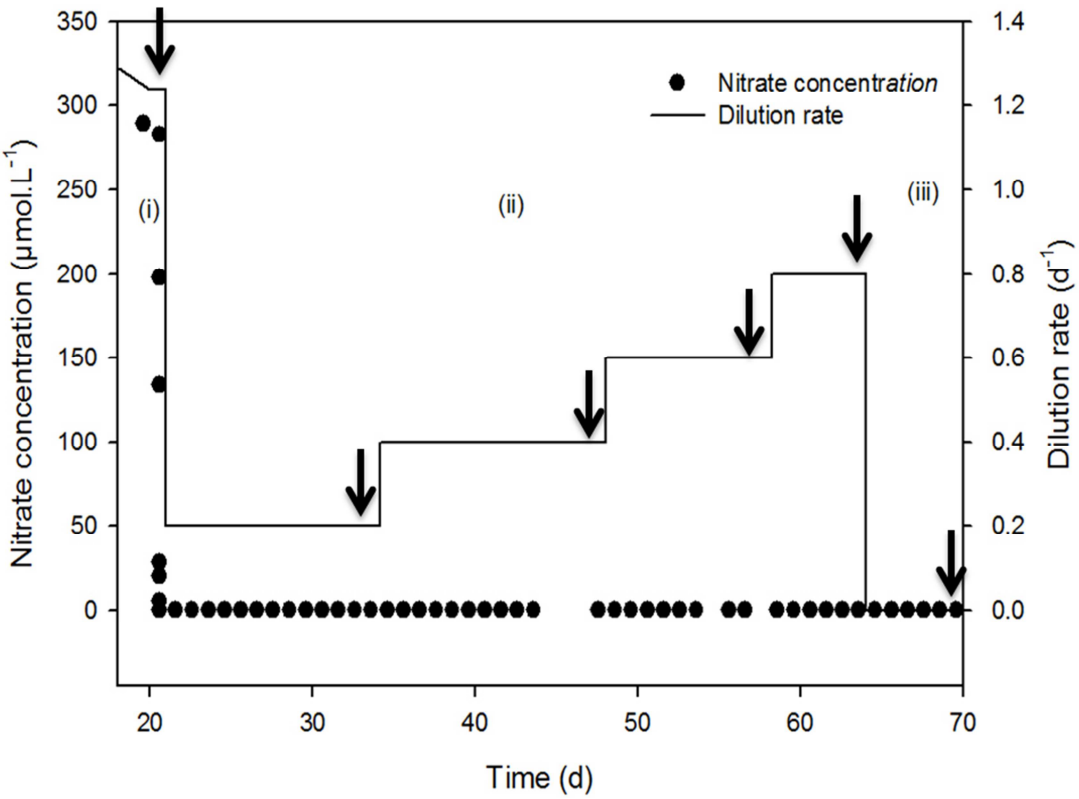


Figure D8 : Dilution rate and nitrate concentration in the photobioreactor. Black arrows represent sampling for lipid measurements at equilibrium.

Cell concentration, cell size, particulate carbon and nitrogen. As described in Part C.

Chemostat model. In a continuous culture, the time variations of microalgae biomass *X* and limiting nutrient *s* can be given by the Droop model (Droop, 1983):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - D X \quad (2)$$

$$\frac{ds}{dt} = Ds_0 - Ds - \rho(s)X \quad (3)$$

with μ the growth rate, *D* the dilution rate, s_o the concentration of the limiting nutrient in the enrichment medium, and $\rho(s)$ the uptake rate of the limiting nutrient per unit of *X*, which can be represented by the Michaelis-Menten equation:

$$\rho(s) = \rho_m \frac{s}{s+k_s} \quad (4)$$

with ρ_m the maximum uptake rate and k_s the half saturation constant that can be determined experimentally.

Droop (1966, 1968) showed that the growth rate μ is related to the internal quota (q) of the limiting nutrient (originally vitamin B_{12}), according to the following expression:

$$\mu(q) = \overline{\mu}\left(1 - \frac{q_0}{q}\right) \quad (5)$$

In our experiment, q is the amount of nitrogen per carbon unit (i.e. the N:C ratio), q_0 the minimum value of q below which growth is not possible, and $\overline{\mu}$ the theoretical maximum growth rate obtained for an infinite value of q (q_m).

The equation describing the time variation of q is:

$$\frac{dq}{dt} = \rho(s) - \mu(q)\, q \quad (6)$$

At equilibrium, *i.e*. when $\mu=D$, see (1), it can be demonstrated (Sciandra & Ramani, 1994) that the microalgae biomass, X^* (µgC.L^{-1}) at equilibrium, is a function of the dilution rate and s_o, according to the following expression :

$$X^* = \frac{(\overline{\mu} - \mathrm{D})(\overline{\mu}\rho_m s_0 - \mathrm{D}\rho_m s_0 - \overline{\mu} q_0 k_s \mathrm{D} - \overline{\mu} q_0 \mathrm{D} s_0)}{\overline{\mu} q_0 (\overline{\mu}\rho_m - \overline{\mu} q_0 \mathrm{D} - \mathrm{D}\rho_m)} \quad (7)$$

Lipids sampling and extraction. As described in Part C.

Beta-carotene separation. As described in Part C.

Lipid class determination. As described in Part C.

The lipid productivity by biomass unit, P_L (µg.µgC^{-1}.d^{-1}) is expressed as follow:

$$P_L = \mu \ L \quad (8)$$

µ (d^{-1}) being the carbon specific growth rate, and L (µg.µgC^{-1}) the amount of lipids per carbon unit.

Statistical analysis. For each limitation step, each value represents the average of n ≥ 6 ± standard deviation measured on two independent photobioreactors. Tests were considered significant for p-values > 0.05.

iii. Results

Beta-carotene separation. To develop a reliable protocol to separate beta-carotene from other lipids, a step by step analysis of the column chromatography process was performed following the methodology presented in Tab 5. Four fractions were recovered and weighted, 2 majors (A and D), and 2 minors (B and C) in terms of mass. This separation protocol was very reproducible. The standard variation of mass obtained was lower than 5 % (n = 9) and included all the steps from biomass recovery to column separation.

Each fraction was then analyzed in triplicates by thin layer chromatography coupled with FID (flame photometric detection; Fig. D9). Among the six molecules identified in fraction A, beta-carotene was the most abundant and situated in the more non-polar position. The other ones were located in more polar positions and corresponded visually to a yellow/orange spots (data not shown). Fractions B and C were very low in terms of mass and mainly composed of triglycerides and fatty free acids. Beta-carotene residues (about 8%) were found (orange spots in non-polar position) in these fractions. Fraction D was composed of triglycerides, vegetal-sterols, diglycerides and polar lipids such as phospholipids and glycolipids.

Spotting of the sample	0.5 ml of hexane, 1.6% of diethyl-ether
Fraction A	1 column volume of hexane, 1.6% of diethyl-ether
Fraction B	1 column volume of hexane, 1.6% of diethyl-ether
Fraction C	1 column volume of hexane, 1.6% of diethyl-ether
Fraction D	5 column volume of chloroform/methanol (1:1) 3 column volume of methanol

Table 5: sequence of solvents used for separating and recovering the different lipid fractions.

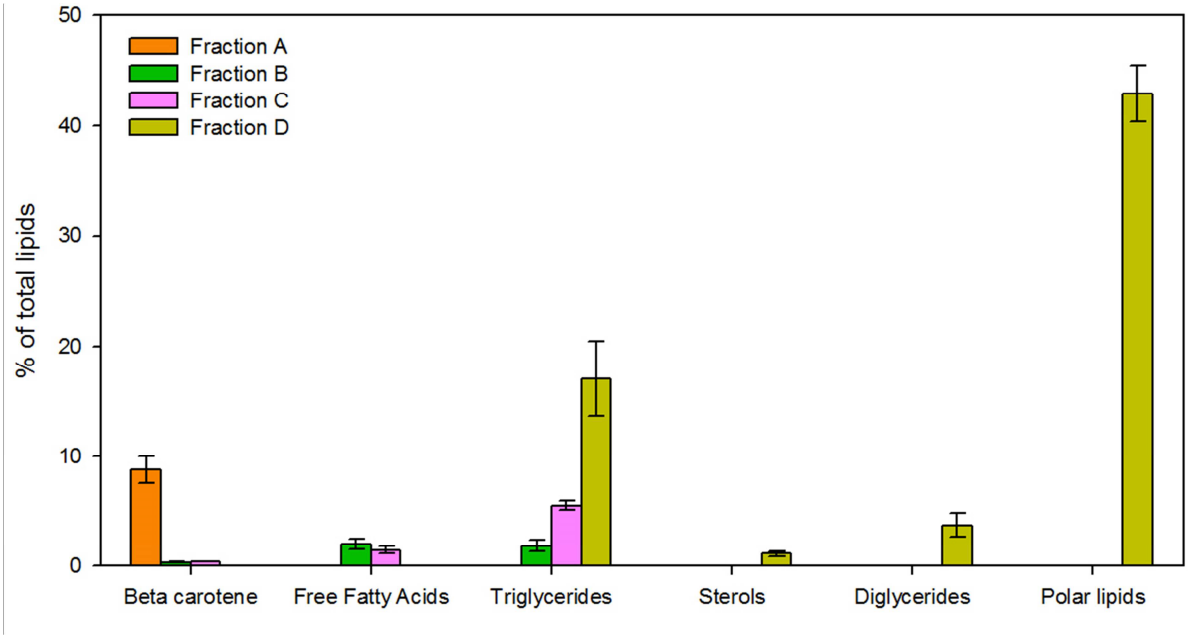


Figure D9 : characterization of the separation. Mass repartition and composition of each fraction in term of lipid classes.

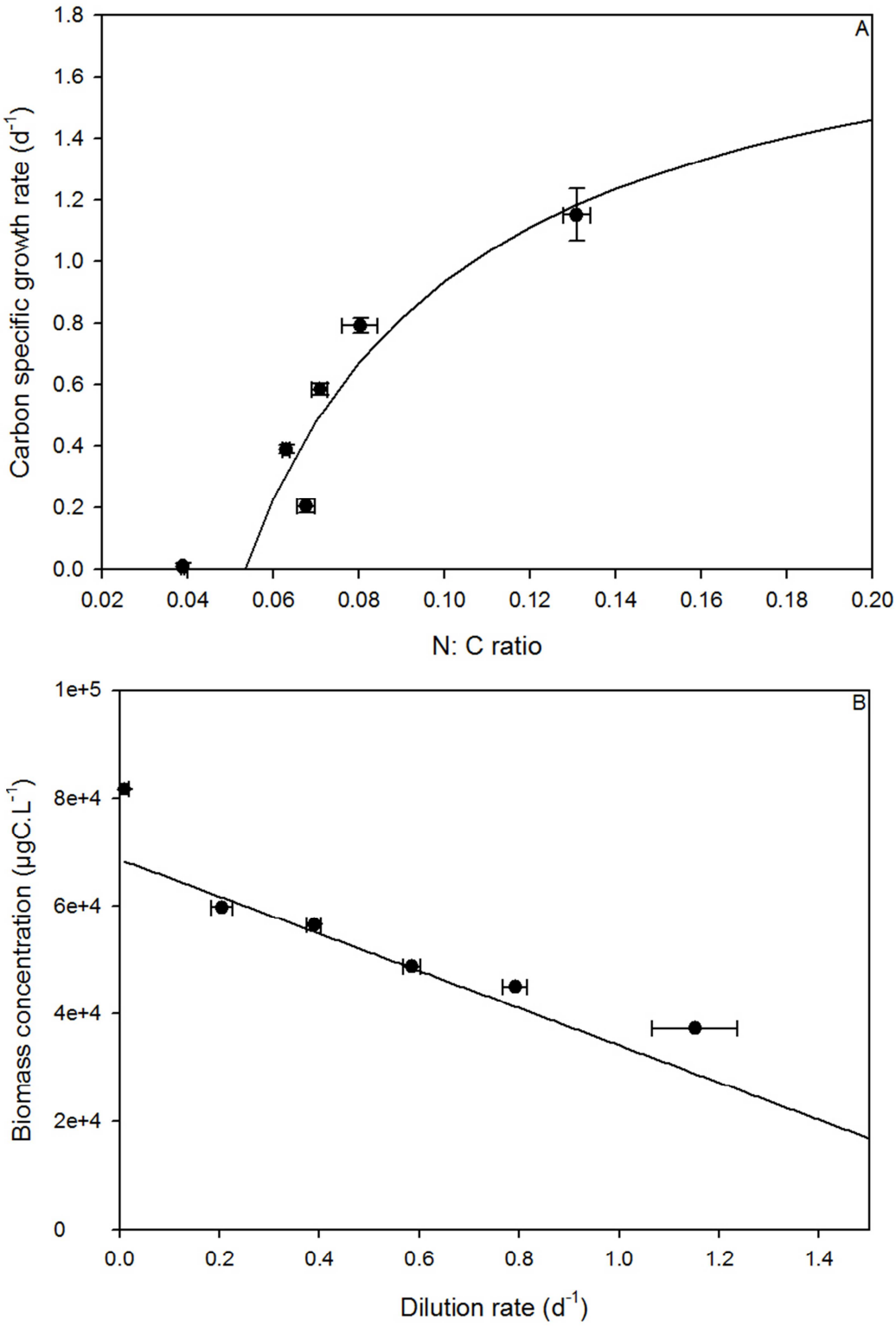


Figure D10 : A) nitrogen quota (N/C) measured at steady state for the different dilution rates tested (open circles), and fitted Droop equation (black line). B: Measured (open circle) and predicted (black line) values of algal carbon biomass at steady state.

Steady states reached under nitrogen limitation. The expected relationship between growth rate and nitrogen quota steady state measurements was verified (Fig. 10). Note that the data obtained for D=μ=0 were not considered here, as they were not acquired in continuous culture conditions. Fitting equation (5) to these data allowed estimating the parameters $\overline{\mu}$ and q_o of the Droop model (Tab. 6). Parameters of NO_3 uptake equation (4), ρ_m and k_s, were measured and estimated from literature (Mairet et al., 2011), respectively. This set of parameters allows calculating the steady state algal biomass in function of the dilution rate, according to equation (7).

Parameters	Units	Value
$\overline{\mu}$	d^{-1}	1.99
q_0	$\mu gN.\mu gC^{-1}$	0.053
ρ_m	$\mu gN.\mu gC^{-1}.d^{-1}$	0.15
k_s	$\mu gN.L^{-1}$	18

Table 6 : *D. salina* parameters for Droop and Michaelis Menten equations

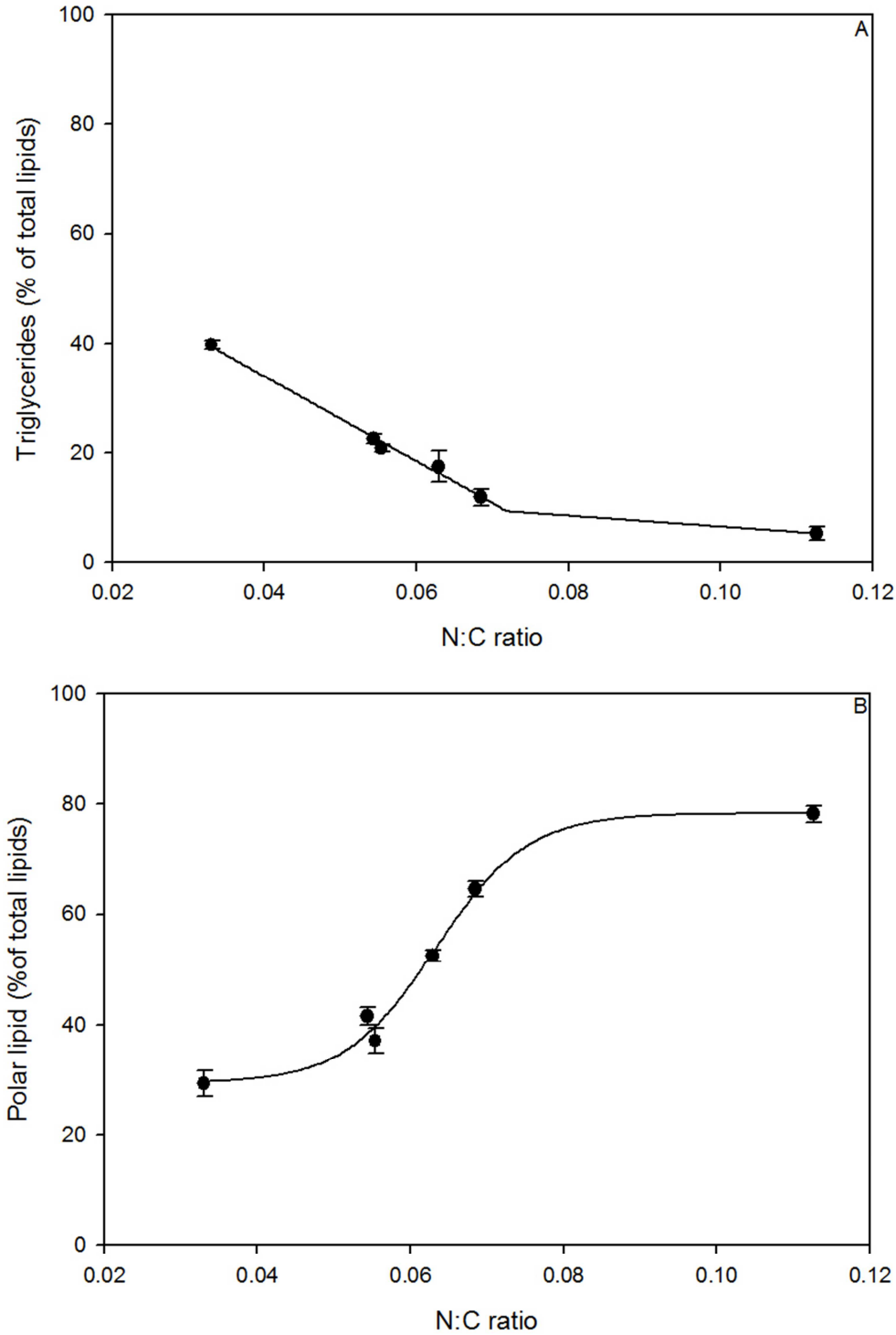


Figure D11 : lipid evolution as a fraction of total lipids with respect to the N:C ratio. A) Triglycerides content. B) Polar lipids content.

Lipid evolution with the nitrogen status. In nitrogen limitation and starvation, triglycerides were negatively correlated with the nitrogen quota (R^2adj = 0.99; n = 10; p-value > 0.05). This correlation was less marked in nitrogen replete conditions (high N:C ration; Fig. D11 A). Polar lipids were positively correlated with N:C ratio and followed a sigmoid curve (R^2adj = 0.97; n = 12; p-value > 0.05 ; Fig. 11 B). Total lipids per carbon were not related to nitrogen quota (0.23 ± 0.01 $\mu g.\mu gC^{-1}$). Nevertheless, in starvation case, when N:C ratio was very low, an increase of 43% was observed to reach the concentration of 0.33 +/- 0.02 $\mu g.\mu gC^{-1}$.

Beta-carotene content as a function of triglycerides content. A strong correlation was observed between beta-carotene and triglycerides (slope coefficient = 1.32 ± 0.29 $\mu g_{Beta\text{-}carotene}.\mu g_{Triglycerides}^{-1}$; R^2adj = 0.87; n = 14; p-value > 0.05; Fig. D12). Nevertheless, in nitrogen starvation, beta-carotene and high triglycerides content became uncoupled.

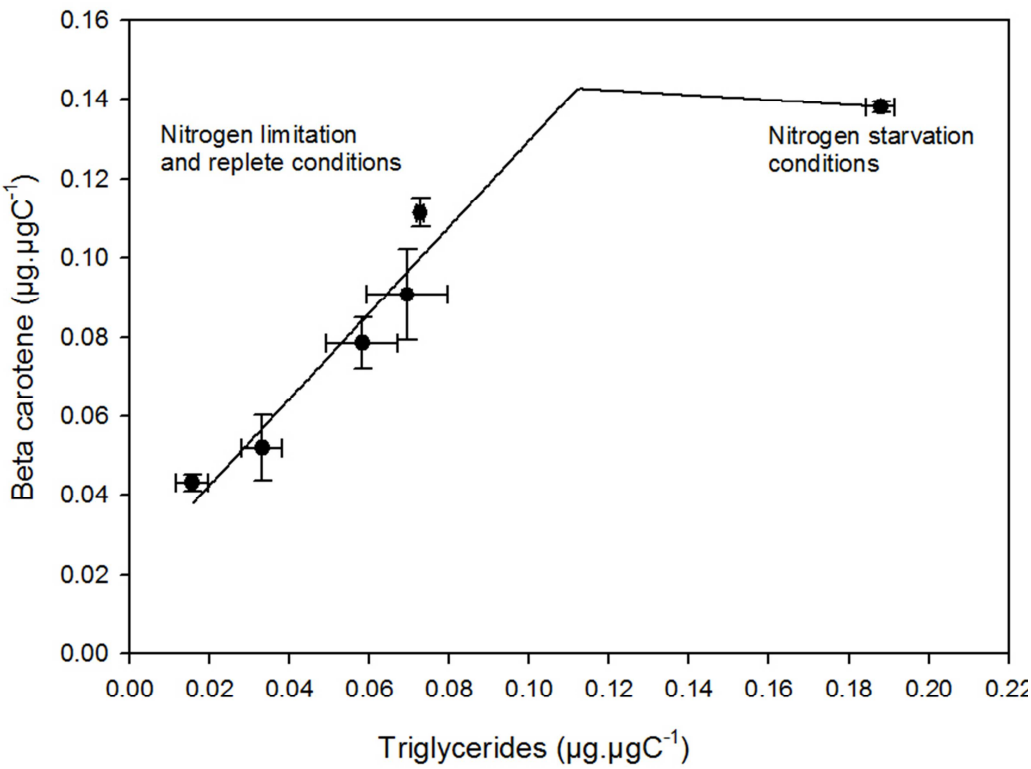


Figure D12 : beta-carotene versus triglycerides content.

Triglycerides and beta-carotene productivity. Beta-carotene and triglycerides productivity by biomass unit increased equally with N: C ratio from 0 to 0.038 ± 0.005 µg.µgC^{-1}.d^{-1}. For high dilution rates, in nitrogen replete conditions, beta-carotene productivity stayed high whereas triglycerides productivity decreased sharply (Fig. D13).

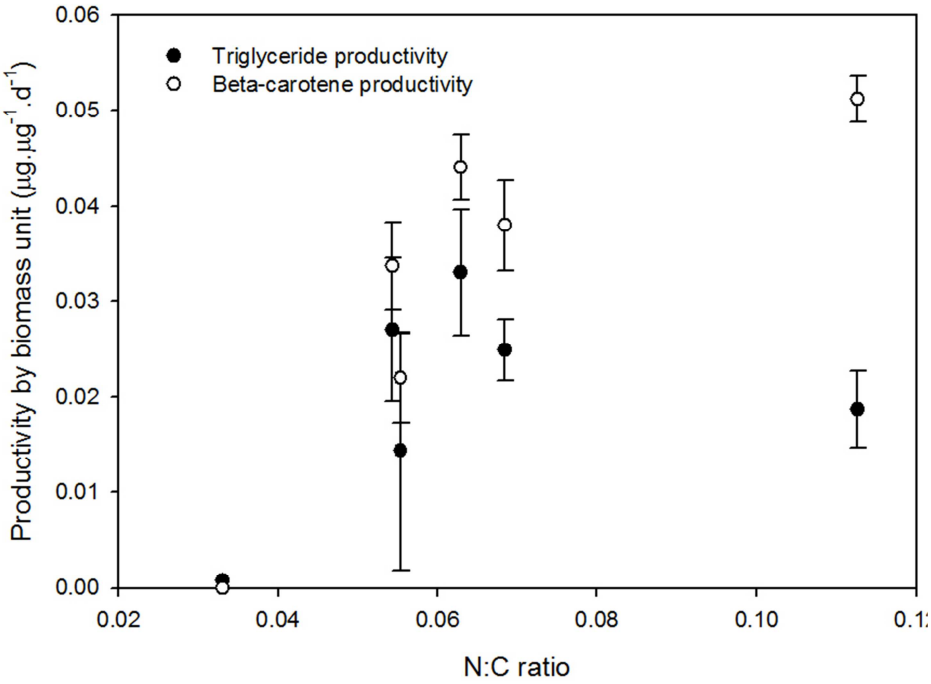


Figure D13 : productivity of triglycerides and beta-carotenes as a function of nitrogen quota.

iv. Discussion

A new protocol for beta-carotene separation. In starvation conditions, beta-carotene represented a large proportion of total lipids (about 30%). The chemical particularities of beta-carotene constituted a source of problems for the accurate determination of other lipid classes (Britton, 1995). Firstly, due to its high proportion in the lipid fraction and its low polarity, beta-carotene played a role of solvent and co-elutes others lipids in thin layer chromatography. Secondly, the oxidative products of beta-carotene had lower polarities than beta-carotene and were eluted partially with others lipid classes. Thirdly, the mix beta-carotene, other lipids was very viscous and blocked the autospotters syringe used during the lipid class analysis. All these factors put together, tended to decrease the sensitivity and the precision of analyses. A new separation protocol with chromatography micro-column adapted to the determination of *D. salina* beta-carotene concentration was thus developed. Chromatographic technics have been largely studied and applied on pigments separation since 1900 (Albertsson, 2003), but separation between pigments and other lipids was less studied. The use of industrial micro-columns allowed a better reproducibility and reduced the solvent volume and lipid mass required for reliable analyses (less than 15 ml and 3 mg respectively). Based on the results of Hirsch & Ahrens (1958) and Carroll (1961), different proportions of diethyl ether in hexane were tested to separate mixes of beta-carotene and triolein standards (data not shown). These works helped to determine that 1.6% of diethyl ether in hexane was optimal. Then, an analysis on biological material from *D. salina* was performed to characterize precisely, the separation process. Different volumes of solvents were used to recover all the lipid classes (Tab. 5).

In the fraction A, high amount of beta-carotene was observed with other different yellow molecules in much lower concentrations (data not shown). Beta-carotene is a very oxidative molecule (Demmig-Adams & Adams, 2002). During extraction, this compound is exposed to oxidative conditions such as oxygenated solvents, di-oxygen, light and temperature (Zeb & Murkovic, 2010). The beta-carotene oxidation products presented higher polarity than beta-carotene since they contain oxygen (Britton,

1995). They generally keep their yellow/orange color, except in case of very strong oxidation and were eluted slowly during thin layer chromatography, explaining the others yellow spots in more polar position than beta-carotene. As a conclusion, in fraction A, only beta-carotene and some carotenoids were found. In fraction B and C, the less polar free fatty acids and triglycerides were found with some rests of beta-carotene (Fig. D9). At least, in fraction D, all the other major lipid classes were found. The separation was routinely reduced in two steps. The first one, eluted with 1 volume of hexane, 1.6% diethyl-ether, permitted to recover beta-carotene (fraction A) with an underestimation of 8 %, and the second, eluted with 5 and 3 volume of chloroform:methanol 1:1 and methanol respectively, permitted to obtain all the other lipids corresponding to fractions B, C and D. This protocol was non oxidative as it was indicated by the low fraction of free fatty acids (oxidative marker), which was less than 2% of total lipids.

Nitrogen status of microalgae during the experiment. There was a good correspondence between the measured and predicted values of algal biomass and growth rate at equilibrium. These results show that equilibrium was reach, nitrogen limitation was effective and in accordance with the chemostat theory, at the both cell (Fig. 10 A) and culture (Fig. 10 B) level. As a conclusion, lipid analysis was performed at the culture equilibrium, the aim of this work.

For the dilution rate of 0.2 d^{-1}, carbon specific growth rate diverged slightly from the theory. C:N ratio was higher than expected (Fig. 10 A). At this dilution rate, equilibrium was not reach at the cell level. Various authors have found difficulties to reach equilibrium at low dilution rate (M. Droop, 1966). (Sciandra & Ramani, 1994) explained these results by the presence of bacteria that become competitive at low growth rate for the limiting substrate.

From total lipids to triglycerides. Very few works studied the effect of nitrogen starvation and limitation on triglycerides synthesis. In starvation or for very high nitrogen limitations (low dilution rates), the decrease of the nitrogen quota (N:C ratio), led to an increase in the triglycerides content. This response was in agreement with literature (Klok et al., 2013 ; Saoudi-helis, Dubacq, Marty,

Samain, & Gudin, 1994 ; Lacour et al., 2012b). Nevertheless, for low nitrogen limitation (high dilution rate), strategies to store carbon differ strongly between species. For some species, triglycerides content and N:C ratio remained strongly correlated with nitrogen quota (*D. salina* in this study; *Neochloris oleoabundans* in Klok et al., 2013); whereas, for other species, they were uncoupled (*Isochrisis lutea* ; Lacour et al., 2012b ; Saoudi-helis et al., 1994). At least, in nitrogen replete conditions (high N:C ratio), the triglycerides content showed a minimal value. This term always found in literature (Klok et al., 2013 ; Saoudi-helis et al., 1994), represented the minimal needs in terms of triglycerides for cell in non-stressing conditions (5 % of total lipids in *D. salina*). Some studies showed that triglycerides were not only a final product in lipid anabolism but constitute intermediary products in biosynthesis of glycolipids and phospholipids (Khozin-Goldberg et al., 2000). Moreover, the idea that lipid droplets, mainly made of triglycerides, are more than simple storage tanks but are connected organelles is emerging explaining the need of a minimal triglycerides quota (Davidi, Katz, & Pick, 2012; Ladygin, 2014 ; Schmidt et al., 2006).

The effect on nitrogen starvation of total lipids in *D. salina* was not clear, Ben-Amotz, Tornabene, & Thomas, (1985) and Lamers, Janssen, De Vos, Bino, & Wijffels, (2012) showed not significant changes in total lipids by biomass unit between nitrogen starvation and nitrogen replete conditions whereas an 35% increase was observed in this study. They measured lipids quickly after the nitrogen starvation (at the end of the log phase and 3 days after, respectively) whereas our samplings were made 6 days after the beginning of the starvation. During the 6 previous days, N:C ratio evolved strongly. As *D. salina* seemed strongly influenced by nitrogen quota, a difference in 'starvation state' could lead to strong difference of total lipid responses. Unfortunately, very few authors measured the N:C ratio. Without the cell nitrogen status, it is very difficult to check that the cells are in similar physiological starvation state. Concerning polar lipids, a sigmoid response was observed. This minimum value was the minimum cell needs for structural lipids (mainly cell and organelles membranes) in starvation state, 30% of total lipids (0.12 $\mu g.\mu gC^{-1}$).

From triglycerides to beta-carotene. Beta-carotene has three major functions i) absorb excess light to avoid photo-damage on the photosynthetic machinery, ii) absorb active oxygen species created by the production of oxygen under a photon flux iii) be a carbon sink when cells receive excess energy in imbalance growth (Lamers et al., 2008). In nitrogen limitation, beta-carotene, as triglycerides are over produced mainly to store excess energy and carbon into molecules which do not contain nitrogen. Triglycerides are accumulated into intra or extra plastidic lipid droplets. These triglycerides bodies are delimited by a monolayer of phospholipids, stabilized by carotene globule proteins (Katz et al., 1995), which are not very well characterized. In *Dunaliella salina,* these bodies contained also beta-carotene (Rabbani et al., 1998).

For the first time, the strong link between these two interesting molecules was clearly demonstrated (Fig. D12). Rabbani et al., (1998) showed that an inhibition of triglycerides pathway leaded to the inhibition of beta-carotene accumulation. They concluded to a causal interdependence between lipid globules formation and the increase of beta-carotene content. They hypothesized that beta-carotene synthesis was stimulated by lipophilic sink created by triglycerides droplets (package effect). Generally, lipid droplets are mentioned in *Dunaliella salina,* as triglycerides including beta-carotene. In this work, droplets revealed to be composed of an equal mix between triglycerides and beta-carotene (1.32 $\mu g_{Beta\text{-}carotene}.\mu g_{Triglycerides}^{-1}$). So, the working of these droplets seems more than a simple carbon and energy reservoir. Borel et al., (1996) showed that beta-carotene solubility in artificial triolein droplets stabilized by phospholipids had a maximum value of 0.3 $_{\mu g Beta\text{-}carotene}.\mu g^{-1}_{triolein}$ much lower to the 1.32 $\mu g_{Beta\text{-}carotene}.\mu g_{Triglycerides}^{-1}$ found. The over-concentration of beta-carotene *in vivo*, into lipid droplets was probably due to the lipid droplet structure and the presence of proteins that stabilized the emulsion. In starvation, the decrease in nitrogen quota led to a decrease of the carotenoid globule protein content. At a certain point, there were not enough proteins to stabilized lipids droplets, triglycerides content continued to increase but the lipids droplets volumes stayed constant and beta-carotene synthesis was slow down.

Mendoza et al., (1999), demonstrated the linear correlation between beta-carotene and oleic acid in *D. salina.* In their study, as the maximum beta-carotene content reached was low (12 pg.cell^{-1} instead of 20.4 pg.cell^{-1}) and they triggered beta-carotene using high light and no nitrogen starvation, they only found the linear correlation and not the uncoupling part.

Lipid and beta-carotene productivity by biomass unit. In nitrogen starvation and limitation, beta-carotene and triglycerides production evolved similarly. In this situation, they played the same role of carbon sink and followed the same dynamics. However, in nitrogen replete condition, cell productivity diverged between beta-carotene and triglycerides (Fig. D13). In non-stressing conditions, these two molecules have very different roles. The first acts as a photo-protectant pigment in photo-acclimation process always vital whereas, the second is minor metabolites in structural lipid metabolism.

v. Conclusion

This study highlighted the growth and lipid production of *D. salina* at different nitrogen limitation levels. It suggested some hints to manage culturing process. The strategy to store carbon under the form of lipids appears to be species depend in nitrogen limitation but less marked in starvation. The strong correlation between triglycerides and beta-carotene was confirmed revealing, for the first time, the uncoupling of the two metabolisms at high triglycerides concentrations. Studies should be carried out for better understanding the lipid droplet formation and its role in beta-carotene production. The mechanism of beta-carotene storage into lipid droplets is still unclear and should be investigated at a proteomic level.

vi. Acknowledgements

H. Bonnefond acknowledges the support of an ADEME grant. The experiments were carried out in the framework of the FUI Salinalgue project.

E. BOITE A OUTILS POUR LE SCREENING DE SOUCHES PLUS PRODUCTIVES EN LIPIDES

Nous ne sommes savants que de la science présente.
Michel de Montaigne (1533 – 1592)

La recherche d'espèces et de souches plus productives en lipides nécessite la maitrise d'un certain nombre d'outils pour isoler, amplifier et caractériser, les individus d'intérêt. En premier lieu, il faut disposer de techniques de conservation, d'enrichissement et d'isolement monoclonal des microalgues. Ces techniques, essentielles pour la sélection par screening, restent fondamentales pour les autres types de sélection (OGM, mutation ou pression continue ; Andersen, 2005). En second lieu, il est important d'avoir des méthodes de dosage rapides et reproductibles des lipides pour caractériser précisément les nombreuses souches obtenues lors de la sélection.

I. Screening d'une souche de *D. salina* plus riche en bêta-carotène par isolement monoclonal.

Le terme « sélection de souche » recoupe de nombreuses approches dont l'une, la sélection par screening, a été utilisée pour isoler un clone d'intérêt de *D. salina* à partir d'un prélèvement d'eau naturel et hétérogène, issu des salins de Gruissan réalisé par Eric Pruvost[2]. Les meilleurs individus sélectionnés sur deux critères, leur taux de croissance et leur couleur en conditions non carencées, ont permis d'obtenir un clone sur-accumulateur de bêta-carotène.

Le travail d'isolement et de pré-caractérisation est le fruit d'une intéressante collaboration avec le service culture du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer[3]. La caractérisation complète de la souche obtenue, réalisée par l'IFREMER de Nantes, sous la direction de Loïc Le Dean, dans le cadre du projet Salinalgue, ne sera pas présentée ici.

[2] Ingénieur au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer, équipe PEPS, membre du projet Salinalgue.
[3] En la personne de Sophie Marro, assistante ingénieure en charge de la Mediterranean Culture Collection of Villefranche sur mer (MCCV) ; souchothèque de microalgues méditerranéennes.

i. Les étapes du screening : d'une population hétérogène à l'obtention d'un clone productif

Enrichissement et pré-isolement. La biodiversité du prélèvement naturel étant trop forte, une première approche d'enrichissement à haute concentration en sel a été réalisée. Cet enrichissement devait permettre d'augmenter la densité cellulaire des microalgues résistantes aux chocs osmotiques, *i.e. D. salina,* pour faciliter leur isolement monoclonal. Le prélèvement naturel a donc été mis en culture dans du milieu F/2 (Guillard, 1975) à 120 $g.L^{-1}$, à 17°C pendant deux semaines.

Puis, une seconde technique de pré-isolement a été utilisée, la dilution sériée. Le prélèvement naturel enrichi, a subi une dilution sériée au $1/10^{ième}$ dans une plaque 24 puits (premier puits dilution par 10, 24ième puits, dilution par 10^{24} du prélèvement naturel). L'objectif était d'obtenir une unique cellule, pour un isolement monoclonal ou tout du moins, une pré-séparation des différentes espèces pour faciliter l'isolement ultérieur. Ce pré-isolement ne contenait plus, *in fine*, que deux morphotypes de *D. salina* ainsi qu'un petit contaminant de type cilié.

Elimination du contaminant par augmentation de la salinité. A partir du pré-isolement par dilution sériée, une augmentation progressive de la salinité a été réalisée pour éliminer le contaminant de type cilié. La salinité a été augmentée de 120 à 150 puis 230 $g.L^{-1}$ en 4 semaines, aboutissant à son élimination. Le mélange final ne contenait donc plus que deux morphotypes différents.

Leur isolement s'est fait à l'aide d'une pipette pasteur effilée. Chaque cellule aspirée était rincée 12 fois sur plaque d'isolement avant d'être mise en culture, dans une plaque 24 puits (milieu f/2, 230 $g.L^{-1}$ de NaCl, 17°C ; Andersen, 2005). A l'issu de ce travail, les deux morphotypes ont été séparés, 24 clones étaient disponibles et partagés en deux groupes visuellement différents. Les clones 'vert' en conditions non carencées (19 clones) et les clones 'orange' en conditions non carencées (5 clones ; Fig. E1, A).

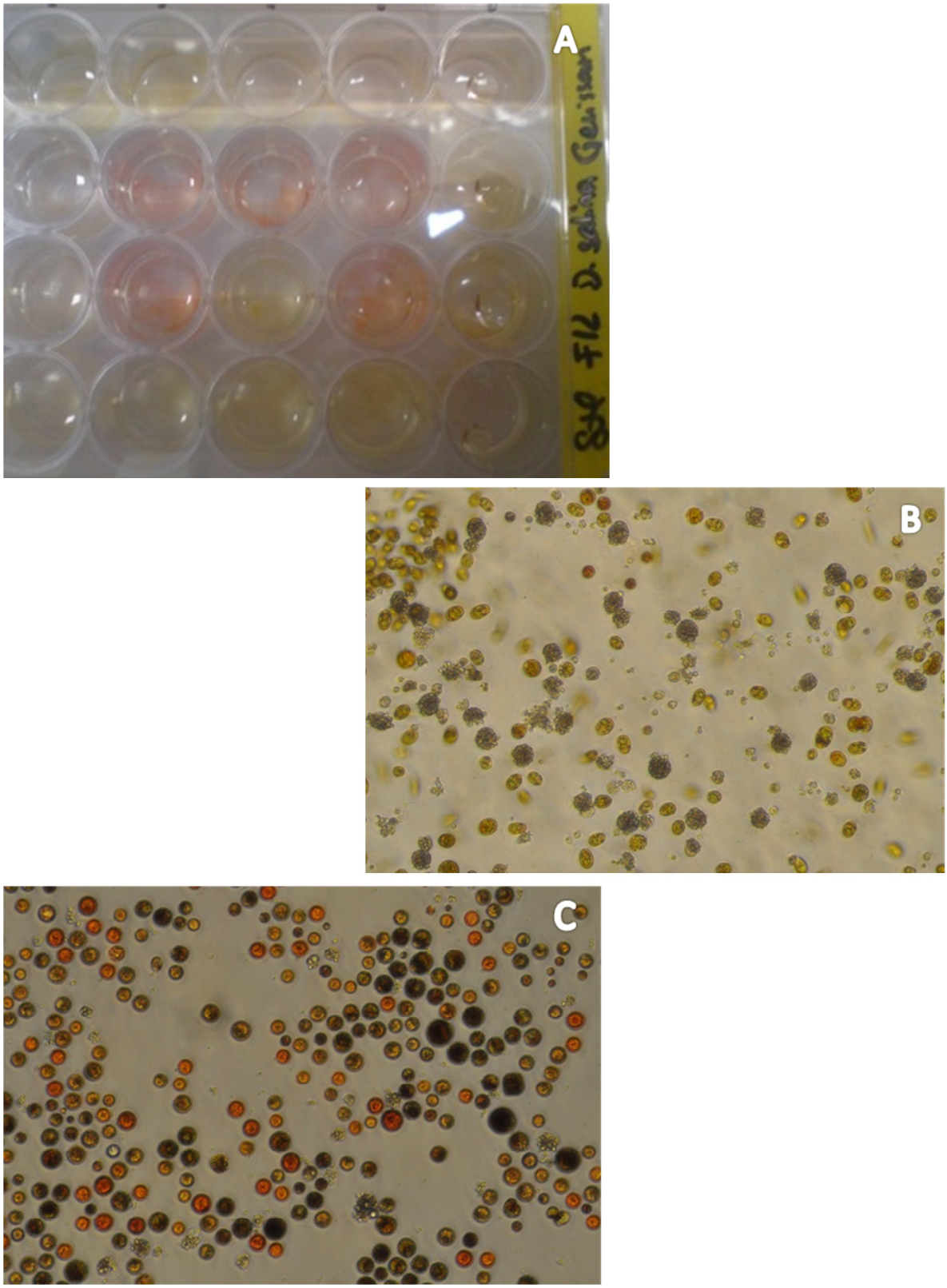


Figure E1 : différences morphologiques entre les souches monoclonales isolées. A) Plaque d'isolement. B) Clone 'vert'. C) Clone 'orange' (même échelle pour les observations microscopiques).

ii. Pré-caractérisation : vert, orange, deux phénotypes très différents.

Observations microscopiques. Les clones 'vert' étaient constitués de cellules vertes, de faibles diamètres et mobiles grâce à deux flagelles bien visibles (Fig. E1, B). Les clones 'orange', par contre, étaient oranges, de diamètres supérieurs et non mobiles (Fig. E1, C). Les clones 'orange' poussaient moins vite mais semblaient contenir une quantité de bêta-carotène bien supérieure, surtout en conditions non carencées. Ces premières conclusions ont motivé la recherche du clone avec la croissance la plus rapide.

Screening du meilleur taux de croissance. Les taux de croissance des 24 clones ont été déterminés pour obtenir les meilleurs individus. Ayant un grand nombre de clones dans de petits volumes (2 mL), les méthodes classiques de comptage particulaire étaient inopérantes. Nous avons donc mis en place un suivi par analyse d'image *via* Image J. Les 10 jours suivants le repiquage de la plaque, chaque puits était photographié quotidiennement, sous éclairement constant et de manière à avoir un champ assez large pour un comptage homogène et une bonne distinction des cellules (microscope inversé, grossissement x10). La netteté des images était ensuite traitée sous Photoshop. Un programme développé sous image J comptait ensuite automatiquement le nombre de cellules visibles, permettant la déduction du taux de croissance de chaque clone.

En conclusion, les souches issues du puits B3 et D2 avait les plus forts taux de croissance pour le clone 'orange' et 'vert' respectivement. Ces souches ont été intégrées à la Mediterranean Culture Collection of Villefranche sur mer (MCCV) en tant que MCCV-021 et MCCV-020 respectivement. Une caractérisation plus poussée (teneur en caroténoïdes, taux de croissance en photobioréacteurs, teneur en lipides, optimum de température, salinité, intensité lumineuse, pH…) a ensuite été réalisée à l'IFREMER de Nantes, confirmant nos hypothèses issues des observations visuelles relative au fort potentiel du morphotype orange.

II. Des méthodes rapides et reproductibles de dosage des lipides : utilisation du Nile red

La course à l'identification de nouvelles souches plus productives en lipides, dépend de façon critique de la capacité à évaluer rapidement le contenu lipidique et plus spécifiquement, à doser les triglycérides. Un panel de techniques séparatives a été développé pour quantifier les différents constituants des lipides totaux (chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide haute pression, chromatographie gazeuse, séparation sur colonne ; Johnson & Davenport, 1971). Ces méthodes classiques, bien que fiables, sont longues, fastidieuses, soumises aux aléas climatiques du laboratoire (hygrométrie en particulier) et ne permettent pas de dosages *in vivo*. Une simple mesure de triglycérides nécessite de nombreuses heures de travail pour un coût de consommables supérieur à 50€. Le besoin de méthodes de dosage de lipides plus simples, reproductibles et rapides est particulièrement critique pour la sélection de nouvelles souches, qui demande une analyse régulière et en temps réel.

Des méthodes alternatives ont été développées. Les méthodes enzymatiques sont nombreuses. Elles sont vendues sous forme de kit, rapides à mettre en œuvre mais présentent de nombreuses limites (Klotzsch & McNamara, 1990). De plus, ayant été développées pour le plasma, elles ne sont pas adaptées au cas des microalgues où les lipides sont concentrés dans des gouttelettes. La spectroscopie infrarouge a l'avantage de permettre des mesures des lipides *in vivo* mais demeure complexe à mettre en œuvre et nécessite un appareillage lourd (Laurens & Wolfrum, 2010). La spectroscopie UV-visible par titrage colorimétrique, bien plus simple d'utilisation, ne permet pas de s'affranchir d'un étape d'extraction et se cantonne principalement aux microdosages des lipides totaux sans permettre d'approche *in vivo* (Barnes & Blackstock, 1973 ; Mayzaud & Martin, 1975). Des méthodes utilisant des marqueurs fluorescents commencent à voir le jour. Bien que nécessitant encore des développements, elles sont simples d'utilisation, peu couteuses, rapides à mettre en œuvre et fournissent des estimations *in vivo*. Ces méthodes représentent donc une très bonne

alternative aux méthodes analytiques classiques. Le Nile Red et le BODIPY 505/515 sont les marqueurs lipidiques les plus communs.

i. L'utilisation du Nile red et du Bodipy pour la mesure des lipides chez les microalgues

Biotechnology for Biofuels
Rumin Judith[1]*, Bonnefond Hubert[2]*, Saint-Jean Bruno[1], Rouxel Catherine[1], Sciandra Antoine[2], Bernard Olivier[3], Cadoret Jean-Paul[1], Bougaran Gaël[1]
[1]IFREMER, PBA, 44311 Nantes, France
[2]CNRS-UMPC, LOV UMR 7093, 06230 Villefranche-sur-mer, France
[3]INRIA BIOCORE, 06902 Sophia Antipolis Cedex, France

Lipid-staining fluorochromes: Nile red and BODIPY 505/515

Among markers that correlate fluorescence with the lipid content in microalgae cells, Nile red (9-diethyllamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) is the most commonly used lipophilic stain for intracellular TAG detection in microalgae prior BODIPY 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) which is a green lipophilic fluorescent dye recently used as an alternative to Nile red staining (Tab. 7).

Name	**BODIPY 505/515**	**Nile red**
Chemical formula	$C_{13}H_{15}BF_2N_2$	$C_{20}H_{18}N_2O_2$
Molecular weight	248.0817	318.37
Target molecule	Lipid droplets	TAG
Usual wavelengts (Ex/Em)	488/510	488-530/575-580

Table 7 : characteristics of fluorescent neutral lipid BODIPY 505/515 and Nile red used in microalgae. Excitation (Ex) and emission (Em) wavelengths are approximate values depending on measuring devices and literature data.

In the early nineties, Nile blue was introduced by Smith (J. L. Smith, 1908) as a histochemical stain for distinguishing between blue-stained neutral lipid and red-stained acid lipid. From then on, it was extensively used in histochemical and physiological studies (Lison, 1935 ; Menschik, 2009 ; Vergara, 1978). Later, Nile red was synthesized from Nile blue oxidation and was mainly used as a vital and fluorescent stain for medical and embryological research purposes (Cleine & Dixon, 1985 ; Dale,

Smith, & Slack, 1985 ; Fowler & Greenspan, 1985). Nile red is a hydrophobic and metachromatic dye with poor solubility and fluorescence in water, with colour emission varying from deep red to strong yellow-gold in hydrophobic environments. Depending on excitation and emission wavelength, the dye has been used to stain different hydrophobic molecules. For instance, using the excitation/emission wavelengths 450-500/>528, Nile red can dye cholesterol in the human plasma through staining of lipid vesicles in smooth muscle cells and in cultured macrophages incubated at low-density (Greenspan & Fowler, 1985 ; Greenspan, Mayer, & Fowler, 1985). It was also used to study membrane heterogeneity (Ira & Krishnamoorthy, 2001) and ligand-hydrophobic protein surface interactions with the alternative wavelengths 570/610 (Sackett & Wolff, 1987) and to study enzyme mechanism by using the wavelengths 550/640-660 (Ruvinov et al., 1995). Nile red has also been successfully used to stain intracellular neutral lipids *i.e.,* TAG and cholesterol esters in yeast, fungi with coupled wavelengths 488/565-585 (Kimura, Yamaoka, & Kamisaka, 2004) and also in microalgae, with wavelengths set to 488-525/570-600 (Cooksey, Guckert, Williams, & Callis, 1987) or to stain total lipids with wavelengths set to 490/585 (Lee, Yoon, & Oh, 1998). Under some conditions, a high correlation between neutral lipid content, as measured by gravimetric method, and Nile red fluorescence was observed for a variety of microalgae, such as *Chlorella* sp. (W. Chen, Zhang, Song, Sommerfeld, & Hu, 2009a ; Guzmán, Valido, Duarte, & Presmanes, 2011 ; Huang, Chen, & Chen, 2009), *Crypthecodiniium cohnii* (de la Jara et al., 2003), *Tetraselmis suecica* (Guzmán, Valido, Duarte, & Presmanes, 2010), *Nannochloropsis gaditana* (Simionato et al., 2011) and *Isochrysis affinis galbana* (Bougaran et al., 2012) but also with polar lipid concerning *Crypthecodiniium cohnii* (de la Jara et al., 2003) and *Tetraselmis suecica* (Guzmán et al., 2010 ; Tab. 8).

Class	Order	Species	NR	BODIPY	Treatment	Correlation	Ref
Cyanophyceae	Synechococcales	*Synechococcus* sp.	-	X	-	-	(Dutta, Kamada, & Ohta, 1996)
Bacillariophyceae	Naviculales	*Phaeodactylum tricornutum*	X	-	-	-	(T. T. Y. Doan, Sivaloganathan, & Obbard, 2011)
			-	X	ethanol	-	(T. T. Y. Doan et al., 2011)
Chlorophyceae	Chlamydomonadales	*Chlamydomonas reinhardtii*	X	X	glycerol/DMSO	-	(Bader, 1980)
		Chlamydomonas sp.	-	X	-	-	(Alonzo & Mayzaud, 1999)
		Dunaliella primolecta	X	-	DMSO	-	(Govender et al., 2012b)
		Dunaliella salina	X	-	-	R^2=0.90 (FL2/FL3)	(Montero, Aristizabal, & Garcia Reina, 2011)
		Dunaliella tertiolecta	-	X	glycerol/DMSO	-	(Guzmán et al., 2011)
	Sphaeropleales	*Scenedesmus dimorphus*	X	-	-	R^2=0.9912	(Wong & Franz, 2013)
		Scenedesmus obliquus	X	-	-	-	(Greenspan, Mayer, & Fowler, 1984)
		Scenedesmus sp.	-	X	-	-	(Ghoneim, 2000)
			X	-	-	R^2=0.99	(Sitepu et al., 2012)
			X	-	ultrasonic processor	-	(R. Gardner et al., 2011)
		Desmodesmus sp.	X	-		R^2=0.972	(Carrier et al., 2014)
Coccolithophyceae	Prymnesiales	*Chrysochromulina* sp.	-	X	-	-	(Mark Scott Cooper, Hardin, Petersen, & Cattolico, 2010)
Coscinodiscophyceae	Chaetocerotales	*Chaetoceros calcitrans*	-	X	-	-	(Govender et al., 2012b)
Eustigmatophyceae	Eustigmatales	*Nannochloropsis oculata*	X	-	glutaraldehyde	R=0.856	(Traller & Hildebrand, 2013)
			-	X	glycerol/DMSO	-	(Guzmán et al., 2011)
		Nannochloris atomus	-	X	glycerol/DMSO	-	(Guzmán et al., 2011)
		Nannochloropsis gaditana	X	-	-	linearly correlated	(Bougaran et al., 2012)
		Nannochloropsis sp.	X	-	-	-	(Elsey, Jameson, Raleigh, & Cooney, 2007)
		Crypthecodinium cohnii	X	-	glycerol/DMSO	-	(Gocze & Freeman, 1994)
			X	-	algal powder	-	(Priscu, Priscu, Palmisano, & Sullivan, 2004)
			X	-	glycerol	-	(Héctor Mendoza et al., 2008)
			X	-	glycerol	-	(Davis et al., 2012)
			X	-	-	R^2=0.9336	(de la Jara et al., 2003)
Peridinea	Peridiniida	*Tetraselmis* sp.	-	X	-	-	(Dutta et al., 1996)
Prasinophyceae	Chlorodendrales	*Tetraselmis suecica*	-	X	glycerol/DMSO	-	(Guzmán et al., 2011)
		Tetraselmis suecica	X	-	-	R^2=0.81	(Vines, McBean, & Blanco-Fernández, 2010)]

		Tetraselmis subcordiformis	X		DMSO	-	(T. T. Y. Doan et al., 2011)
			-	X	ethanol	-	(T. T. Y. Doan et al., 2011
			X	-	-	R^2=0.87	(Simionato et al., 2011)
			-	X	-	R^2=0.93	(Z. Chen, Gong, Fang, & Hu, 2012)
		Isochrysis affinis galbana	X	-	-	R=0.99	(Pereira et al., 2011)
Prymnesiophyceae	Isochrysidales	*Isochrysis galbana*	X	-	glutaraldehyde	R=0.804	(Traller & Hildebrand, 2013)]
		Isochrysis galbana	X	-	-	R=0.83 (FL2/FL3)	(Guzmán et al., 2011)
		Isochrysis sp.	X	-	-	R^2=0.93	(Lakowicz, 2006)
		Mallomonas splendens	-	X	-	-	(Mark Scott Cooper et al., 2010)
Synurophyceae	Synurales	*Auxenochlorella protothecoides*	X	-	ethanol	R^2=0.888	(Lacour, 2011)
Trebouxiophyceae	Chlorellales	*Auxenochlorella protothecoides*	-	X	-	-	(Lacour, 2011)
Xanthophyceae	Trebouxiales	*Chlorella pyrenoidosa*	X	-	-	R=0.83 (FL2/FL3)	(Simionato et al., 2011)
		Chlorella saccharophila	X	-	lyophilization	R^2=0.9706	(Castell & Mann, 1994)
		Chlorella sorokiniana	X	-	-	-	(Greenspan et al., 1984)
		Chlorella sp.	X	-	lyophilization	R^2=0.99	(Huang et al., 2009)]
			X	-	algal powder	-	(Priscu et al., 2004)
		Chlorella vulgaris	-	X	-	R^2=0.95	(Wong & Franz, 2013)
			X	-	electric field	-	(Diaz, Melis, Batetta, Angius, & Falchi, 2008)
			X	-	DMSO	-	(W. Chen, Zhang, Song, Sommerfeld, & Hu, 2009b)
			X	-	DMSO	-	(Govender, Ramanna, Rawat, & Bux, 2012a)]
		Botryococcus braunii	X	-	-	R^2=0.997	(Lee et al., 1998)
	Mischococcales	*Ophiocytium maius Naegeli*	-	X	-	-	(Mark Scott Cooper et al., 2010)

Table 8 : Correlations for lipid measurement obtained with Nile red or BODIPY fluorescence intensity and gravimetrical determination. Determination and correlation coefficients obtained with Nile red or BODIPY 505/515 staining are expressed with the associated microalgae species and treatment. The cross indicates which dye was used.

BODIPY or boron-dipyrromethene is a class of strong Ultra Violet-absorbing molecules demonstrating a relatively sharp emission peak. These dyes are rather insensitive to pH and the polarity of their environment. It is possible to fine tune their fluorescence characteristics by making only small modifications to their structure, resulting in a variety of dyes with different excitation and emission maxima (Cirulis, Strasser, Scott, & Ross, 2012 ; Loudet & Burgess, 2007). As such, these

fluorochromes are widely used to label protein, DNA (Loudet & Burgess, 2007) fatty acids, phospholipids, cholesterol, cholesteryl esters and ceramides (Elle, Olsen, Pultz, Rødkær, & Færgeman, 2010 ; Gocze & Freeman, 1994 ; Listenberger & Brown, 2007). BODIPY 505/515 has been previously used to stain lipid-containing yolk platelets in living zebra-fish embryos (M. S. Cooper, D'Amico, & Henry, 1999) and lipid-containing vesicles in immortalized human hepatocytes (De Gottardi et al., 2007). More recently, BODIPY 505/515 was reported to successfully stain lipid vesicles in microalgae (Mark Scott Cooper et al., 2010 ; Govender et al., 2012a). Moreover, a good correlation was observed for *Tetraselmis subcordiformi*s lipid vesicle measurements between BODIPY 505/515 fluorescence and gravimetric analysis (Xu et al., 2013).

Spectral properties and solvents

Spectral properties. Nile red used as an *in situ* marker provides high fluorescence in hydrophobic environments (Fowler & Greenspan, 1985 ; Greenspan & Fowler, 1985 ; Greenspan et al., 1984, 1985). However, the spectral properties of Nile red are highly sensitive to the polarity of the immediate environment (Ghoneim, 2000). The peak emission is blue-shifted as the surrounding polarity decreases (Alonzo & Mayzaud, 1999 ; Cooksey et al., 1987 ; Dutta et al., 1996 ; Elsey et al., 2007). The polarity dependence of Nile red may be attributed to large changes in the excited state dipole moment of the molecule. Indeed, twisted intramolecular charge transfer (TICT) processes are induced by the flexible diethylamino end group attached to the rigid structure of these molecules (Dutta et al., 1996). Emission fluorescence shifts can also result from binding of Nile red with certain proteins containing an hydrophobic domain (Very Low Density Proteins) and other non-lipid cellular compartments containing a hydrophobic domain (W. J. Brown, Sullivan, & Greenspan, 1992 ; Cirulis et al., 2012 ; Greenspan & Fowler, 1985 ; O'Rourke, Soukas, Carr, & Ruvkun, 2009). Therefore, Nile red does not specifically bind to lipid droplets and these properties may bias the lipid determination with this dye. Additionally, high pigment concentration may also interfere with lipid-induced Nile red fluorescence. Indeed, quantification of the carotenoid content of cells is possible using Nile red,

thereby demonstrating the existence of a link between these two compounds (Héctor Mendoza et al., 2008). Moreover, the high content of chlorophyll (1–4% of dry weight) found in some classes of microalgae such as *Chlorophyceae*, is another source of interference and increase in the background fluorescence. Together with the use of particular wavelengths, a high pigment content could therefore prevent reliable lipid quantification with Nile red (W. Chen et al., 2009a ; Wolfrum & Laurens, 2012). Nevertheless, the metachromatic properties of Nile red induced by microenvironment polarity have been exploited by some authors (de la Jara et al., 2003 ; Diaz et al., 2008; Guzmán et al., 2010, 2011 ; Guzmán, Valido, Presmanes, & Duarte, 2012) to estimate the polar lipid/neutral lipid ratio (Table 3). Indeed, short excitation wavelengths (450–500 nm) and yellow/gold emission (≤580 nm) wavelengths favour the detection of highly hydrophobic environments like neutral lipids (TAG) whereas longer excitation wavelengths (515–560 nm) and red emission (≥590 nm) wavelengths favour a general fluorescence for polar lipids resulting from interactions with intracellular membrane phospholipids (Greenspan & Fowler, 1985).

Unlike Nile red, BODIPY 505/515 is insensitive to the environment polarity (Cirulis et al., 2012) and numerous studies have established its specificity for lipid droplets. When excited with a blue laser (450–490 nm) BODIPY 505/515 gives a green peak emission ranging from 515 to 530 nm (Brennan, Blanco Fernández, Mostaert, & Owende, 2012 ; Cirulis et al., 2012 ; Govender et al., 2012a). According to Cooper et al., (2010), BODIPY 505/515 can be used to visualise lipid droplets within microalgae cells and the fluorochrome permeates all structures within a cell. The characteristic green fluorescence occurs when the dye reaches the lipid droplets (De la Hoz Siegler, Ayidzoe, Ben-Zvi, Burrell, & McCaffrey, 2012 ; Govender et al., 2012a ; Xu et al., 2013). Indeed, BODIPY 505/515 has the advantage of not binding to cytoplasmic compartments other than lipid bodies and chloroplasts (Mutanda et al., 2011), and the red autofluorescence from algal chloroplasts under the same blue excitation wavelength is spectrally distinct from the green fluorescence of the lipid droplets (Brennan et al., 2012 ; Mark Scott Cooper et al., 2010).

Solvents. To improve staining by Nile red and BODIPY 505/515 dyes, a variety of solvents such as acetone, dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, dimethylformamide (DMF), isopropanol, ethylene glycol, hexane or chloroform have been used as stain carriers (Alonzo & Mayzaud, 1999 ; Castell & Mann, 1994 ; Cooksey et al., 1987 ; Dutta et al., 1996; Greenspan & Fowler, 1985; Greenspan et al., 1984, 1985).

Fluorescent compounds such as Nile red, which contain polar substituants like polar carboxyl function (-COOH) on the aromatic rings, demonstrate emission spectrum sensitivity to the chemical and physical properties of solvents (Lakowicz, 2006), including: (i) variations in maximum fluorescence; (ii) alterations in the shape of the spectral curves, because of specific solvent effects such as hydrogen bonding or some other interactions (Greenspan & Fowler, 1985); and (iii) quenched fluorescence in aqueous media, resulting in a blue shift of the fluorescence maximum with decreasing solvent polarity, being 632 nm for ethanol, 600 nm for chloroform and 576 nm for hexane (Elsey et al., 2007 ; Greenspan & Fowler, 1985 ; Mutanda et al., 2011). Nile red is more commonly diluted in acetone than in DMSO or isopropanol (Tab. 9). Apart from its polarity sensitivity, volatility of the solvent may also alter the fluorescence measurements. Although not mentioned in the literature, preservation of Nile Red solution may cause problems. Indeed, when acetone was used as the solvent, the repeated use of a given Nile red solution over a long period resulted in changes in the solution concentration (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012).

Class	Order	Species	Solvent				
			Acetone	**DMSO**	**Iso-propanol**	**Ethanol**	**DMF**
Bacillariophyceae	Naviculales	*Phaeodactylum tricornutum*	(Sitepu et al., 2012)				
	Bacillariales	*Cylindrotheca* sp.	(Castro, Kamdar, Panilaitis, & Kaplan, 2005)				
		Nitzschia sp.	(Benbouzid, Le Floch, Stephan, Olier, & Privat, 2012)				
	Naviculales	*Amphiprora* sp.	(Benbouzid et al., 2012)				
Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	*Tetraselmis* sp.	(Elsey et al., 2007)				
Chlorophyceae	Chlamydomonadales	*Dunaliella primolecta*	(Govender et al., 2012a)				
		Dunaliella salina	(Simionato et al., 2011)				(Su, Hsu, & Wang, 2012)
		Dunaliella tertiolecta		(Ghoneim, 2000)			
	Sphaeropleales	*Scenedesmus dimorphus*	(Loudet & Burgess, 2007)			De la Hoz Siegler et al., 2012)	
		Scenedesmus sp.	(Sitepu et al., 2012) (R. Gardner et al., 2011)				
		Neochloris oleoabundans	(Pick, 2004)				
		Scenedesmus obliquus	(Alonzo & Mayzaud, 1999)			(De la Hoz Siegler et al., 2012)	
		Ankistrodesmus pseudobraunii		(W. Chen et al., 2009b)			
Coscinodiscophycea	Thalassiosirales	*Skeletonema marinoi*	(Pick & Rachutin-Zalogin, 2012)				
	Chaetocerotales	*Chaetoceros calcitrans*	(Govender et al., 2012a)				
		Chaetoceros socialis	(Pick & Rachutin-Zalogin, 2012)				
Dinophyceae	Dinotrichales	*Crypthecodinium cohnii*	(de la Jara et al., 2003)				
		Gymnodinium sp.	(Benbouzid et al., 2012)				

	Gonyaulacales	*Alexandrium minutum*	(Pick & Rachutin-Zalogin, 2012)				
Eustigmatophyceae	Eustigmatales	*Nannochloropsis* sp.	(Elle et al., 2010)(Elsey et al., 2007) (Priscu et al., 2004)				
		Nannochloropsis gaditana	(Pereira et al., 2011)	(Pereira et al., 2011)			
Prymnesiophyceae	Isochrysidales	*Tisochrysis lutea*	(Wong & Franz, 2013)				
Trebouxiophyceae	Chlorellales	*Auxenochlorella protothecoides*				De la Hoz Siegler et al., 2012)	
		Chlorella pyrenoidosa	(Priscu et al., 2004)				
		Chlorella saccharophila			(Castell & Mann, 1994)		
		Chlorella sorokiniana	(Alonzo & Mayzaud, 1999)				
		Chlorella sp.		(Huang et al., 2009)			
		Chlorella vulgaris	(Govender et al., 2012a) (Priscu et al., 2004)	(W. Chen et al., 2009b)		De la Hoz Siegler et al., 2012)	
		Chlorella zofingiensis	(Loudet & Burgess, 2007)	(W. Chen et al., 2009b)			
		Parachlorella kessleri			(Greenspan et al., 1984)		
		Pseudochlorococcum sp.	(Loudet & Burgess, 2007)				
	Trebouxiales	*Botryococcus braunii*	(Lee et al., 1998)				

Table 9 : Solvents used for Nile red solutions and the microalgae species on which they were applied. DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide.

BODIPY 505/515 solution is most often prepared in DMSO, as this is thought to be more efficient for diffusion through cell membranes (Mark Scott Cooper et al., 2010 ; Table 5). Few studies have assessed the effect of solvents on BODIPY 505/515 fluorescence in microalgae. A decrease in fluorescence and a higher amount of cellular debris were reported when using high acetone and DMSO concentrations (Cirulis et al., 2012). This study highlighted that the use of 1–2 % acetone ensured cell integrity and a high fluorescence signal. Conversely, even low DMSO concentrations reduced BODIPY 505/515

fluorescence and dramatically increased the cell debris. These observations led (Cirulis et al., 2012) to the conclusion that organic solvents should be kept to a minimum.

Class	Order	Species	Solvent			
			Acetone	DMF	DMSO	Ethanol
Bacillariophyceae	Naviculales	*Phaeodactylum tricornutum*				(T. T. Y. Doan et al., 2011)
Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	*Tetraselmis suecica*			(Lacour, 2011)	
		Tetraselmis subcordiformis			(R. D. Gardner et al., 2012)	
		Tetraselmis sp.			(O'Rourke et al., 2009)	
Chlorophyceae	Chlamydomonadales	*Chlamydomonas* sp.			(W. J. Brown et al., 1992)	
		Dunaliella primolecta	(Govender et al., 2012a		(Govender et al., 2012a	
		Dunaliella teteriolecta			(Lacour, 2011)	
	Sphaeropleales	*Scenedesmus dimorphus*	(Velmurugan et al., 2013)		(Velmurugan et al., 2013)	
		Scenedesmus sp.			(Dutta et al., 1996)	
Coccolithophyceae	Prymnesiales	*Chrysochromulina* sp.			(Mark Scott Cooper et al., 2010)	
Coscinodiscophycea	Chaetocerotales	*Chaetoceros calcitrans*	(Govender et al., 2012a		(Govender et al., 2012a	
Eustigmatophyceae	Eustigmatales	*Nannochloropsis oculata*			(Lacour, 2011)	
		Nannochloropsis sp.			(O'Rourke et al., 2009)	
Synurophyceae	Synurales	*Mallomonas splendens*			(Mark Scott Cooper et al., 2010)	
Trebouxiophyceae	Chlorellales	*Auxenochlorella protothecoides*		(De la Hoz Siegler et al., 2012)		
		Chlorella vulgaris	(Velmurugan et al., 2013)(Govender et al., 2012a)		(Velmurugan et al., 2013) (Govender et al., 2012a	
		Nannochloris atomus			(Lacour, 2011)	
Xanthophyceae	Mischococcales	*Ophiocytium maius*			(Mark Scott Cooper et al., 2010)	

Table 10 : Solvents used for BODIPY 505/515 solutions and the microalgae species on which they were applied. DMF: dimethylformamide; DMSO: dimethylsulfoxide.

As for Nile red, the preservation of BODIPY 505/515 solutions is little documented, but it is recommended that it should be stored in a dark bottle protected from light (Govender et al., 2012a).

Permeation issues and improvements

Dye permeation into microalgae. Nile red incorporation into microalgae is a sequential transfer of the dye from the plasma membrane to the lipid droplets. *In vitro* studies on isolated plasma membranes and isolated lipid droplets from *Dunaliella salina* compared to *in vivo* studies highlighted a clear biphasic fluorescence rise (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). A first step of fast insertion/dissociation of the dye into and from the plasma membrane (half time of 1-2 s) was followed by a slower step where transfer from the plasma membrane to the lipid droplets occurred (half time of 30 sec to 2 min). Indeed, interactions of the dye with proteins and/or other cellular components in cytosolic cells are major delaying factors. Fluorescence and staining kinetics depend on the microalgae species and the size of lipid droplets as well as on the amount of the latter. The localization of Nile red in lipid droplets is not clearly defined, but it is hypothesized that Nile red molecules could be embedded deep in the lipid core of the droplets (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012).

Conversely, BODIPY 505/515 incorporation is very fast due to its high oil/water partition coefficient that allows the dye to cross cell and organelle membranes easily (Mark Scott Cooper et al., 2010). Using the “non-stop flow” method (Vines et al., 2010), which allows continuous data gathering before and after dye addition, fast permeation into different algal cells (*Nannochloropis oculata, Nannochloropsis atomus, Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica*) was observed, resulting in the attainment of a fluorescence maximum within 1 min (Brennan et al., 2012).

Permeation issues. The first limitation to staining with lipophilic dyes is related to the composition and structure of the algal cell wall. The robust and thick wall particularly widespread among green algae is thought to act as a barrier preventing Nile red dye from efficiently penetrating cells and staining lipids (W. Chen, Sommerfeld, & Hu, 2011 ; W. Chen et al., 2009a; T.-T. Y. Doan & Obbard, 2010 ; Guzmán et al., 2011; Mutanda et al., 2011 ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012 ; Sitepu et al., 2012).

A poor correlation between Nile red staining and gravimetric methods was reported (W. Chen et al., 2009a) in *Chlorella vulgaris* and *Pseudochlorococcum* sp.. No difference for Nile red fluorescence was reported between the late stationary and the exponential phase in *Nannochloropsis,* whereas the gravimetric method revealed that the content doubled between these phases (T.-T. Y. Doan & Obbard, 2010). This study showed that only 25% of the cell population was successfully stained when using the conventional Nile red staining method.

In parallel, BODIPY 505/515 seems to be more efficient for permeation. Recent studies showed that it penetrates all microalgae cells, even those with thick cell wall. Among a variety of algal taxa that store oil, *Ophiocytiummaius Naegeli* (Xanthophyceae), an elongated cell, *Chrysochromulina* sp. (Haptophyceae), a naked microalga, and *Mallomonas splendens* (Synurophyceae), an alga covered with elaborated silica scales, all allow the dye to penetrate (Mark Scott Cooper et al., 2010). Working with *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella primolecta* and *Chaetoceros calcitrans*, Govender *et al.*, (2012) reported, in agreement with Cooper *et al.* (2010), that BODIPY 505/515 was able to label lipid vesicles of these algal cells, which are known to have a thick, robust wall (Mark Scott Cooper et al., 2010 ; Govender et al., 2012a). However, a recent study reported a low stain permeation rate across the thick and rigid cell wall of *Nannochloropsis oculata* cells (Brennan et al., 2012), demonstrating low fluorescence in this species and a differentiation between fully and partially labelled cells.

Improved permeation protocols for staining recalcitrant microalgae. Several authors report failure of efficient cell staining with Nile red, caused by the difficulty of penetrating the cell wall, resulting in a poor fluorescence signal (W. Chen et al., 2011, 2009a ; T. T. Y. Doan et al., 2011 ; Mutanda et al., 2011 ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012 ; Sitepu et al., 2012). Some studies aimed to develop new protocols that improve dye penetration and ultimate staining of lipid droplets. Several chemical treatments have been proposed, such as DMSO, ethanol, acetone, ethylene glycol, isopropanol and glutaraldehyde, at various concentrations (W. Chen et al., 2009a). Other physical treatments, such as grinding of algal cells in liquid nitrogen, were also tested; these avoid the use of a solvent or

detergent that could lead to cell damage, destruction of lipid globules or high background fluorescence (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012).

Chemical treatments. *DMSO*. The polar organic solvent DMSO (dimethysulfoxide) is well known for its interaction capabilities with the cellular membrane and its cryoprotectant properties. DMSO facilitates permeation of macromolecules, fluorescent lipids, and conjugated fluorescent dyes into live cells and tissues. Use of DMSO as a solvent for Nile red (W. Chen et al., 2009a ; Huang et al., 2009 ; Massart, Aubry, & Hantson, 2010 ; Simionato et al., 2011 ; Vigeolas et al., 2012) and BODIPY 505/515 (Brennan et al., 2012 ; Z. Chen et al., 2012 ; Cirulis et al., 2012 ; Mark Scott Cooper et al., 2010 ; De la Hoz Siegler et al., 2012 ; Govender et al., 2012a; Mou et al., 2012 ; Mutanda et al., 2011 ; Pereira et al., 2011 ; Xu et al., 2013) makes it possible to exploit this permeation property. Its mechanism could be the induction of water pores across the lipid bilayer, together with modification of the membrane fluidity (Notman, Noro, O'Malley, & Anwar, 2006). DMSO was proposed as a means to improve Nile red staining permeability in organisms like yeast (Sitepu et al., 2012) and microalgae mixtures (Ahmad, Fatma, Yazdani, & Kumar, 2012 ; W. Chen et al., 2011, 2009a ; T.-T. Y. Doan & Obbard, 2010 ; Govender et al., 2012a) where it was added in the range from 5% to 20% depending on studies. A final DMSO concentration of 5% was used with *Pseudochlorococcum* sp. and *Scenedesmus dimorphus* (W. Chen et al., 2011), 15% was used with *Nannochloropsis* sp. (T.-T. Y. Doan & Obbard, 2010) and 20% with mixed green algal cells (Ahmad et al., 2012). Some studies show a maximum fluorescence efficiency at a DMSO concentration of 25% (v/v) in *Chlorella vulgaris* (W. Chen et al., 2009a). Below and above this concentration, fluorescence efficiency decreased (W. Chen et al., 2009a).

The disadvantage of the 20% DMSO method is that high DMSO concentrations affect cell survival and cannot be applied *in vivo* (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). Indeed, growth inhibition of *Nannochloropsis* sp. exposed to DMSO concentration varying from 0.077 to 0.11 g mL^{-1} (7 to 10%, respectively) was reported and culture exposed to 0.165 g mL^{-1} (15%) even collapsed after re-

inoculation into fresh f/2 medium, thus demonstrating a toxic effect of DMSO (T.-T. Y. Doan & Obbard, 2010).

Glycerol. The microalgae plasma membrane is permeable to small uncharged polar molecules like glycerol. Diffusion of certain molecules can be facilitated by adding glycerol to the extracellular medium. Indeed, the transport of Nile red across cell membranes of *Nannochloropsis* sp. was facilitated by glycerol at 0.05 g mL^{-1} (T.-T. Y. Doan & Obbard, n.d., 2010). The maximized efficiency of intracellular lipid staining was achieved by adding glycerol to the *Nannochloropsis* sp. suspension to a final concentration of 0.1 g mL^{-1} (with a Nile red incubation of 5 min at room temperature in darkness and a Nile red concentration of 0.3 µg mL^{-1}): fluorescence intensity with glycerol treatment was six-fold higher than without glycerol. However, Pick & Rachutin-Zalogin, (2012) reported that glycerol quenched Nile red fluorescence when the dye was in excess (high Nile red/TO ratio).

Glycerol was also used together with BODIPY 505/515 at a similar concentration to Nile red. In this case, maximum fluorescence intensity was reached for a glycerol concentration of 0.1 g mL^{-1} (Brennan et al., 2012) with *Nannochlopsis oculata*.

Interestingly, glycerol has no known cell growth inhibition effects, even when cells experience a high concentration of 0.125 g mL^{-1} for 1 h (T.-T. Y. Doan & Obbard, 2010). This property is an advantage for a staining procedure with flow cytometry cell sorting.

Physical treatments. The use of chemical treatment does not successfully allow the determination of TAG content in all green microalgae strains. Therefore, physical treatments were tested on recalcitrant microalgae species impermeable to lipid dyes.

Microwave-assisted staining. W. Chen et al., (2011) suggested the use of additional treatments, such as the combination of DMSO treatment with microwave irradiation (e.g., on *Pseudochlorococcum* sp. ASU strain 1, *Scenedesmus dimorphus* ASU strain 1). Microwave irradiation increases molecular collision and movement speeds between algal cells and dye molecules and facilitates the penetration

of the dye into cells (W. Chen et al., 2011). Testing several microwave durations (W. Chen et al., 2011), the microwave-assisted staining resulted in determination of a lipid content comparable to that obtained with the conventional gravimetric method for the screening of oleaginous algae (*Pseudochlorococcum* sp. *Scenedesmus dimorphus* and *Chlorella zofingiensis*). This demonstrates the reliability of this protocol *in vivo*. However, reliability and reproducibility issues were reported due to the uneven distribution of radiation within microwave ovens (particularly household microwave ovens) and the use of replicates was thus recommended (W. Chen et al., 2011).

Electric field. Molecule transport into microalgae intracellular compartments could be enhanced and accelerated by establishment of an electric field (Azencott, Peter, & Prausnitz, 2007). Su et al., (2012) tested three electric field intensities (0, 500, 1000 and 2000 $V.cm^{-1}$) on Nile red staining with *Chlorella vulgaris* and *Spirulina* sp. Applying the electric field for 10 sec after Nile red addition to the electroporation chamber resulted in higher fluorescence intensity and lower variability.

Microalgae lyophilization. An improvement of Nile red staining was obtained for seven *Chlorella* strains using lyophilized algae as the raw material (Huang et al., 2009). This technique eliminates the negative effect of the environment on fluorescence staining. A high correlation coefficient was found between spectrofluorometry quantification and the conventional gravimetric method (Huang et al., 2009).

Staining parameters. A reliable estimate of the neutral lipid content in microalgae with dye fluorescence depends upon a variety of staining and measuring conditions. The use of non-optimal or inconstant conditions often results in poor lipid content assessment. Additionally, in most cases, the staining and measuring procedure is highly species specific.

Algae and dye concentrations. Since fluorescence alterations can arise from the cell and dye concentration: the quenching issue (i.e., a non-radiative relaxation of excited electrons to the basic state) is well documented and can result in a dramatic fluorescence loss that prevents reliable estimation of the lipid content. Quenching is related to a variety of processes including excited-state

reactions, energy transfer, dimerization between aromatic cycles of molecules and collisional quenching (Greenspan & Fowler, 1985 ; Lakowicz, 2006 ; Sackett & Wolff, 1987).

Algal concentration. A fluorescence decrease related to microalgae cell concentration was shown below a minimum threshold and above a maximum threshold of cell concentration for lipid staining, where saturation occurs. A linear correlation was established between microalgae concentration and fluorescence intensity between these thresholds. However, the optimum range of cell concentration is species specific and varies between 5.10^4 and 1.10^6 cell mL^{-1}, as demonstrated by results with *Chlorella vulgaris* (W. Chen et al., 2009a ; Isleten-Hosoglu, Gultepe, & Elibol, 2012), *Dunaliella salina* (personal communications), *Scenedesmus dimorphus* (Cirulis et al., 2012) and *Isochrysis* sp. (Lacour, 2010).

Dye concentration. Studies carried out with Nile red and BODIPY 505/515 showed that fluorescence intensity depended on concentrations of the dyes (W. Chen et al., 2009a ; Huang et al., 2009 ; Xu et al., 2013). Fluorescence intensity increased and then decreased with rising dye concentration. Existence of an optimal concentration resulting in a maximum fluorescence was established to obtain optimal lipid staining for both dyes.

At low concentration of Nile red, the hydrophobic core could interact with the dye, leading to an emission peak at 570 nm (Greenspan & Fowler, 1985). Moreover, again at low Nile red concentration (0.5 µM), quenching was found to be quite minor compared with observations at high concentration (4 µM) (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). Using an *in vitro* test with triolein (TO) as a standard of triacylglycerol, the authors indicated that, when Nile red concentration is low relative to lipid droplets (Nile red/TO), the dye was less accessible to hydrophilic quenchers than at an excess Nile red concentration (Nile red/TO) (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). Nevertheless, with increasing concentrations, the excess Nile red could not react with only neutral lipids or could interact with the phospholipidic coat and hydrophobic protein surfaces (Sackett & Wolff, 1987). It resulted an emission peak at λ=650 nm (Bertozzini, Galluzzi, Penna, & Magnani, 2011) induced by a red-shift of

the emission peak, which interferes with the peak related to the dye bound to neutral lipids (580 nm). A concentration-dependent self-association of Nile red was also reported when the dye was added in excess (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012) and aggregated dye precipitate were difficult to gate based on red channels fluorescence as the chlorophyll of microalgae using flow cytometry (Cirulis et al., 2012). Nile red dimers and aggregates interfere with fluorescence intensity of neutral lipids because of radiative or non-radiative energy transfer (Guilbault, 1973). Special attention must, therefore, be paid to the use of excess Nile red concentrations for staining neutral lipids.

The concentration of Nile red required for staining microalgae varies considerably (0.01-100 µg mL^{-1}) between the different species (W. Chen et al., 2009a ; Govender et al., 2012a ; Huang et al., 2009).

According to Govender et al., (2012a) and Xu et al., (2013), all the studied microalgae displayed a significant optimal value in fluorescence intensities related to the BODIPY 505/515 concentration used.

Below optimal BODIPY 505/515 concentration, the dye did not adequately stain all cells. Above the optimal concentration, over-staining and bright green background fluorescence were visible, making quantification difficult and inaccurate for some species (Govender et al., 2012a). Furthermore, like Nile red stain, aggregated dye precipitate were also observed using flow cytometry and interfering with red channels fluorescence of chlorophyll (Cirulis et al., 2012).

The optimal concentration for BODIPY was around 0.067 µg mL^{-1} for three species of microalgae belonging to the Trebouxiophyceae, Bacillariophyceae and Chlorophyceae classes (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella primolecta and Chaetoceros calcitrans*) at 1.10^6 cell mL-1 (Govender et al., 2012a), whereas it was higher, 0.28 µg mL^{-1} for *Tetraselmis subcordiformis* (Chlorodendrophyceae) at 1.10^6 cell mL^{-1} (Xu et al., 2013).

Temperature. Very few studies have investigated the effects of staining temperature at the time of labelling, although this is a factor that influences fluorescence: fluorescence responses subsequent to

Nile red staining was studied between 20 and 80°C for *Chlorella vulgaris* and the most appropriate staining temperature range was found to be 37–40°C (W. Chen et al., 2009a). The authors hypothesized that high temperature facilitated permeation of Nile red into cells. Most Nile red analyses are based on these staining temperatures for several microalgae classes: Eustigmatophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae and Peridinea (Ahmad et al., 2012 ; De la Hoz Siegler et al., 2012 ; de la Jara et al., 2003 ; Feng et al., 2013; Guzmán et al., 2012 ; Montero et al., 2011 ; Simionato et al., 2011 ; Vigeolas et al., 2012) whereas room temperature was used for other analyses with Eustigmatophyceae and Prymnesiophyceae classes (Bougaran et al., 2012 ; T. T. Y. Doan & Obbard, 2012 ; T.-T. Y. Doan & Obbard, n.d., 2010). These studies support the idea that staining temperature is not species dependant for Nile red.

Testing the effect of temperature in the range 20–45 °C, optimal incubation temperature for BODIPY 505/515 was found to be 25°C when staining *Nannochloropsis oculata* cells (Brennan et al., 2012). Most other studies with BODIPY 505/515 also used the same temperature for a variety of microalgae classes: Eustigmatophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae and Coscinodiscophyceae (Z. Chen et al., 2012 ; Cirulis et al., 2012 ; Mark Scott Cooper et al., 2010; Govender et al., 2012a ; De la Hoz Siegler et al., 2012 ; Mou et al., 2012 ; Xu et al., 2013 ; Pereira et al., 2011).

Salinity. Limitation of Nile red fluorescence was reported (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012) under hypersaline condition for *Dunaliella salina*. A lower Nile red fluorescence, a shift of the peak emission and a retardation of the dye transfer into lipid droplets were observed with high salinity (0.5 M to 3 M NaCl) (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). Indeed, some species, such as *Dunaliella* sp., adapt to high salt concentration and counterbalance the external high osmolarity by massive accumulation of internal glycerol (Pick, 2004). This reaction induces a fluorescence quenching of Nile red as demonstrated on artificial model systems, phospholipid vesicles and triolein vesicles (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). It appears that salinity affects Nile Red through another distinct process by

strongly affecting the solubility of the solvent (Benbouzid et al., 2012). Therefore, Nile red miscibility in salted water changes with a change of salinity.

Incubation duration. Intensity of Nile red fluorescence is not constant over time in microalgae (Cooksey et al., 1987 ; Elsey et al., 2007 ; Ira & Krishnamoorthy, 2001 ; Kimura et al., 2004 ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). Shape of the fluorescence curve is species specific (Cooksey et al., 1987; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). After Nile red addition, fluorescence increases to reach a peak and then decreases, according to different slopes for *Dunaliella salina*, *Dunaliella parva*, *Dunaliella bardawil* and *Nanochloris atomus* (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012), or reaches a plateau, for *Chlorella vulgaris* (W. Chen et al., 2009a). The fluorescence maximum is not reached at the same time for different species (Elsey et al., 2007 ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012).

Several Nile red incubation times are proposed in the literature. A 5 min incubation time is used for *Nannochloropsis* sp. (T. T. Y. Doan & Obbard, 2012 ; T.-T. Y. Doan & Obbard, n.d., 2010), whereas a 15 min incubation time is used with *Tetraselmis suecica* (Montero et al., 2011). Nile red fluorescence was measured for incubation periods of between 30 sec and 14 min with the diatom *Amphora coffeaeformis*, revealing that a maximum and stable fluorescence could be obtained with a treatment between 2 and 7 min (Cooksey et al., 1987). Beyond this duration, fading (reduction of fluorescence intensity) took place in the samples. Similarly, variation in the maximum emission intensity was found with time and algal strain (*Nannochloropsis* sp. or *Tetraselmis* sp.), leading to the recommendation to use the largest fluorescence intensity signal following Nile red incubation lasting from 30 to 40 min (Elsey et al., 2007). A 10 min incubation period is largely used with Nile red in the literature (W. Chen et al., 2009a ; T. T. Y. Doan et al., 2011 ; Govender et al., 2012a ; Guzmán et al., 2012 ; Vigeolas et al., 2012); some authors established that this Nile red incubation time is optimal to avoid fluorescence fading in *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* (W. Chen et al., 2009a ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012).

More precisely, it was established that photobleaching occurs with Nile red analyses as the fluorescence lifetime progressively decreases over time for *Dunaliella primolecta*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorella calcitrans* (Govender et al., 2012a).

Moreover, Nile red fluorescence quenching is species specific (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012). Pick and Rachutin-Zalogin (2012) pointed out that, after long incubation, Nile red fluorescence quenching occurred, resulting from interactions with cell compounds rather than destruction of the dye from enzymatic degradation. In their study, fluorescence level decreased by only 4–6% in cell extracts after 15 h of incubation, whereas it decreased by 84–93% in intact cells.

BODIPY 505/515, in contrast, is insensitive to light and oxidation (Govender et al., 2012a). Maximum fluorescence value is reached within a minute after the incorporation of BODIPY 505/515 in the microalgae cultures of *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloris atomus*, *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* (Brennan et al., 2012). Fluorescence intensity is maintained for a period as long as 11 days with *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloris atomus*, *Tetraselmis suecica*, and *Dunaliella tertiolecta*, suggesting that BODIPY 505/515 is also insensitive to photobleaching (Brennan et al., 2012).

It is perhaps for this reason that some studies do not indicate the incubation period used. However, an optimal incubation period of 10 min was established for BODIPY 505/515 staining after testing durations from 2 to 25 min with *Tetraselmis subcordiformis* (Xu et al., 2013); this timing has also been used for *Chlorella vulgaris, Dunaliella primolecta* and *Chaetoceros calcitrans* (Govender et al., 2012a) and microalgae species of several other phyla (Pereira et al., 2011).

According to Cooper *et al.* (2010) and Brennan *et al.* (2012) (Brennan et al., 2012 ; Mark Scott Cooper et al., 2010), the BODIPY 505/515 stained the intracellular oil-containing organelles within minutes and the subsequent photostability permitted confocal time-lapse measurements of the lipid bodies over a 20-minute period. In these studies, Nile red and BODIPY 505/515 were used in darkness and protected from the light (Govender et al., 2012a).

Blank measurements

Relative fluorescence, obtained after subtraction of a control measurement is sensitive and requires an accurate blank measurement. When using Nile red staining, fluorescence related to medium impurities should be taken into account either with a washing step or the use of a blank. Bertozzini *et al.* (2011) performed cell centrifugation and resuspension in a freshly-prepared medium in order to eliminate impurities (Bertozzini et al., 2011). The use of a blank with Nile red is complex. First, red autofluorescence from algal chloroplasts may interfere with Nile red fluorescence of lipid droplets and thus increase fluorescence background (W. Chen et al., 2009a ; Wolfrum & Laurens, 2012). The dye fluorescence in the medium can also be significant, especially for old cultures, which may have excreted various molecules. When cultures have been stressed, they produce more Extracellular Polymeric Substances and/or Transparent Exopolymeric Particles (TEP). These molecules, mainly constituted of carbohydrates, proteins and some lipids, may react with Nile Red. Indeed, macromolecules containing sugars (the major constituent of TEP) have a native fluorescence that can be measured with Nile Red (Castro et al., 2005 ; Murphy, Furusho, Paton, & Nomura, 2007). Thus, both intra- and extra-cellular compartments are concerned for blanks. In contrast to analysis with a fluorimeter, lipid droplet analysis with a flow cytometer makes it possible to eliminate the signal due to the extracellular compartment. In the literature, blanks are computed on the basis of i) non-stained samples in order to estimate the autofluorescence background of the medium and correct for cellular autofluorescence (Cirulis et al., 2012 ; de la Jara et al., 2003 ; R. D. Gardner et al., 2012 ; Guzmán et al., 2011) or ii) the sum of the cell autofluorescence and the dye fluorescence in the medium (Bertozzini et al., 2011 ; Huang et al., 2009 ; Lee et al., 1998).

Blanks are simpler with BODIPY 505/515. First, autofluorescence from chlorophyll *a* does not interfere with BODIPY 505/515 fluorescence. However, this dye produces a high fluorescence background even without cells. Over-staining and bright green background fluorescence can be visible and sometimes be too high to allow quantification (Mark Scott Cooper et al., 2010 ; De la Hoz Siegler et al., 2012 ; Govender et al., 2012a). Quantification of lipid droplet fluorescence with BODIPY

505/515 using a microplate-based fluorometric method has not been documented (De la Hoz Siegler et al., 2012). Staining lipid droplets with BODIPY 505/515 is mainly performed by flow cytometer, which avoids the fluorescence background of the medium and explains the limited information given about blanks in the literature. However, non-stained samples can be used as a control (Brennan et al., 2012) with cytometric analysis.

Discussion

The present review summarizes the available knowledge for the two main fluorochromes commonly used for TAG measurement in microalgae: Nile Red and BODIPY 505/515. We showed how preliminary studies on staining procedure are important and clearly depend on the scientific question being examined, in relation to the microalgae species concerned.

Choosing between Nile red and BODIPY 505/515. For decades, Nile red has been extensively used to label lipid droplets in microalgae cells. Numerous studies have listed the difficulties occurring when using this dye with microalgae (*i.e.*, limitation of the labelling due to issues of permeation, conservation of the dye, fluorescence quenching and photostability). The major disadvantages of Nile red are its i) limited photostability, ii) interference with chlorophyll (Wolfrum & Laurens, 2012) and iii) difficulty of permeation for some species. Solutions have been proposed in the literature related to the labelling and the quantification of lipids. Optimal conditions for quantification of the lipid content are again specific to each microalgae species. However, many studies on Nile red staining demonstrated the effectiveness of this dye with microalgae species (Table 2).

BODIPY 505/515 was recently presented as a better marker than Nile red for visualizing neutral lipid content in fluorescence microscopy studies (Mark Scott Cooper et al., 2010 ; De la Hoz Siegler et al., 2012). BODIPY 505/515 labelling of lipid bodies in live cells is clearly and distinctly seen with both wide-field epifluorescence microscopy and confocal microscopy (Mark Scott Cooper et al., 2010). Recent studies used BODIPY 505/515 for lipid droplet analysis, thus avoiding the use of Nile red. Nevertheless, some authors have reported disadvantages of BODIPY 505/515, such as i) background

fluorescence of the dye in the medium and ii) failure to quantify neutral lipids between rich and low oil strains.

Currently, the comparison of Nile Red and BODIPY 505/515 remains a complex question and it is difficult to show that the use of one or the other is better because the available data are rather difficult to compare. Nile Red has been studied for many years as a probe for microalgae lipids and its mechanisms are starting to be understood, whereas BODIPY 505/515 is a new molecule for which many details are still lacking. Nevertheless, the marking response is clearly species dependant, which makes it possible to choose the most adapted dye for the microalgae species and tools available, as shown in Table 2. For both reagents, authors have suggested improvements for marker incorporation into microalgae cells. The efficiency of such enhanced methods is largely proven, even though certain Nile red and/or BODIPY 505/515 labelling still fails for some species. These species-specific technique improvements do however raise issues about i) the speed of the method and ii) possible errors caused by the toxicity of treatments to the cells (Wong & Franz, 2013).

Applications of fluorochromes

Screening. Even if Nile red or BODIPY 505/515 staining remains a powerful quantification tool in terms of time and cost of biomass (De la Hoz Siegler et al., 2012 ; Mutanda et al., 2011), high-throughput quantification methods of lipids with Nile red or BODIPY 505/515 fluorescence can hardly be seen as a method for screening different species of microalgae. It has been pointed out that staining protocol is species specific. Therefore, a given fluorescence value cannot be associated with the same amount of TAGs in two different species (De la Hoz Siegler et al., 2012). Thus, monitoring of oil-rich microalgae species is still possible for small samples when high frequency screening is required but not suitable for a large-scale analysis (Feng et al., 2013). However, high-throughput quantification of lipids with fluorochromes is widely applicable for screening of oil-rich cells in intra-population studies for microalgae domestication and diversity analysis research programs (Bougaran et al., 2012 ; T. T. Y. Doan & Obbard, 2012 ; T.-T. Y. Doan & Obbard, n.d.).

Cytometry and cell sorting. High-throughput analysis based on flow cytometry analysis to perform rapid and quantitative processing of samples gives very good results both with Nile red (Bougaran et al., 2012 ; de la Jara et al., 2003 ; Guzmán et al., 2012 ; Héctor Mendoza et al., 2008 ; Montero et al., 2011) and, more recently, BODIPY 505/515 (Brennan et al., 2012 ; Mark Scott Cooper et al., 2010 ; Govender et al., 2012a). Relative to spectrometry, flow cytometry addresses the per-cell fluorescence and makes it possible to distinguish between cells, debris and precipitate fluorescence (Cirulis et al., 2012). However, preparing samples for cytometry can be time consuming, particularly for small sample sets.

Analyses with flow cytometry allow fluorescent-activated cell sorting and selection of cells with specific characteristics (Hyka, Lickova, Přibyl, Melzoch, & Kovar, 2013). It offers the possibility to isolate improved strains or transgenic algae strains (Bougaran et al., 2012 ; T. T. Y. Doan & Obbard, 2012 ; T.-T. Y. Doan & Obbard, n.d .; Montero et al., 2011 ; Pereira et al., 2011 ; Vigeolas et al., 2012). Combined flow cytometry with microscopy (Imaging flow cytometry using the Amnis ImageScream X) is a powerful tool to visualize and quantify high-throughput lipid droplets in microalgae species (Manandhar-Shrestha & Hildebrand, 2013 ; Traller & Hildebrand, 2013). This tool provides visual lipid quantification responses with fluorochromes.

Relative vs absolute quantitative measurement

The major drawback of fluorochrome techniques for TAG assessment is that absolute quantification cannot be addressed. To bypass this problem, some authors suggested the use of a lipid standard such as triolein (TO), and fluorescence measurements have since been referred to in TO equivalents. Triolein is a symmetrical triglyceride derived from glycerol and from three polyunsaturated oleic fatty acids. To validate this calibration, triolein quantity and fluorescence intensity measurement results must be linear and reproducible (Massart et al., 2010). Several studies use a calibration curve with TO for absolute quantification of lipids (Bertozzini et al., 2011 ; W. Chen et al., 2011, 2009a ; Davis et al., 2012 ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012), (Massart et al., 2010 ; Priscu et al., 2004 ; Suman, Kiran, Devi,

& Sarma, 2012). Another approach for TAG measurement is also used and consists in the addition of different quantities of a standard to an algal culture to determine its lipid concentration (Bader, 1980). Although this is a well-known technique in chemistry, it requires more investigation in the field of fluorescent markers (Bertozzini et al., 2011). Nevertheless, the use of standard raises different problems. It is not easy to produce a stable, homogeneous and reproducible solution of triglycerides. Priscu et al., (2004) noticed that correlation with fluorescence of cell lipids is not straightforward, which is due to fluorescence differences between staining of lipid standards in cell-free solution and staining of algal cells. The main reasons for these differences lies in hydrophobicity, size and numbers of micelles formed between agglomerated TAG standards, and intracellular lipid bodies in the algal strains, which may result in possible overestimation or underestimation (De la Hoz Siegler et al., 2012). Moreover, the standard addition method through the use of TO is applicable to certain algal species such as *Bacillariophyceae* and *Dinophyceae*, but not to algal strains with thick cell walls that prevent diffusion of the Nile red or BODIPY 505/515 into the lipid vesicles (Bertozzini et al., 2011). Alternatively, absolute quantitative measurements can be also made with a calibration curve obtained with a microalgae culture of different lipid concentrations.

Recommendations for lipid quantification by fluorescent markers

Since staining with a fluorochrome dye is a very fast and cheap method to assess the lipid content in microalgae, it has attracted increasing attention over the last decade. Therefore, only a few studies propose a comprehensive procedure to perform Nile red (De la Hoz Siegler et al., 2012 ; Pick & Rachutin-Zalogin, 2012) and BODIPY 505/515 staining on microalgae.

The development of an adapted staining protocol is a long process to successfully define a reliable means of assessment of the microalgae lipid content. However, from the review of the existing literature it is possible to provide a framework and guidelines that will be helpful for researchers aiming to use Nile red or BODIPY 505/515 in reliable conditions, with accuracy and reproducibility (Fig. E2).

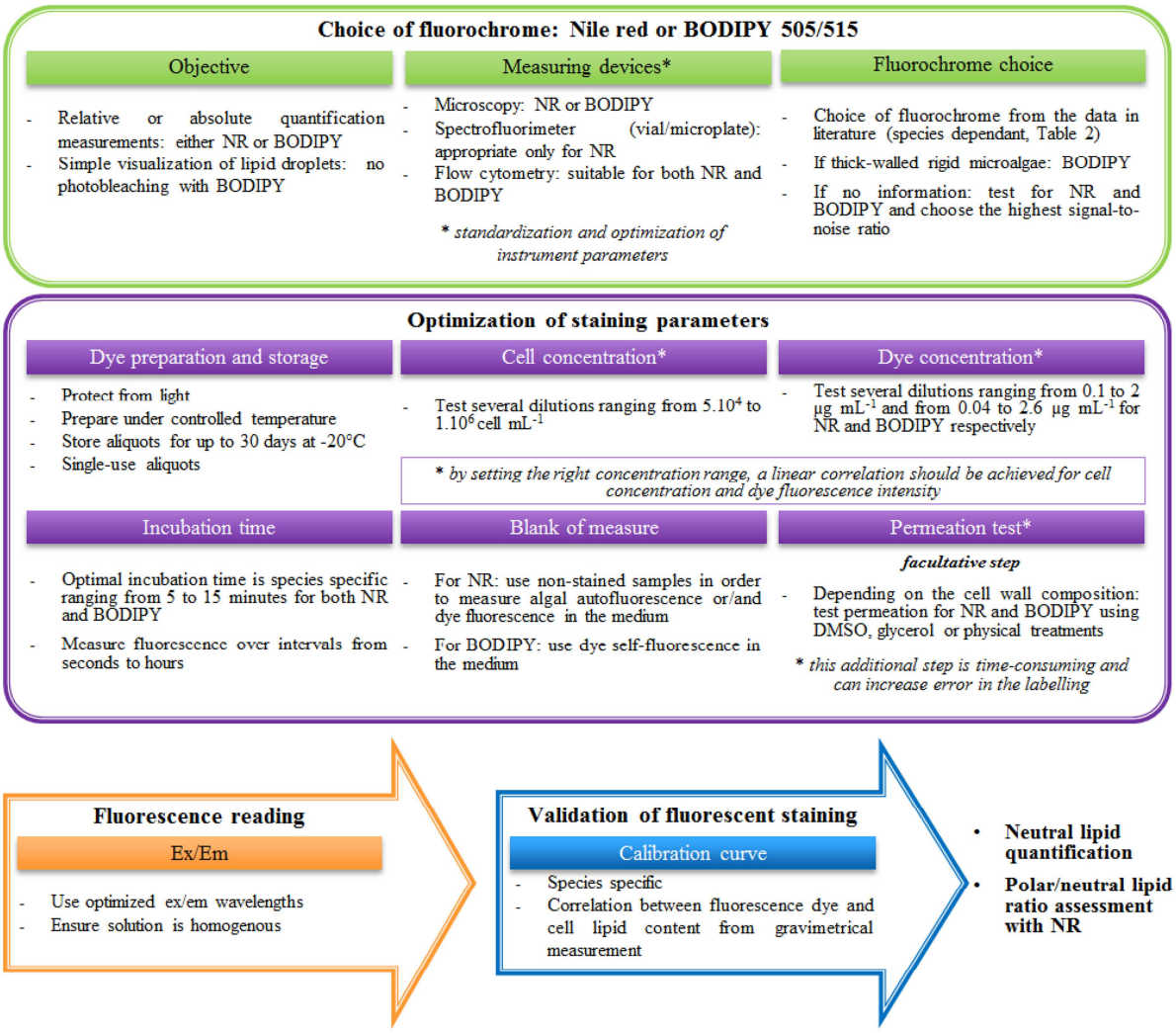


Figure E2 : General flow chart of an optimal protocol for lipid quantitative measurements in microalgae cells. Setting of fluorescent measurement procedure exposed different steps from choice of fluorochrome to neutral lipid quantification with operational indication for both Nile red (NR) and BODIPY 505/515 (BODIPY). DMSO, dimethylsulfoxide; Em, emission; Ex, excitation

Objective and tools for the choice of fluorochrome. Evaluating the content of lipids in microalgae can be done by several alternative measurement approaches. First, fluorescence microscopy offers the possibility to calculate the volume of lipid vesicles (Xu et al., 2013). This measurement can be carried out by staining with Nile red or BODIPY 505/515, but does not allow high throughput study of microalgae lipid content. The use of a spectrofluorimeter with i) a classic vial or ii) a microplate allows faster measurements. The classic fluorimeter method in a vial requires a large amount of biomass (1 to 4 mL) and is relatively time-consuming, as measurement is not automated. The use of a microplate allows a high-throughput method with several advantages in terms of time and does not require large amounts of biomass and solvent for the quantification of neutral lipid content. However, spectrofluorimeter analyses are more appropriate for Nile red staining because of the self-fluorescence of BODIPY 505/515 (De la Hoz Siegler et al., 2012 ; Wong & Franz, 2013). Then, flow cytometry allows efficient fluorescence measurement suitable for both Nile red and BODIPY 505/515. This high-throughput method also saves time and requires a lower algal biomass. In all cases, measurement sensitivity by fluorescence techniques requires standardization and optimization of instrument parameters (Cooksey et al., 1987 ; Elsey et al., 2007). Precision of staining conditions is essential for the reliability and robustness of the method.

Current studies show a good efficiency of Nile red staining for many species, but staining with BODIPY 505/515 seems more appropriate for thick-walled rigid microalgae. However, if no previous work is available for a particular species, tests of Nile red and BODIPY 505/515 analysis should be run separately. For each species, the fluorochrome that gives the highest signal-to-noise ratio should be chosen.

Optimization of staining parameters with Nile red and BODIPY 505/515. Dye stock solutions should be stored at controlled temperature and protected from the light, for up to 30 days at -20°C, avoiding thus fluorescence loss and evaporation. A safe option consists in preparing single-use aliquots of Nile

red solution and storing these at low temperature and protected from light (Pick & Rachutin-Zalogin, 2012).

The optimal algal and dye concentrations are dependent on the microalgae species and can be determined by testing several dilutions. By setting the right concentration ranges, a linear correlation should be achieved for cell concentration and dye fluorescence intensity. Generally, the final concentration of Nile red in the culture sample ranges between 0.1 and 2 µg mL^{-1}. In parallel, final concentration of BODIPY 505/515 ranges between 0.04 and 2.6 µg mL^{-1}. The appropriate type of blank should then be used.

The kinetic of fluorescence intensity over time is species specific. Incubation times usually range between 5 and 15 minutes for both the Nile red and BODIPY 505/515. Fluorescence kinetics should be experimentally tested for each species in order to assess the optimal incubation. Fluorescence should be measured over intervals from seconds to hours, making sure that photobleaching does not occur between two measurements.

Permeation is a facultative and preliminary step that can be required depending on the cell wall composition. This step can be carried out using DMSO, glycerol or even physical treatments. However, since this is an additional time-consuming step which can moreover increase error in the labelling, its necessity must be carefully evaluated.

Fluorescence reading of fluorochromes. Fluorescence measurement to efficiently assess lipid quantity and quality in microalgae is carried out using optimised excitation and emission wavelengths. Using Nile red staining, information on lipid classes is obtained by the choice of the Ex/Em wavelength pair. These measurements allow information to be obtained on lipid composition of microalgae species via the polar/neutral ratio (Table 3). Care should be taken to ensure the homogeneity of the dye-culture mixture before reading fluorescence.

Calibration of fluorescent staining. Lastly, for each species, a calibration curve would establish the relationship between fluorescence and cell lipids, as measured gravimetrically, and confirm the correct staining procedure (Table 2).

Conclusion

This review highlights the key steps of a protocol for efficient lipid labelling in microalgae species with Nile red and BODIPY 505/515. It clearly appears that markers used without accurate preliminary work to optimise the protocol may result in quantification errors. The major advantage of lipid-droplet staining in microalgae cells using fluorochromes remains the possibility of high-throughput quantification. These fluorochromes are likely to become standard advanced biotechnology tools in the future and participate in a preliminary step of the scaling-up for production of biofuels or feed oils. Additional means must be found in order to improve the high throughput screening of microalgae candidates for various applications. Measurements of lipids per biomass unit (cell, carbon…) require a calibration curve correlating fluorescence to lipid content, determined analytically. The key issue is that the calibration should be carried out regularly to demonstrate the relevance of protocol for the targeted species and its physiological state. Metabolic stress involving nutrient limitation (Bougaran et al., 2012 ; Carrier et al., 2014 ; Davis et al., 2012 ; R. Gardner et al., 2011 ; Guzmán et al., 2010 ; Lacour, 2010 ; Roleda et al., 2013) or enrichment (R. Gardner et al., 2011) to enhance TAG content must be considered with caution, since the optimal staining protocol may not be the same in cells with different physiological states.

ii. Des méthodes rapides et reproductibles de dosage des lipides. Pourquoi la spectrophotométrie UV ne fonctionne pas ?

Les UV proches (190 nm – 400 nm) sont absorbés par de très nombreuses molécules. Ils permettent ainsi le dosage des nitrates (Collos et al., 1999), de l'ADN (Walter & Biggin, 1997) et des protéines (Mach, Middaugh, & Denslow, 2001). Les UV sont peu spécifiques et réagissent particulièrement aux doubles liaisons conjuguées. Un certain nombre d'auteurs ont montré qu'ils permettaient de doser les corps gras (Forcato, Carmine, Echeverría, Pécora, & Kivatinitz, 2005) ou les lipides purs avec un degré de précision parfois remarquable. Angioni et al., (2002) démontrent ainsi qu'il est possible*, via* la spectrophotométrie UV, de distinguer différents acides gras et leurs stéréo-isomères. Cette technique peut même être couplée à une HPLC comme détecteur des acides gras (Mchowat et al., 1996). Pour pouvoir utiliser cette méthode efficacement, il faut donc développer un protocole d'extraction le plus spécifique possible.

Notre étude avait pour but de tester, *in vitro*, les possibilités de la spectrophotométrie UV dans l'objectif final de développer des capteurs pour le suivi *in vivo* des cultures de microalgues. Une première approche a consisté à étudier la réponse UV des lipides totaux de microalgues extraits à l'hexane. Dans un deuxième temps, un protocole d'extraction plus complet, en deux étapes a été développé pour extraire les lipides et les purifier. Il a ensuite été utilisé sur un mélange d'étalons lipides (acide oléique, trioléine, cholestérol) avant analyse aux UV pour valider la méthode. La troisième étape consistant à utiliser ce nouveau protocole d'extraction sur de la biomasse de microalgues n'a pas été réalisée.

Matériels et méthodes[4]

Etude des lipides totaux extraits de microalgues. Deux cultures de *Dunaliella salina* en batch ont été réalisées. La première a été récoltée après 4 jours de culture, en phase exponentielle de croissance et la seconde après 10 jours, en phase de carence. Les lipides totaux ont été extraits comme décrit dans la partie C puis repris dans de l'hexane 30 min à 50°C pour la réalisation d'une gamme étalon. L'absorbance de ces solutions a été lue entre 190 et 750 nm. En parallèle, les cultures ont été filtrées sur des filtres GF/C. La biomasse ainsi récupérée a été lyophilisée puis extraite dans de l'hexane pendant 30 min à 50°C (protocole optimisé d'extraction à l'hexane, non détaillé ici). L'absorbance de la solution a ensuite été lue à 200 nm.

Etude d'étalons lipides. La réponse de 3 différents lipides aux UV a été étudiée (acide oléique, trioléine et cholestérol). La réalisation de solutions mères dans du chloroforme puis de gammes étalon a permis de tester l'efficacité d'un nouveau protocole d'extraction. Des volumes de 0,3 ml d'eau mQ, 1,6 ml de propan-2-ol et 1 ml d'hexane (0,3 : 1,6 : 1) ont été ajoutés aux étalons lipides et passés au vortex pendant 1 min pour former une solution homogène. Cette solution a ensuite été placée 15 min à 40°C au bain-marie puis passée de nouveau au vortex pendant 1 min. Enfin, l'ajout de 1.5 ml d'eau, 0.4 ml de propan-2-ol et 1 ml d'hexane pour une proportion finale eau : propan-2-ol : hexane de 1.8 :2 :2 a permis l'obtention d'une solution bi-phasique (Fig. E2). La phase supérieure organique d'hexane contenant les lipides a été analysée au spectrophotomètre entre 190 nm à 400 nm ainsi que la phase inférieure pour étudier le coefficient de partage des lipides entre les deux phases. L'analyse des gammes étalons obtenues pour différentes longueurs d'onde a permis de déterminer la matrice des coefficients d'extinction molaire (Fig. E4, Tab. 12). Cette étude préliminaire n'a pas été menée à terme, et le protocole d'extraction n'a pas été testé sur de la biomasse algale. Enfin, 4 mélanges d'acide oléique, de trioléine et de cholestérol ont été réalisés, extraits et analysés comme précédemment décrit.

[4] Tous les solvants et étalons lipides proviennent de chez Sigma-Aldrich et sont de qualité analytique.

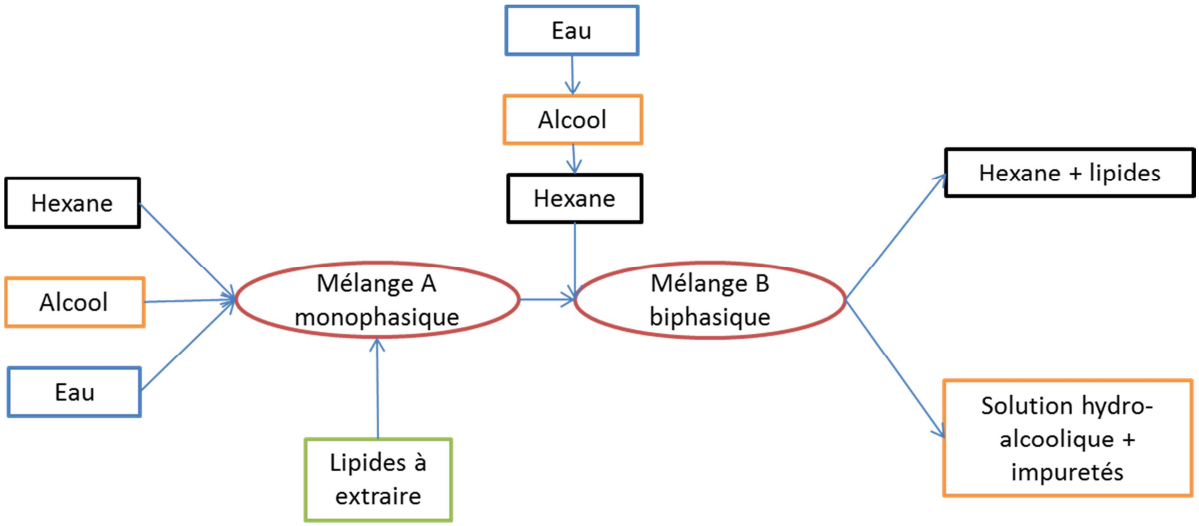


Figure E3 : synoptique du protocole d'extraction

L'absorbance de chaque mélange a été mesurée de 190 nm à 400 nm. Pour un mélange homogène de *n* composants, d'après la loi de Beer Lamber et pour une cuvette de 1 cm, A_i est l'absorbance à la $i^{ème}$ longueur d'onde, c_j est la concentration du $j^{ième}$ composant et $k_{i,j}$ est le coefficient d'extinction molaire du $j^{ième}$ composant à la $i^{ème}$ longueur d'onde. On peut donc écrire :

$$\begin{bmatrix} A1 \\ \vdots \\ An \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} k1,1 & \cdots & k1,n \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ kn,1 & \cdots & kn,n \end{bmatrix} x \begin{bmatrix} c1 \\ \vdots \\ cj \end{bmatrix}$$

Soit

$$A = K\,C$$

Avec A, la matrice des absorbances, K la matrice des coefficients d'extinction molaire et C la matrice des concentrations en $mg.mL^{-1}$. Pour avoir la concentration d'un mélange, il suffit ayant déterminé K (Tab. 12) au préalable, à l'aide des gammes étalons et ayant mesuré la matrice des absorbances du mélange, de résoudre le système.

$$C = K^{-1}\,A \qquad (1)$$

Résultats

Etude de lipides extraits de microalgues. Les gammes étalons réalisées avec des lipides extraits d'algues en phase exponentielle de croissance ou carencées sont identiques (Fig. E4). L'extraction des lipides avec ce protocole (lyophilisation de la biomasse puis hexane 100% ; 30min à 50°C) n'est pas totale (rendement d'extraction 75%, Tab. 11).

	Lipides totaux déterminés par gravimétrie (pg.cell^{-1})	Lipides totaux déterminés par lecture aux UV (pg.cell^{-1})	Rendement d'extraction (%)
Culture en phase de croissance exponentielle	48.8	34.6	70.9
Culture en phase de carence	71.9	55.8	77.6

Table 11 : inter-calibration entre la mesure classique des lipides totaux par voie gravimétrique et la méthode nouvellement développée par lecture aux UV.

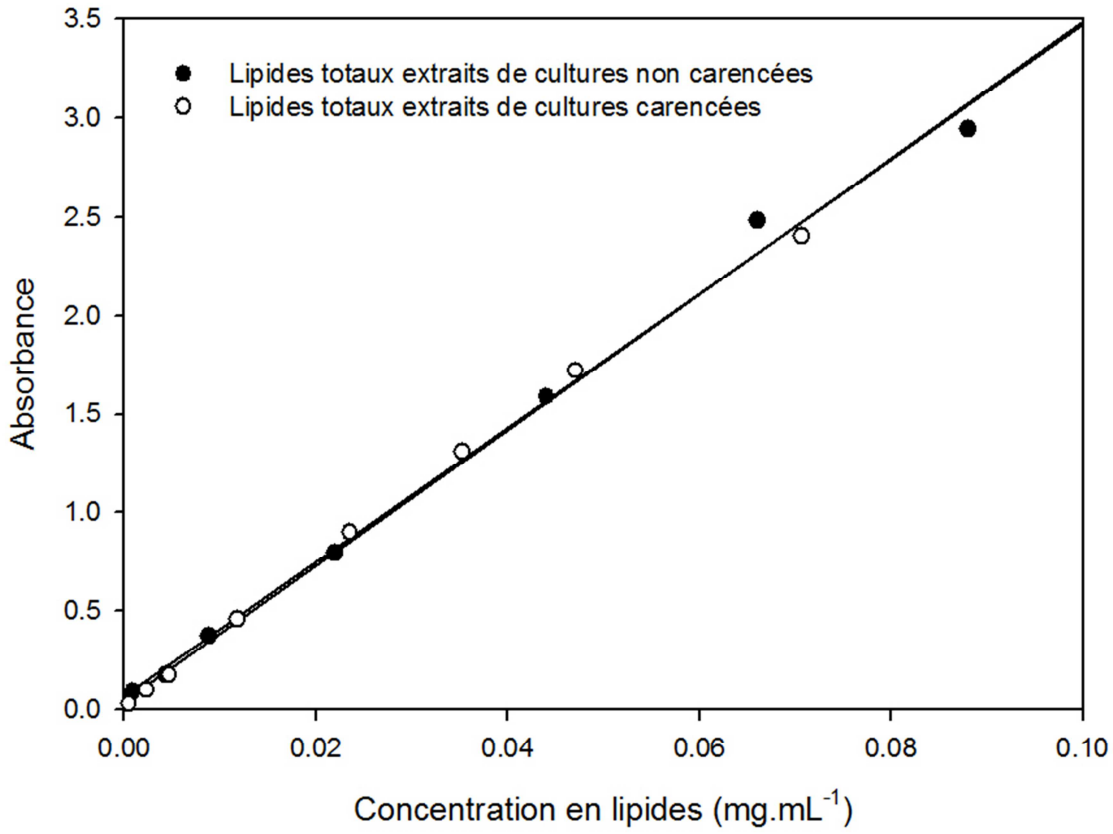


Figure E4 : courbe de calibration des lipides totaux extraits de microalgues à 200 nm

Etude d'étalons lipides. Les différents étalons lipides étudiés suivent tous la loi de Beer-Lamber dans les UV (Fig. E5). Une forte disparité de réponse entre certains lipides, comme le cholestérol et la trioléine, est néanmoins observée menant à des coefficients d'extinction molaires très différents (à 205 nm, facteur 30 ; Tab. 12). De plus, aux faibles concentrations l'absorbance de la trioléine et de l'acide oléique est en deçà du seuil de détection.

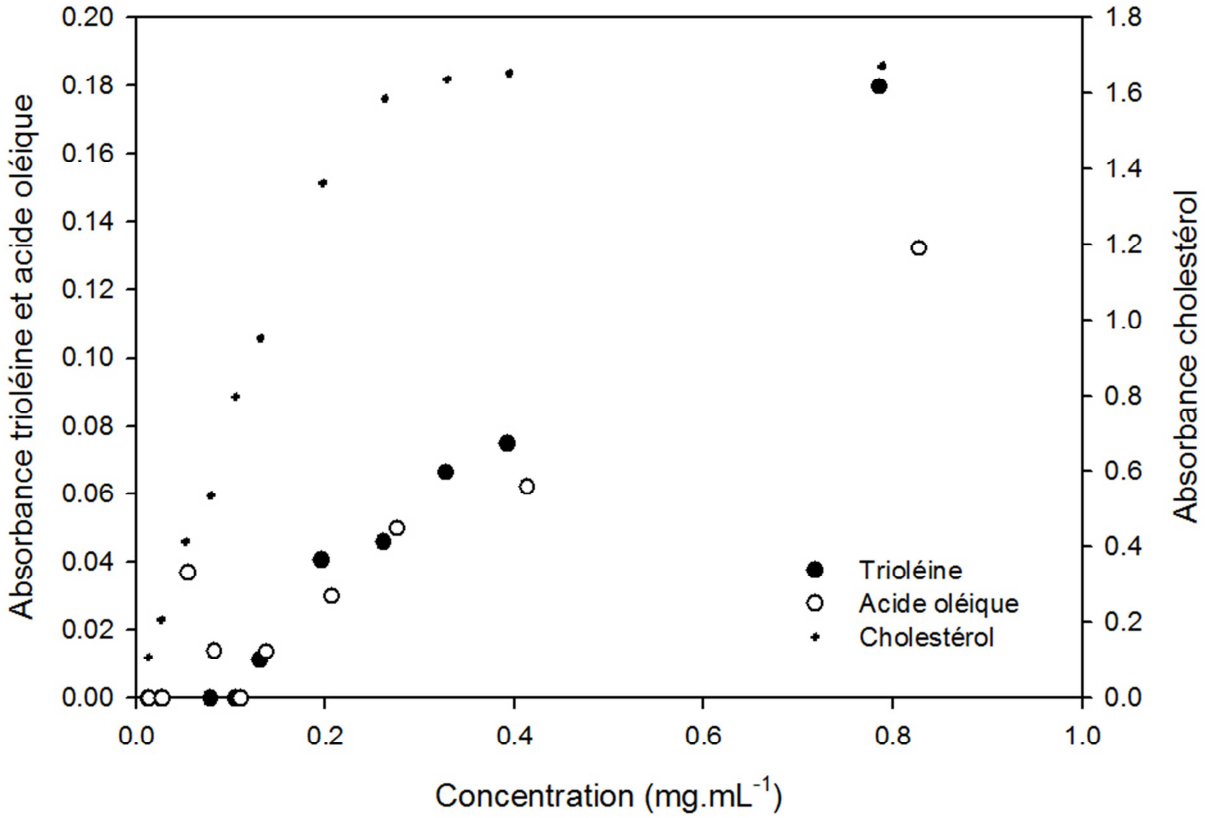


Figure E5 : courbe de calibration au maximum d'absorption, 205, 212, 214 nm respectivement pour le cholestérol, la trioléine et l'acide oléique

(nm)	Acide oléique	Trioléine	Cholestérol
214	0.1731	0.2492	1.2482
212	0.1731	0.2492	2.3646
205	0.1708	0.2374	6.8657

Table 12 : matrice des coefficients d'extinction molaire ($mL.mg^{-1}.cm^{-1}$)

Quatre mélanges de différentes concentrations de cholestérol, acide oléique et trioléine ont ensuite été réalisés pour valider le système. Après extraction et analyse au spectrophotomètre, la résolution du système ne permet pas de retrouver les concentrations initiales excepté pour le cholestérol ou l'erreur est néanmoins forte (Fig. E6 ; Tab. 13).

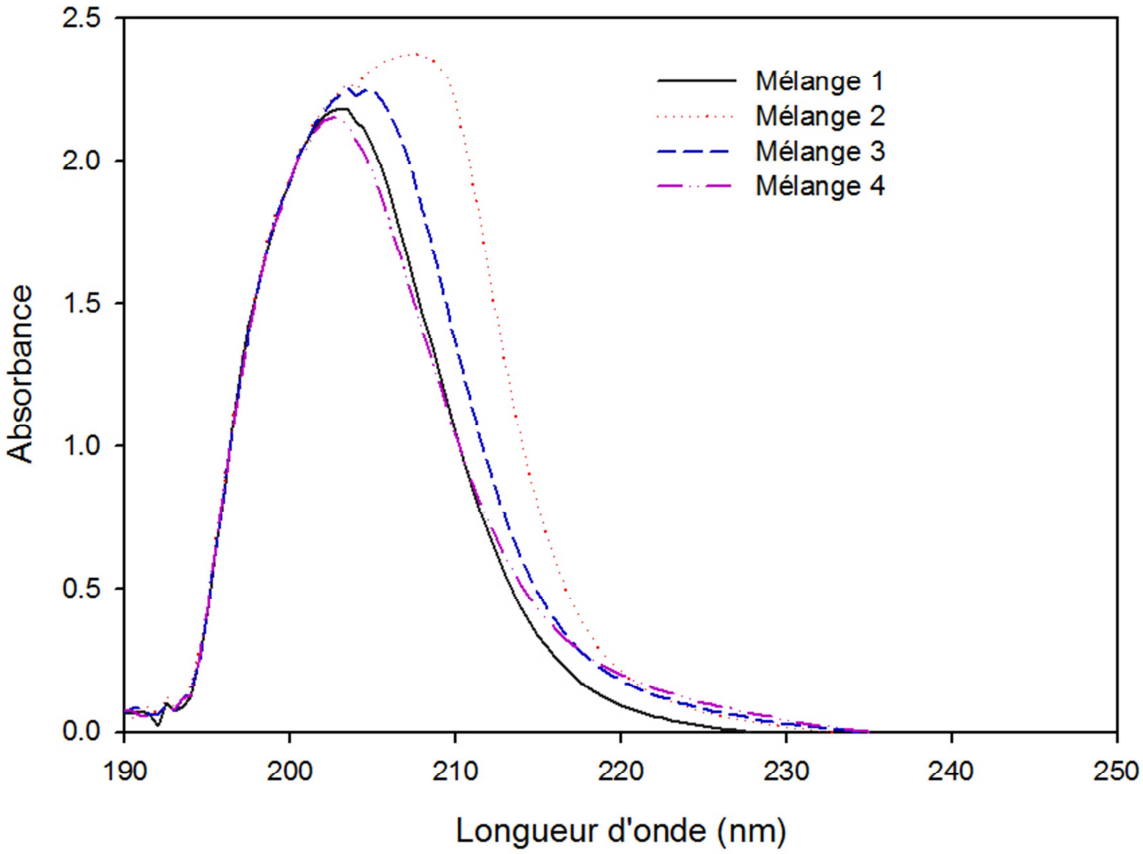


Figure E6 : absorbance dans les UV de 4 différents mélanges de trois étalons lipides

A	Absorbance mesurée		
nm	**214**	**212**	**205**
Mélange 1	0.21	0.20	0.20
Mélange 2	0.28	0.39	0.20
Mélange 3	0.55	0.39	0.26
Mélange 4	0.25	0.79	0.13

B	Concentration connue du mélange			Concentration estimée par lecture des UV		
$mg.mL^{-1}$	Acide oléique	Trioléine	Cholestérol	Acide oléique	Trioléine	Cholestérol
Mélange 1	0.21	0.20	0.20	35.47	624.28	0.25
Mélange 2	0.28	0.39	0.20	-328.06	228.76	0.59
Mélange 3	0.55	0.39	0.26	-17.39	12.79	0.32
Mélange 4	0.25	0.79	0.13	41.14	-27.70	0.22

Table 13 : A) absorbance à différentes longueurs d'onde de 4 mélanges de 3 étalons lipides. B) comparaison entre les concentrations connues et les concentrations estimées après résolution du système d'équation (1).

Discussion

Extraction à l'hexane : un rendement limité. L'absence de différences entre la courbe de calibration issue de lipides extraits de culture en phase de croissance exponentielle et de celle issue de culture en carence, fait apparaitre un manque de sensibilité de cette approche aux différentes classes de lipides. Seuls les lipides totaux peuvent-être estimés avec suffisamment de précision. De plus, les rendements d'extraction de ce premier protocole basique ne sont pas optimaux (75%). L'hexane n'est pas un bon solvant d'extraction, particulièrement en ce qui concerne les lipides membranaires beaucoup trop polaires (Shin, Ryu, Bae, Crofcheck, & Crocker, 2014). Un deuxième protocole d'extraction plus spécifique a donc été développé mais non testé sur des lipides totaux de microalgues.

Choix du solvant d'extraction des lipides. Rares sont les solvants qui n'absorbent pas dans les UV et qui ont un seuil de coupure au-delà de 200 nm. Ces solvants, sont généralement trop polaires, ou trop apolaires pour extraire correctement les lipides des microalgues (acétonitrile, pentane, eau, heptane). Enfin, pour une mesure précise des lipides, il faut une extraction en deux étapes (Bligh & Dyer, 1959). Dans un premier temps, le système de solvants doit-être miscible pour solubiliser correctement les membranes et extraire efficacement les lipides. Puis, il doit devenir non miscible, avec deux phases aux polarités différentes : une phase organique, permettant de solubiliser les lipides et une phase aqueuse, permettant de solubiliser les résidus cellulaires (Fig. E2). L'hexane et le propan-2-ol (isopropanol) ont des seuils de coupure faibles (> 190 nm). De plus, Molina Grima, Camacho, Pérez, & Sánchez, (1994) montrent que le mélange hexane : isopropanol (1 : 1.5) a un bon rendement d'extraction (66% contre 92% pour le mélange chloroforme : méthanol : eau). Ces deux critères permettent de justifier leur utilisation. Pour permettre une extraction en deux étapes, le référencement de Skrzecz, Shaw, & Maczynski, (1999) a été utilisé. Le diagramme de phase hexane : propan-2-ol : eau a permis (Fig. E7) de déterminer les proportions d'un mélange miscible (point A) et non miscible (point B).

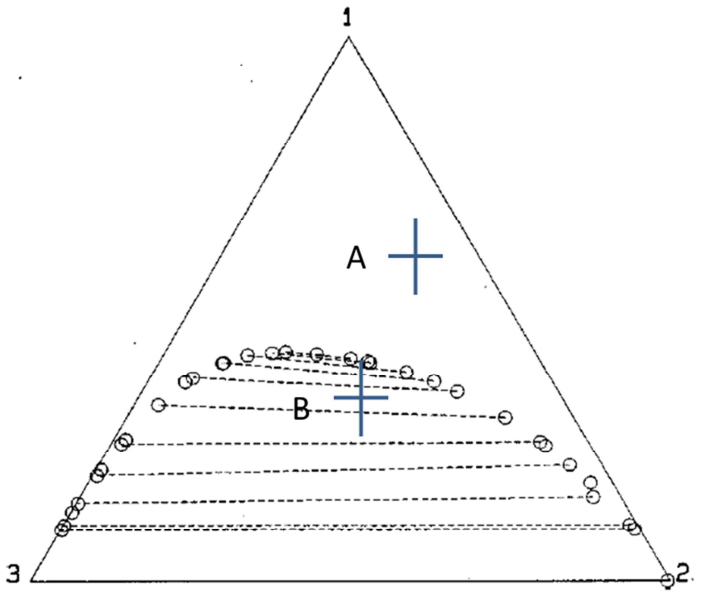


Figure E7 : diagramme de phase du système propan-2-ol (1), hexane (2) et eau (3)

Réponse spectrale des étalons lipides. La forme des spectres correspond aux données de la littérature (Mchowat et al., 1996 ; Angioni et al., 2002 ; données non montrées). Pour l'acide oléique, la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption est conforme aux résultats de Mchowat et al., (1996) mais très différente des résultats d'Angioni et al., (2002). Dans le premier cas, les auteurs travaillent avec des lipides en solution ce qui correspond à notre approche, alors que la seconde équipe travaille directement sur des produits purs, en poudre, expliquant probablement la différence et soulignant l'influence du solvant d'extraction.

Les molécules étudiées absorbent dans les UV, sont quantifiables et différentiables en tant que produits purs. Néanmoins, un certain nombre de facteurs expliquent que nous ne sommes pas parvenus à déterminer la concentration des différents constituants d'un mélange. Premièrement, les seuils de coupure de l'hexane et du propan-2-ol bien qu'étant les mieux adaptés de tous les solvants disponibles, ne sont pas idéaux. A partir de 200 nm, ces deux solvants absorbent très rapidement, saturant le spectrophotomètre et limitant la précision de la mesure entre 190 et 200 nm, alors que les longueurs d'onde correspondant aux maximums d'absorption sont proche de ces valeurs. De plus, les réponses aux UV de chaque classe de lipides sont particulièrement similaires, complexifiant la déconvolution des spectres représentant des mélanges (C. Brown & Lynch, 1982). Enfin, certaines

classes de lipides absorbent beaucoup plus que d'autres dans les UV (cholestérols, bêta-carotène), probablement du fait de leur structure. Mchowat et al., (1996) montrent que l'absorbance dans les UV est due au nombre de doubles liaisons carbone-carbone conjuguées. Le cholestérol et surtout le bêta-carotène qui comptent de nombreuses doubles liaisons, absorbent donc plus. Pour une résolution correcte du système (1), il faut que les valeurs de la matrice des coefficients d'extinction molaire soient du même ordre de grandeur.

Des études complémentaires sont nécessaires. Premièrement, le protocole d'extraction est à améliorer. Les proportions et la composition des solvants doivent être optimisées pour obtenir un protocole encore plus spécifique des triglycérides. De plus, les réponses des étalons lipides et des lipides extraits d'un organisme sont souvent différentes. Il faudrait réaliser le même travail avec des lipides totaux de microalgues dont la composition a été déterminée au préalable par des voies plus conventionnelles (chromatographie phase liquide). L'amélioration de la déconvolution des spectres d'absorption par des méthodes d'apprentissage permettra également de gagner en précision (Espinosa-Mansilla, Salinas, del Olmo, & de Orbe Payá, 1996). Enfin, l'utilisation des proches infrarouges, tout en présentant les mêmes facilités d'utilisation, permettrait un accès à plus de solvant, donc une plus grande marge de manœuvre.

III. Conclusions, utilisations futures et perspectives

Les techniques classiques d'isolement de souches, prérequis pour la sélection, sont largement utilisées au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur mer pour l'étude de la biodiversité marine. Leur utilisation plus appliquée a permis d'isoler un clone de *D. salina* sur-accumulateur en bêta-carotène, utilisé par la suite dans le cadre du projet FUI Salinalgue. Ces techniques de pointe ont permis, durant les expériences de sélection par pression continue, de sauvegarder les souches ou ponctuellement de les récupérer, lorsque la pression de sélection trop forte avait engendré une perte de la culture[5]. Il apparait de plus en plus évident que ces méthodes sont également un outil puissant de sélection physio-morphologique. Couplées avec des techniques de préparation préalables des échantillons de microalgues (filtration, UV, etc…), elles permettraient de développer une nouvelle approche de la sélection.

La quantification des lipides est un frein à l'émergence des biocarburants à base d'algues. Le besoin de méthodes à la fois reproductibles, précises et rapides est réel, la difficulté également. Les fluorochromes tels que le Nile red, offrent une vraie alternative. Il doivent néanmoins être utilisés avec beaucoup de soin. Ils ne sont pas universels et chaque espèce devra être caractérisée minutieusement. Trop d'études utilisent le Nile red comme indicateur, sans optimiser son protocole, rendant les résultats peu exploitables. La spectrophotométrie UV pourrait être une alternative. Néanmoins, cela nécessite de développer une extraction préalable de la biomasse extrêmement spécifique amoindrissant l'intérêt de cette approche. Ces développements sont longs et demandent une bonne connaissance des méthodes classiques de dosage des lipides.

[5] Un remerciement spécifique à la MCCV et au service de culture du LOV.

F. LA SELECTION PAR PRESSION CONTINUE NON OGM :

UNE APPLICATION DES THEORIES DE DARWIN

It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent,
but rather the one most adaptable to change.
Charles Robert Darwin (1809 – 1882)

I. La sélection par pression continue pour améliorer la réponse de *Tisochrysis lutea* à la température

Plos one
Bonnefond H[1], Grimaud G[2], Rumin J[3], Pruvost E[1], Bernard O[2], Sciandra A[1]
[1]CNRS-UMPC, LOV UMR 7093, 06230 Villefranche-sur-mer, France
[2]INRIA BIOCORE, 06902 Sophia Antipolis Cedex, France
[3]IFREMER, PBA, 44311 Nantes, France

i. Introduction

Microalgae are a promising source of resources and bulk chemicals (nutrition, biofuels, and cosmetics). Nevertheless, strains used are too often of wild type with poor industrial performances. Like in the agricultural field, the need to obtain selected strains, more productive, is critic. In outdoor production, microalgae have to cope with high amplitude temperature fluctuations especially in photobioreactors or greenhouses. Many industrial species, isolated from natural environment, have thermal response unsuitable when compared with these conditions. At least, in temperate climate, microalgae production was not possible all along the year due to low temperature especially during the winter. As a consequence, in a microalgae plant, an important loss of productivity was observed coupled with high cooling/heating costs at the day and/or year scale (Ras et al., 2013).

The static response of microalgae to temperature has been extensively studied (Béchet et al., 2013) and it can be accurately predicted by a model involving three cardinal temperatures: T_{min}, T_{max} and T_{opt}, corresponding respectively to the temperature below which the algae do not grow, the temperature beyond which the algae do not grow, and the optimum growth temperature (Bernard & Rémond, 2012). The difference between T_{max} and T_{min} is the thermal niche of microalgae. The modification of this cardinal temperature to obtain an adapted strain with a broader thermal niche seems an interesting way to increase productivity.

Microalgae can acclimate to temperature, in a process close to photoacclimation (Raven & Geider, 1988). The objective of our protocol was to go beyond acclimation (phenotypic and physiology

plasticity) in order to trigger an adaptation (genetic modification) to temperature fluctuations. Under low environmental stresses acclimation provides a better ecological fitness. However, when environmental stress exceeds physiological limits, adaptation takes place. Adaptation is the genetic drift of a population to keep individuals which have the highest fitness to the new stressing conditions. Adaptation is triggered by two mechanisms: the initial genetic variability of non-monoclonal population (pre-selective mutations) and genetic mutations occurring during the environmental stress called adaptive mutation (Luria & Delbrück, 1943). The main issue is to find the limit between a low and a high stress, in other words the border between acclimation and adaptation. The 'Ratchet protocol', consists to periodically increase the selective pressure applied as long as the culture grown (Reboud & Majerus, 2007). It was a perfect tool to obtain the maximum adaptation capability of an organism to a given stress. To distinguish between acclimation and adaptation, the temperature response of the different strains before and after the selection process were compared. Some authors interesting in global warming have studied with a similar approach, the evolution of microalgae strains submitted to increasing average temperature (Huertas et al., 2011)). Nevertheless, nobody has tried to modify two out of three cardinal temperatures (T_{min} and T_{max}) at constant average temperature using continuous selection.

The exclusion principle in a continuous reactor (chemostat) is the basis of the continuous selection but most of the studies focused on competition for nutrient, at constant dilution rate (Hansen and Hubbell, 1980). Individuals which stay in the chemostat are the ones which require the lowest amount of substrate to maintain a growth, balancing the dilution (Grognard et al. 2014). The turbidostat is more complex, since it involves a feedback loop to regulate biomass density. The theoretical outcome of the competition, when nutrients are not limiting is however simpler: the individuals which have the highest average growth rate, in stressing conditions, win the competition and stay in the reactor (Masci et al., 2008).

The new idea was to implement this principle, with a daily temperature fluctuation, as forcing parameter (being constant on a daily average). In such a system, named “selectiostat”, the survivor individuals are those which can maintain the highest average growth rate despite extreme temperature fluctuations. A turbidostat will automatically reduce the dilution rate in less favorable conditions to maintain a constant biomass. A trade-off between selection efficiency (with high dilution rate and therefore limited stress) and high selection pressure (with high stress and therefore reduced dilution rate) must therefore be found. On another hand, the population size must stay large enough to maximize the probability to generate favorable mutations conferring adaptation without introducing another stressing parameter (light limitation for instance).

The microalgae strain which was used, was already enhanced compared to the wild type *Tisochrisis lutea* (CCAP 927/14), formerly *Isochrysis galbana clone Tahiti* (Bendif et al., 2013). It was previously submitted to a mutation selection procedure (Bougaran et al., 2012). The enhanced strain resulting (CCAP 927/17, named W2X in this work) turned out to produce two times more neutral lipids under nitrogen starvation, without significant modification of the maximum growth rate in nitrogen replete conditions. The W2X strain was grown in the selectiostats over a long period in order to improve its thermal performances. At the end, the key W2X properties (growth rate, lipid content) were conserved, whereas higher thermal niche and DHA production was obtained.

ii. Materials and methods

Microalgae strain. The *Tisochrisis lutea* strain (CCAP 927/17), with a doubled triglyceride productivity, was used as 'wild type' and named W2X in this work (Bougaran et al., 2012; Carrier et al., 2014).

Culturing system. Our culturing system, a 1.9 L plane photobioreactor named "selectiostat", was specifically designed to impose an increasing pressure of selection on long-term continuous cultures of microalgae. Cultures were continuously and gently homogenized by a magnetic stirrer and a slight air bubbling. Photobioreactors were continuously illuminated on one side, with LED (Nichia NVSL219BT 2 700°K) at 250 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Light intensity was continuously measured with a plane probe (SKY, SKL2620) placed on the opposed side of the reactor. The enrichment sterile medium was prepared in 20 L tanks (Nalgen) filled with 3 weeks matured natural seawater filtered on 0.1 µm and autoclaved at 120°C for 40 min. After cooling, f/2 medium was added (Guillard, 1975).

Cleaning procedure. Since selection experiments lasted more than 150 days in stressing conditions, a procedure to prevent biofilm formation was required. The selectiostats were restarted monthly to be cleaned. After saving 1 liter of culture in an autoclaved schott bottle, the different parts of the selectiostats were dismounted and washed with milliQ water then 70% ethanol. Once dry and reassembled, the photobioreactors were washed with 10% HCl and rinsed with fresh sterile medium filtered through 0.22 µm (SpiralCap, Gelman). The selectiostats were then filled with the preserved culture and complemented with a sterile medium filtered through 0.22 µm with a step-dose pump to readjust the culture volume.

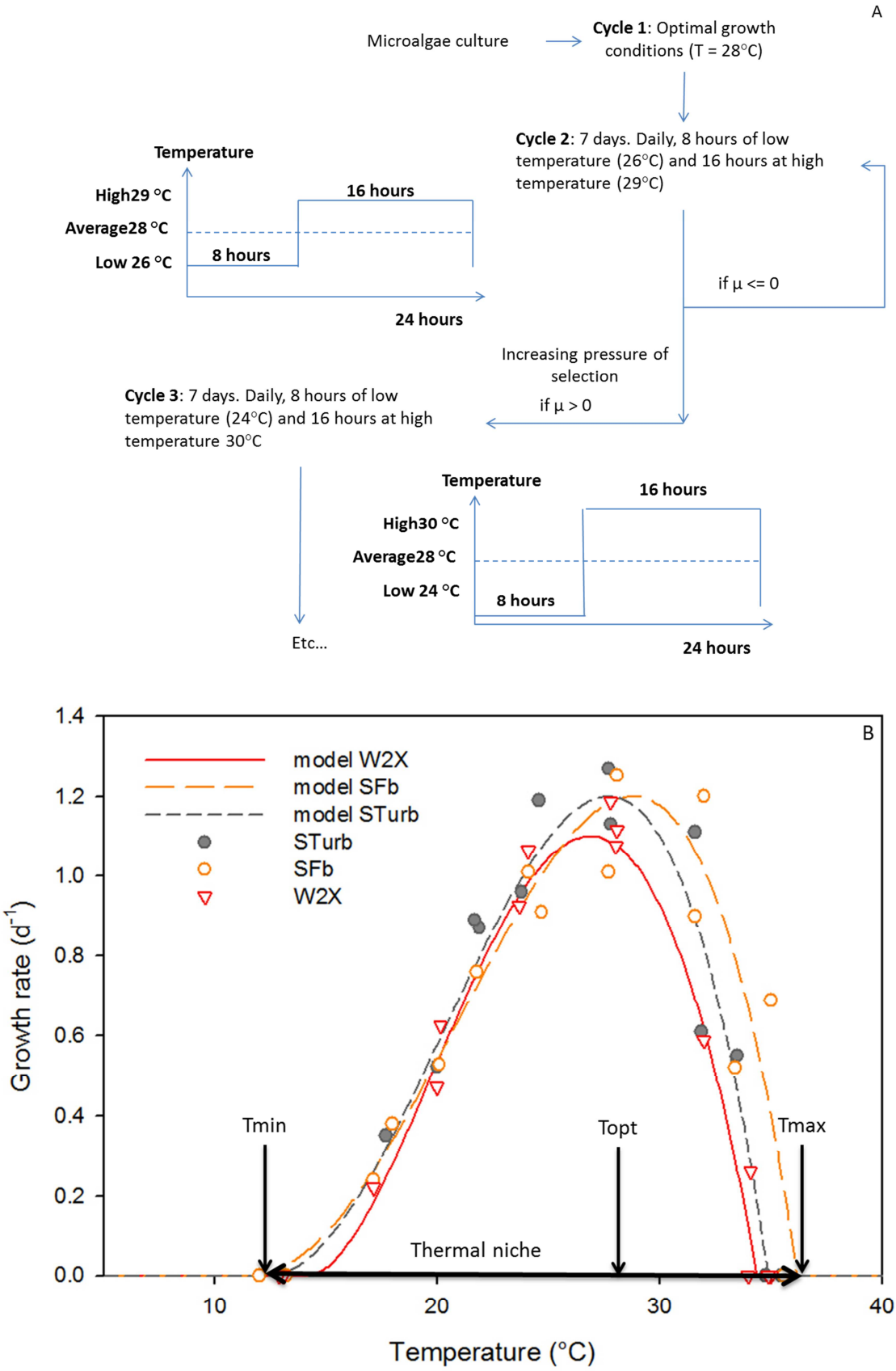


Figure F1 : A) Schematic representation of the selection procedure B) microalgae growth rate response to temperature. W2X was the initial strain; SFb and STurb were the temperature-adapted strains.

Automatic control procedure. pH was regulated at 8.2 by computer-controlled micro-addition of CO_2. Selectiostats were temperature-controlled by a double water jacket using a programmable cryostat (Lauda Proline RP845). The inertia system was 30 – 40 min to change the temperature from 10 to 40 °C in the culturing system. Light, pH, temperature, turbidity, dilution rate were continuously recorded by ODIN® software developed by INRIA.

Turbidostats vs Feedbatch mode. In the turbidostat culture, STurb (S as selectiostat and Turb as turbidostat mode), turbidity was continuously measured at 800 nm and kept constant at a turbidity roughly corresponding to 9.10^5 cell.mL^{-1} by dynamically adjusting the dilution rate with ODIN® software. The set point biomass was sufficiently high to optimized selection, allow accurate biochemical analyses on small volume samples, and sufficiently low to prevent nutrient limitation and light shading. On top of the turbidostat, a fed-batch culture was carried out (SFb). It was diluted with fresh sterile medium every 7 days. Only 5 to 10% of the initial volume was kept, in order to restart cultures with an initial cell density of 5.10^5 cell.L^{-1}.

Continuous selection procedure, the so-called ratchet protocol. The selection by temperature was processed modifying the protocol proposed by Reboud & Majerus, (2007), modified by Huertas, Rouco, López-Rodas, & Costas, (2010). Square wave temperature variations were daily applied. The temperature pattern was identical along a cycle which lasted 7 days, to avoid nitrogen starvation in the fed-batch mode and reach equilibrium in the turbidosat mode. The daily pattern of a cycle consisted in a low temperature (T_{low}) during 8 hours and a high temperature (T_{high}) during 16 hours, with a daily constant average temperature (28°C). If a stabilized growth rate was observed, at the end of a cycle, the next selection cycle was started. It consisted in reducing T_{low} by 2°C and increasing T_{high} by 1°C (Fig. F1 A), so as to keep a constant average temperature. This asymmetry of temperature signal was motivated by the asymmetry of microalgae response to temperature (Fig. F1 B; Bernard & Rémond, 2012). The same selection cycle was repeated when no positive average growth was

observed. For the two last cycles, in highly stressing conditions inducing high mortality, T_{high} was increased by only 0.5°C and T_{low} was decreased by only 1°C.

Cell population. Cell concentration, size distribution and biovolume were monitored once or twice a day by optical particle counter (HIAC - Royco; Pacific Scientific Instruments). The first sampling was performed at the beginning of the low temperature period, the second at the beginning of the high temperature period. The variability between triplicate measurements was routinely lower than 5%. The mean cell diameter of the population and the biovolume were calculated from its size distribution. For the feed-batch mode (SFb), the average growth rate, experimentally measured for a cycle of selection $\bar{\mu}_{Exp-SFb}$ (d^{-1}), was calculated on the linear part of the logarithm of cell biovolume using the following equation.

$$\bar{\mu}_{Exp-SFb} = \frac{Ln(\frac{BV_2}{BV_1})}{t_2 - t_1}$$

where BV_1 and BV_2 are the biovolume ($\mu m^3.mL^{-1}$) at time t_1 and t_2 ($t_2 - t_1$ = 4 or 5 days). For the turbidostat mode (STurb), equilibrium was reach after about 1 day. Afterward, the average growth rate measured $(\bar{\mu}_{Exp-STurb})$, was directly equal to the average dilution rate (D) recorded by ODIN on the resting days of the cycle (6 days).

Growth response with respect to temperature (TIP). The TIP (Temperature, Irradiance, pH) setup developed by Marchetti, Bougaran, & Dean, (2012) was used to measure the temperature response of different strains, in acclimated conditions before and after the selection process. This device can assess the effect of pH and irradiance, but only the temperature response was assessed. The exponential growth rate at 8 temperatures ranging from 12°C to 35.5°C, at constant irradiance (250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) and pH (7.9) was measured after a lag time of 1 day on the linear part of the logarithm of DO_{680}. Cell concentration was equally followed by image analysis on Malassez slides using specific image analysis software (Samba Technologies, Meylan, France) after Lugol dying, to check the validity

of DO measurements. Lipid classes and fatty acids composition were analyzed for STurb and SFb on the final point of the reactors at 21°C, in nitrate starvation.

Characterisation of temperature response. The three cardinal temperatures (T_{min}, T_{max} and T_{opt}) and the thermal niche were computed from the TIP growth response at various temperatures using the model proposed by Bernard & Rémond, (2012). A gradient based optimisation procedure was run and the jackknife analysis provided an estimate of the cardinal temperatures together with confidence intervals of the new strains SFb and STurb and the initial W2X.

The model, calibrated with the cardinal temperatures of the strain W2X, was also used to estimate the theoretical average growth rate of this strain ($\bar{\mu}_{Th-W2X}$), in selective conditions, assuming a one hour transition at $T_{average}$:

$$\bar{\mu}_{Th-W2X}(T_{low}, T_{high}) = \frac{7.5}{24}\mu_{W2X}(T_{low}) + \frac{15.5}{24}\mu_{W2X}(T_{high}) + \frac{1}{24}\mu_{W2X}(T_{average})$$

The gain of fitness was then computed as follows:

$$G = \left(1 - \frac{\bar{\mu}_{Exp}}{\bar{\mu}_{Th-W2X}(T_{low}, T_{high})}\right)100$$

Where $\bar{\mu}_{Exp}$, the average growth rate of SFb or STurb experimentally measured as is previously described.

Cellular content analysis. 6.65 mL of culture were filtered in triplicates once a week, on the middle of the cycle, just after the transition T_{high}, T_{Low}, onto glass-fiber filters (Watman GF/C), precombusted at 450°C for 12h. For particulate carbon and nitrogen analyses, samples were kept at 60°C until analyses performed with a CHN analyzer (2400 Series II CHNS/O, Perkin Elmer). For pigments analyses, sample were kept at -80°C until analyses. Filters were extracted in acetone (3 ml) for 1 hour at 4°C in the dark, with frequent and gentle stirring. After 5 min of centrifugation (JOUAN G 412) at 2000 rpm, supernatant was analyzed with a spectrophotometer (Perkin Elmer UV/Vis Spectrophotometer Lambda2). Chlorophyll a, b and total carotenoids concentrations were determined reading

absorbance at 470.0, 644.8 and 661.6 nm and resolving the system described by Lichtenthaler(Lichtenthaler, 1987) using pure acetone. The variability between triplicates was lower than 7%.

Lipids sampling were made at the end of the TIP experiment at the temperature of 21°C after 10 days of cultivation in nitrogen starved conditions. 200 ml of culture were centrifuged (JOUAN G 412) during 10 min at 2000 rpm 100 µL of Cl_3Fe (50 $mg.mL^{-1}$) as flocculate. Lipid extraction protocol was then derived from the Bligh and Dyer's method (Bligh & Dyer, 1959). Lipid class analysis was performed as previously described. The variability between triplicate measurements of triglycerides was routinely lower than 20 % for minor components (>5% of total lipids) and less than 3% for major components. Fatty acid analysis started by a conversion of saponifiable lipids onto methyl esters with 7 % boron trifluoride in methanol (Morrison & Smith, 1964). Gaz chromatography (GC) of fatty acid methyl esters (FAME) was carried out on a 30 m length 0.32 mm internal diameter quartz capillary column coated with famewax (Restek) in a Perkin-Elmer XL autolab GC, equipped with a flame ionization detector (FID). The column operated isothermally at 185°C. Helium was used as carrier gas at 7 psig. Injector and detector were maintained at 250°C. The variability was routinely 3% for major components, 1 – 9 % for intermediate components and 25 % for minor components (<0.5% of total fatty acids).

iii. Results and discussion.

From acclimation to adaptation. From cycle 2 to cycle 5 (T_{Low} = 20°C; T_{high} = 32°C), an increase in the average growth rate was observed for both culturing modes while the model calibrated with the W2X parameters would predict a decrease (Fig. F2). This increase highlighted that on this range of temperature, periodic temperature variations had a clear positive impact on growth rate when compared with constant temperature (cycle 1). This was previously observed under concomitant variations of light and temperature in outdoor mimicking conditions experiment in *Dunaliella salina*. Moreover, STurb reached a higher average growth rate and fitness gain than SFb (Fig F2; Fig. F3). Turbidostat is known to increase culture stability and lead to higher growth rate compared to fed-batch mode which has to periodically face with abrupt changes of the culturing conditions (nutrient concentration, light intensity; Ho, Ye, Hasunuma, Chang, & Kondo, (2014)). It is very likely that the difference average growth variations up to cycle 5 were due to this difference. At that point, the selection pressure was still too low and cell response was mainly due to acclimation. After cycle 5, a decrease in the growth rate was observed concomitantly with a slowing down of the gain increased. The both selectiostats exhibits similar average growth rates (Fig. F2 ; Fig. F3). This behavior convergence probably highlighted the frontier between acclimation and adaptation, while the pressure of selection was sufficiently high to be the major forcing parameter. In a third stage, from cycle 6 to 8 (T_{Low} = 14°C; T_{High} = 35°C), the gain increased and similarly for STurb and SFb (Fig. 3). It could be due to a selection of pre-selective mutations (selection of pre-adapted individual presented into the initial population). At least, from cycle 8, the transition to an upper selection cycle led systematically to a reduced grow rate. Then, this growth rate gradually increased with number of generations within a cycle (Fig. F3; black arrows). This increase may result from adaptive mutations occurring during the stress and leading to cells with a better fitness to the conditions.

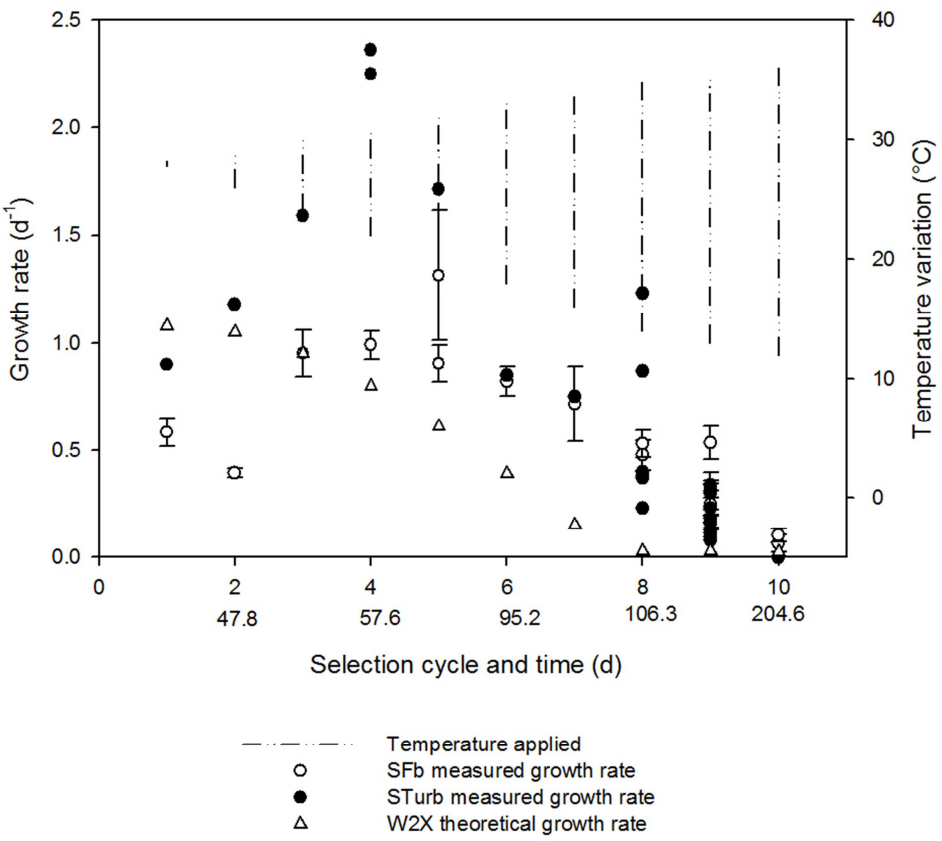


Figure F2 : theoretical growth rate for the initial strain W2X compared with measured growth rate for S-Turb and S-Fb.

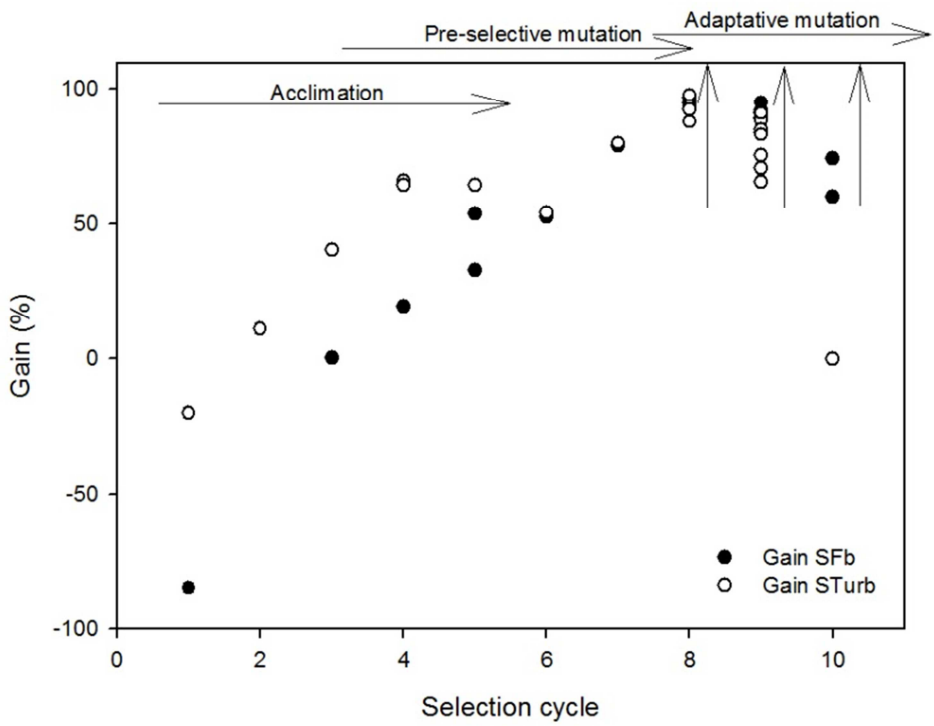


Figure F3 : evolution of the fitness gain during the selection procedure

Costas, Huertas, Baselga-Cervera, García-Balboa, & López-Rodas, (2014) with a specific protocol (Luria & Delbrück, 1943), increased average temperatures in *Isochrysis galbana* wild type (T_{max} = 28°C) and converged toward our conclusions. On a low temperature range (15 – 30°C), they observed adaptation based on acclimation or pre-selective mutation (their protocol did not permitted to make a difference) then, on a higher range (30 - 35°C), the adaptation of the population was due to the occurrence of new mutants (adaptive mutation).

New strain characterization. The thermal response of the two new strains was characterized with the TIP (Marchetti et al., 2012) and compared to the original strain W2X (Fig F1 B). The performance evaluation of cardinal temperatures evolution was performed with the model of Bernard & Rémond, (2012). Optimal growth rates showed significant different between new selected strain and W2X (Fig. F4 A). It was shown mathematically and experimentally that continuous cultures increased the growth rate (Masci et al., 2008; Hansen & Hubbell, 1980). Indeed, by renewing continuously the culturing medium, individuals that grew the slower were eliminated.

A common hypothesis in literature, consists in assuming the trade-offs between thermal specialist (narrow thermal niche; high growth rate) and thermal generalist (large thermal niche; low growth rate). A microorganism with an increased temperature range should have lower performance. In other world, the area under the growth rate to temperature curve is constant. A direct consequence of this trade-off is a negative correlation between an organism's optimal temperature and its thermal niche size (Knies, Kingsolver, & Burch, 2009 ; Levins, 1968 ; Huey & Slatkin, 1976). Nevertheless, this widespread assumption in evolutionary models of thermal adaptation is hardly supported by experimental data with microorganisms. Bennett & Lenski, (1993) refuted this assumption. They obtained, after 2000 generations, an increasing T_{opt} of some *E. coli* strains without modification in the thermal niche. To our knowledge no experiments with microalgae were so far carried out to discuss this hypothesis. As Eppley, (1972), an increase in the μ_{opt} was observed with an increase in the T_{opt} (Fig. F4). This modification went with an increase of the thermal niche for the new strain compared

to the initial W2X (+11% and +22% respectively for STurb and SFb) without any decrease in the growth rate (Fig. F4). As a conclusion, the trade-off theory for *T.lutea* does not seem verified. The thermal niche increase was the consequence of two distinct effects, an increase in T_{max} and to a lesser extent, a decrease in T_{min}. T_{max} could be more sensitive to adaptation and genetic modifications than T_{min} because of the shape of the temperature response curve of microalgae. Indeed, high temperatures led straight and quickly to deleterious effects whereas cold temperature response was less marked especially for the very low temperatures (Fig. F1 B).

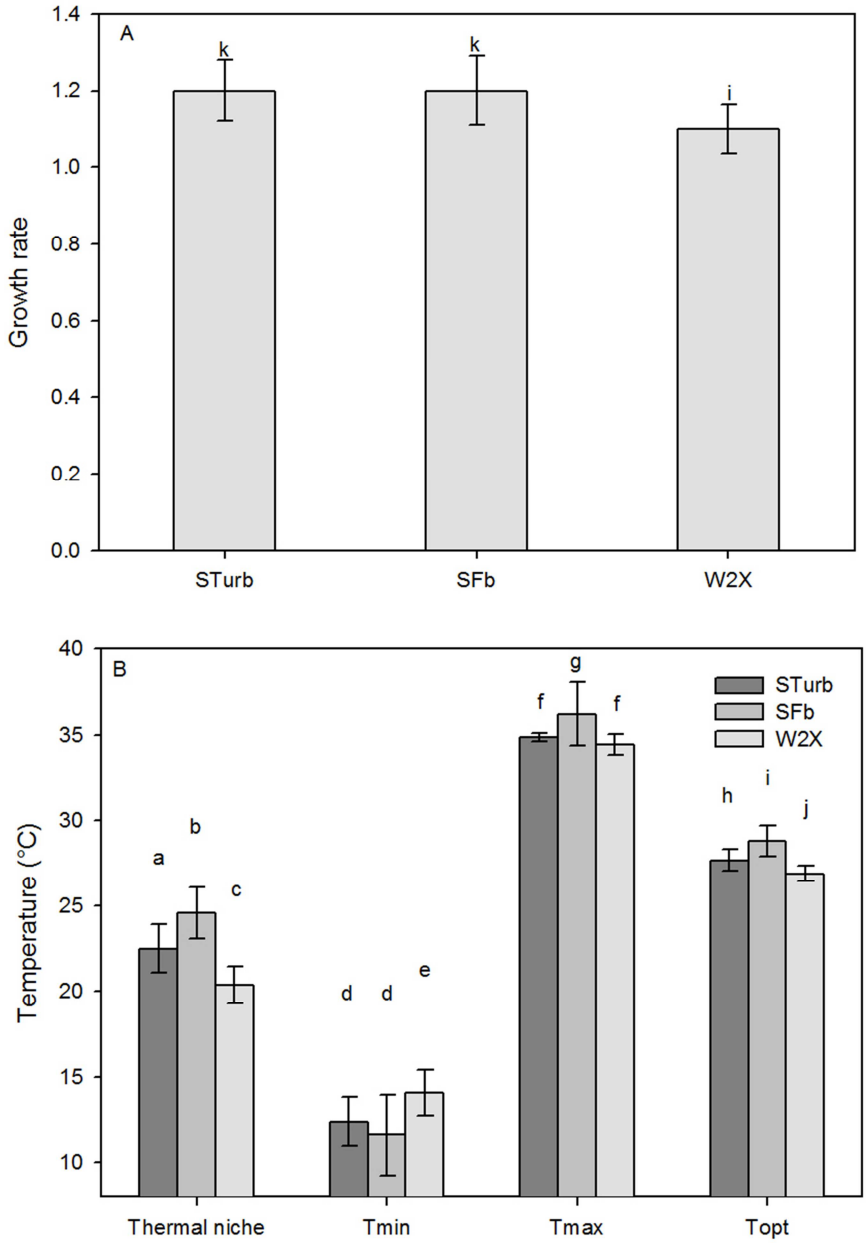


Figure F4 : comparison between the new strains and the initial W2X strain. A) Growth rate. B) Cardinal temperatures. Statistical difference at 1%

Microorganism adapt their optimal temperature to the average temperature (Bennett, Lenski, & Mittler, 1992). In microalgae, the adaptation to temperature was little investigated but their response seems the same. Mortain-Bertrand, Descolas-Gros, & Jupin, (1988), after an adaptation of three months at constant average temperatures of 3°C or 18°C, obtained the same growth rate in *Skeletonema costatum*. Huertas, Rouco, López-Rodas, & Costas, (2011) by adaptation to increasing average temperatures, for *Isochrysis galbana,* reached a growth at 35°C whereas the wild type did not grow. Our work highlighted that these mechanisms were much more complex and depend not only of the average temperature applied but also of the temperature ranges and dynamics perceived by microalgae.

Culturing mode impact. The new strains were obtained after 41 generations for fed-batch and 157 for turbidostat mode. Nevertheless, the average cell concentration during the selection in SFb was 2.3 time higher than in STurb ($8.7.10^5$ cell.mL^{-1}). The adaptation rate depend of the frequency of pre-selective mutants ($6.6.10^{-6}$ in *Isochrysis galbana* for high temperature resistant mutations; Costas et al., 2014) or the occurrences of adaptive mutations during the selection (10^{-5} – 10^{-7} mutation per cell per generation, Huertas et al., 2011). These two parameters are positively correlated with cell concentration justifying the high difference observed to the 2 culturing modes.

Evolution of the biochemical composition across the selection procedure. In *Tisochrisis lutea*, the starvation increased the total lipid content (Lacour, Sciandra, Talec, Mayzaud, & Bernard, 2012 ; Breuer, Lamers, Martens, Draaisma, & Wijffels, 2012). The W2X strain (CCAP 927/17), produces 2 times more neutral lipids (1.7 times more total lipids and for a higher ratio neutral/polar lipids) than the wild type (CCAP 927/14; Bougaran et al., 2012). After the thermal selection experiment, it was necessary to check the preservation of these highly interesting lipid properties. Total lipids content in the thermal-resistant strains measured at the end of the TIP experiment, were similar to W2X for the same starvation state (C:N ratio : 20.9, 17.7 and 17.9 mol:mol respectively for SFb, STurb and W2X; Fig. F5). The total lipids response to temperature is not clear in the literature (Hu et al., 2008). For

some species, total lipid increased with a decrease of temperature, but it was maximum at extreme temperature (Ras, Steyer, & Bernard, 2013 ; Gigova, Ivanova, Gacheva, Andreeva, & Furnadzhieva, 2012 ; Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borghi, 2009 ; Thompson, Guo, & Harrison, 1992). Other authors found a high link between total lipids content and growth rate (Roleda et al., 2013 ; Vítová et al., 2015 ; Guschina & Harwood, 2006). Nevertheless, only acclimation to temperature was studied without emphasis on the long term evolution which did not seem to affect total lipid. Total lipid hid a strong heterogeneity in lipids functionality. Fatty acid repartition was strongly altered, toward the polyunsaturated fatty acid due to lower triglycerides: polar lipids ratio (Tab. 14). This led to a decrease in monounsaturated fatty acid (- 10%) in favour to polyunsaturated fatty acid (+10 %) in the new strains. The highest difference was observed for the acid docosahexaenoic which the concentration was multiplied by 2 (10% and 5% of total fatty acids respectively for the new strains and the initial W2X strain).

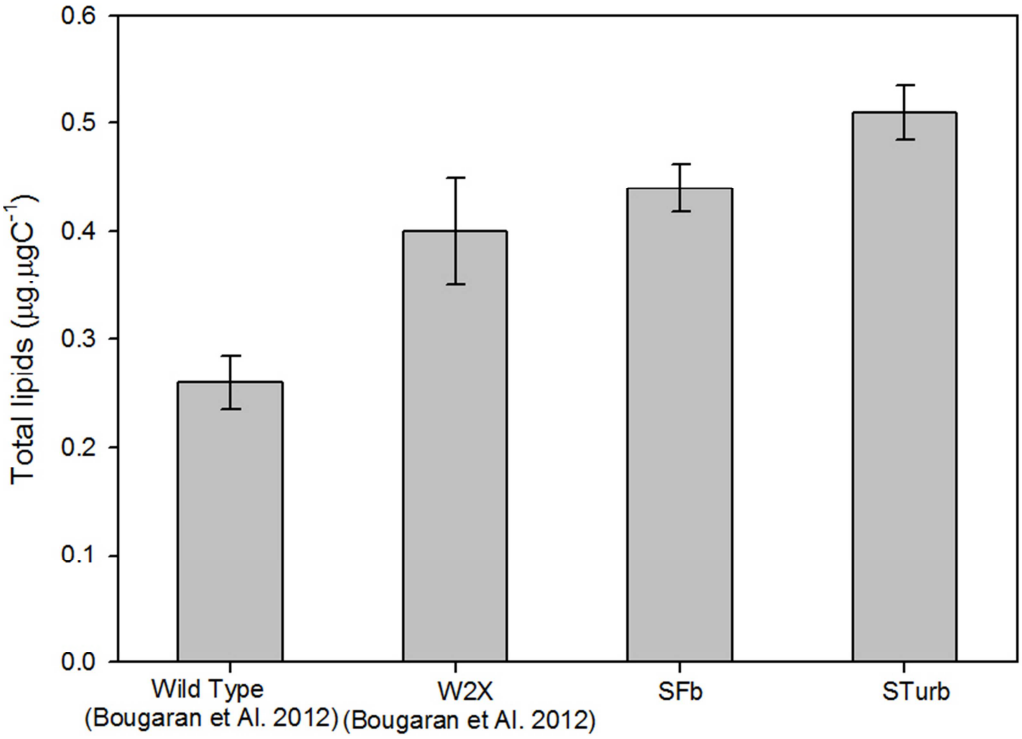


Figure F5 : comparison of the total lipid content by carbon unit between the new strains and the initial W2X strain.

	S-Turb	S-Turb (biological duplicate)	S-Fb	Tiso-S2M2 (bougaran 2012)	
Saturated					
C14:0	24.70	24.24	21.73	22.1	
C15:0	0.32	0.33	0.29		
C16:0	14.21	14.12	14.57	16.9	
C18:0	0.50	0.54	0.79	0.7	
Total	**40.47**	**39.93**	**38.071**	**39.9**	
Monoène					
C14:1n-5	0.55	0.63	0.45		
C16:1n-7	2.28	2.09	2.56	5.1	
C18:1n-9	21.71	22.99	22.99	28.9	
C18:1n-7	1.282	1.29	1.70	1.1	
Total	**27.60**	**29.23**	**29.87**	**37.9**	
Diène					
C16:2n-6	0.13	0.12	0.15	0.1	
C16:2n-4	0.31	0.31	0.41	0.2	
C18:2n-6	4.41	4.97	3.45	3.8	
C20:2n-6	0.064	0.081	0.13	0.1	
Triène					
C18:3n-3	3.81	3.891	4.63	3.1	
C20:3n-6	0.0531	0.049	0.079	0.1	
C20:3n-3	0.0351	0.031	0.092	0.2	
tétraène					
C18:4n-3	7.746	7.25	9.70	6.8	
C20:4n-6	0.072	0.10	0.089	0.1	
C20:4n-3	0.024	0.0031	0.020	0.3	
Pentaène					
C18:5n-3	0.65	0.59	0.76	0.4	
C20:5n-3	*0.24*	*0.23*	*0.21*	*0.2*	*EPA*
C22:5n-6	2.16	2.06	1.94	0.8	
C22:5n-3	0.095	0.14	0.33	0.9	
C22:6n-3	*11.39*	*10.21*	*9.32*	*5*	*DHA*
Total Poly	**31.92**	**30.83**	**32.06**	**22.4**	

Table 14 : fatty acids composition of the two new strains in comparison with the initial W2X strain (Bougaran et al., 2012)**.**

It was generally assumed that warmer temperature are more favorable for smaller cells (Daufresne, Lengfellner, & Sommer, 2009 ; Finkel et al., 2010). However, the average cell diameter did not show statistical differences along the selection process (ANOVA, p-value > 0.1 ; Fig. F6 A). The C:N ratio (mol: mol) is temperature and species dependent. In *T. lutea,* this ratio increases from 10 to 15°C, then stays constant (Thompson, Guo, & Harrison, 1992). During the selection procedure, this ratio gradually decreased (Fig. F6 B). The Chl a:C ratio is known to increase with temperature (Geider, 1987 ;Thompson, Guo, & Harrison, 1992) as a consequence of acclimation. During the selection procedure, it started to decrease after cycle 6 (Fig. F6 C). The physiological status of microalgae (chlorophyll content, C:N ratio; lipids) was cold adapted. Low temperatures are known to decrease enzyme activity and to rigidify membranes, reducing biomass growth. Adaptation may contribute to produce more enzymes to compensate (Devos, Ingouff, Loppes, & Matagne, 1998; Mortain-Bertrand et al., 1988) and more unsaturated fatty acid in order to maintain the membrane fluidity (Susan M Renaud, Zhou, & Parry, 1995 ; Susan M Renaud, Thinh, Lambrinidis, & Parry, 2002 ; Thompson, Guo, Harrison, & Whyte, 1992). On the other hand, high temperatures quickly denature protein and destabilize membranes leading to the cell death (Devos et al., 1998; Guschina & Harwood, 2006). Microalgae produce Heat Shock Proteins (Kobayashi et al., 2014) or saturated fatty acid to counterbalance these deleterious effects. These conclusions were obtained by studding physiology of extremophyll microalgae (cold or heat adapted organism). In our very specific adaptation protocol, cold-adaptation reasons were not clear. This response could confer more plasticity to the cell, useful in a highly changing environment.

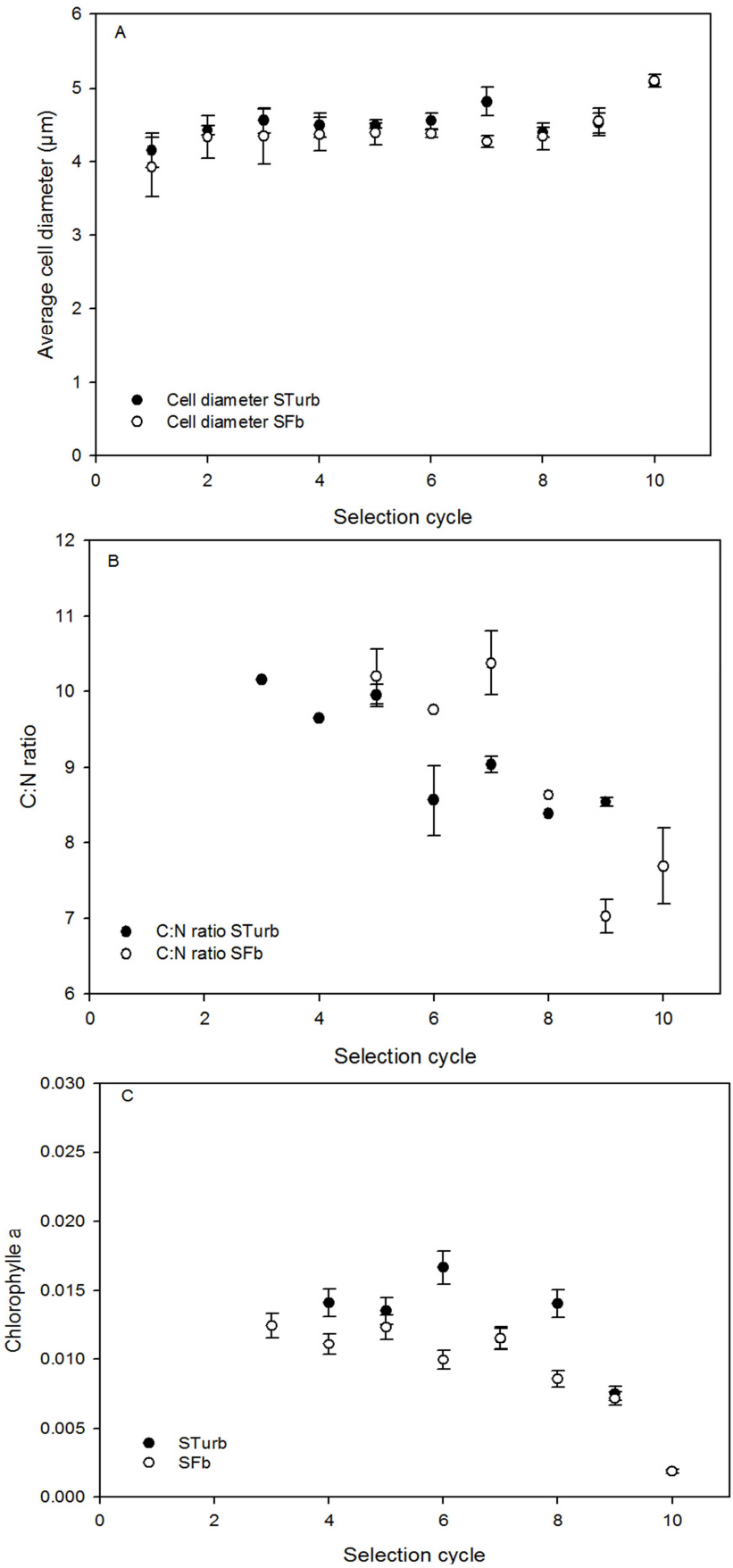


Figure F6 : evolution of three biological markers during the selection process at the first iteration of each cycle. A) Evolution of the cell diameter. B) C: N ratio C) Chl a: Carbon ratio

iv. Conclusion

This study highlights the efficiency of a new protocol of continuous pressure of selection to increase the thermal niche of *T. lutea* by modifying T_{min} and T_{max}. A modification of the thermal niche did not lead to a reduction in the growth rate but strong modifications in the physiological response were observed similarly to a 'cold-temperatures' adaptation. The amount of polar lipids and DHA was increased. This highly dynamical protocol had probably led to another interesting property, not analyzed yet, the microalgae capacity to acclimate quickly to temperature.

II. L'alternance nutrition-carence comme outil de sélection de souches plus grasses ?

i. Introduction : les pulses d'azote comme paramètre de sélection.

Les diatomées, l'un des groupes de microalgue les plus diversifiés, comptent entre 30 000 et 100 000 espèces. En considérant l'ensemble des études réalisées sur ce groupe, il apparaît qu'une carence en azote peut entrainer une augmentation de la teneur en lipides comprise entre 23% et 38% du poids sec, avec des valeurs extrêmes pouvant atteindre 60%. Les diatomées sont donc sensibles à la carence en azote qui semble constituer une voie intéressante pour sélectionner des microalgues ayant une productivité en lipides accrue.

Comme préalablement présenté dans l'état de l'art, le rapport $\frac{q_m}{q_0}$ est un indicateur du potentiel de production de lipides pour une espèce donnée. Plus ce rapport est élevé plus le potentiel de production de lipides est important. Un apport pulsé en azote pourrait favoriser les espèces capables, d'une part d'en stocker de grandes quantités en croissance non limitée (q_m élevé), et d'autre part de supporter des carences prolongées (q_0 faible). Malheureusement, peu de travaux existent sur les effets physiologiques d'un apport pulsé en nutriments.

Chez deux espèces de diatomées cultivées en chemostat, Quarmby et al. (1982) ont mis en évidence que l'apport pulsé en ammonium tend, en comparaison avec un apport continu, à augmenter la vitesse d'assimilation et le quota maximal d'azote (q_m), et s'accompagne d'une diminution de l'affinité pour le substrat et de la fixation de carbone. Cette expérience, bien que conduite sur une durée trop courte, est en fait un premier pas vers la sélection de souches à haute vitesse d'assimilation d'azote, et adaptées à des régimes nutritionnels variables.

Ces observations ont été confortées par les travaux d'Olsen et al. (1989). En soumettant deux espèces de microalgues, en compétition en chémostat, à des apports de phosphates continus ou pulsés, ces auteurs ont montré que l'espèce qui persiste en régime pulsé est caractérisée par des valeurs de q_m et de vitesses d'assimilation maximale de phosphates, élevées mais aussi par une affinité pour les phosphates plus faible. Enfin, Sommer (1985) a montré que des apports impulsionnels de nutriments, augmentant la variabilité de la disponibilité pour des ressources nutritives, entrainent une augmentation de la diversité génétique. En effet, lorsque les phosphates seuls ou les phosphates et la silice sont distribués par pulses, 6 et 9 espèces coexistent respectivement à l'équilibre, alors que pour une distribution continue des nutriments, seules deux espèces persistent. Cet auteur a également montré que l'adaptation à une nutrition pulsée est dépendante de l'espèce. Il distingue les espèces de microalgues qui présentent une forte affinité pour la ressource, et persistent uniquement lorsque celle-ci est apportée de manière continue, de celles qui possèdent une vitesse de fixation ou une capacité de stockage importante, et sont plus compétitives en cas de nutrition pulsée. Malheureusement, les fréquences des apports réalisés dans les travaux précédents étant trop élevées pour entrainer une carence prolongée des cellules, aucune information sur l'évolution du quota minimum q_o n'est disponible. A notre connaissance, Sciandra (1991) est le seul auteur à avoir étudié l'impact de pulses de nitrates de différentes fréquences sur la cinétique d'assimilation et la croissance des microalgues. Pour des apports discontinus mais quotidiens, la croissance reste inchangée par rapport à un apport continu. En revanche pour des apports plus espacés (2 jours, 3 jours), une affinité décroissante pour les nitrates, mais une vitesse maximale de fixation plus importante sont observées, se traduisant par une diminution du taux de division.

La sélection d'individus émergeants par le biais de la dynamique de la ressource n'est pas un sujet courant de la littérature. A notre connaissance, seuls Mooij et al. (2014) ont approché ces concepts. En appliquant un cycle lumineux jour/nuit parallèlement à une alternance absence/présence de

nitrates sur une communauté naturelle de microalgues, ils parviennent à réduire la diversité tout en augmentant la teneur en carbone de réserve des organismes persistants.

Dans l'optique d'augmenter le rapport $\frac{q_m}{q_0}$ moyen d'une population de microalgues, c'est-à-dire sa capacité à emmagasiner de la ressource nutritive, nous avons réalisé une culture en turbidostat alimentée par des pulses de nitrates de fréquence décroissante au cours de plusieurs semaines, pour augmenter progressivement la pression de sélection. Les souches obtenues, par rapport au phénotype initial, ont un contenu en lipides accru de 10%, mais un taux de croissance réduit.

ii. Matériels et méthodes

Protocole de sélection. La sélection a été réalisée dans les sélectiostats à partir d'une souche de *Cylindrotheca closterium* AC170 (partie B et C). Le protocole par augmentation progressive de la pression de sélection, tel que décrit dans la partie C, a été appliqué. Le pH était maintenu constant à 8.3, la température à 24°C et l'intensité lumineuse à 217 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, mesurée en continu, par une sonde PAR plane (SKYE ; SKL2620) à la sortie du réacteur, en mode turbidostat pour une densité cellulaire d'environ $5x10^5$ $cell.mL^{-1}$. Une injection pulsée de nutriments a été réalisée automatiquement grâce à une pompe péristaltique commandée par le logiciel Odin®. La concentration finale en nitrates dans le sélectiostat après le pulse a été choisie pour que cet élément soit toujours limitant (Tab. 15). Au cours du cycle 1, la concentration en nitrates était toujours non limitante dans le milieu. Les cycles suivants, par des fréquences d'apport plus faibles, ont conduit à l'épuisement de la ressource. Les nutriments concentrés, utilisés pour la réalisation des pulses, étaient préalablement acidifiés (pH = 2) pour éviter la précipitation de la silice avec les métaux traces.

Le taux de croissance moyen pour un cycle de sélection était calculé sur la durée de 4 pulses consécutifs en se basant sur les valeurs de la turbidité et de la dilution. Si le taux de croissance était supérieur à 0 j^{-1}, le cycle de sélection suivant était commencé, correspondant à une diminution de la fréquence des pulses, soit une augmentation du temps de carence. La cinétique de prise des nitrates a été suivie au moins une fois par cycle après un des pulses.

Jours après le début de la sélection	Cycle	Fréquence des pulses (j^{-1})	Période des pulses (j)	Concentration en nitrates dans le sélectiostat après le pulse ($\mu mol.L^{-1}$)
1,0	1	∞	0 (apport continu)	100
2,1	2	2	0.5	100
15,1	3	1	1	200
31,0	4	0,7	1.5	300
64,1	5	0,5	2	400
88,1	6	0,4	2.5	500
93,1	7	0,3	3	500
99,1	8	0,25	4	500
107,1	9	0,2	5	500
127,1	10	0,14	7	500
168,9	13	0,1	10	500

Table 15 : récapitulatif des conditions appliquées au cours des différents cycles de sélection

Optimisation du protocole Nile red pour le suivi des lipides de réserve. La fluorescence du Nile red a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre Cary Eclipse (Varian). Le couple excitation/émission de 520/580 nm a été choisi pour suivre l'évolution des lipides de réserve au sein des cellules (Alonzo & Mayzaud, 1999). L'utilisation du Nile red comme marqueur de la concentration en triglycérides doit être optimisée de façon très rigoureuse pour chaque espèce considérée (Rumin et al., 2015). En particulier, une étude préliminaire a permis de déterminer que des concentrations de microalgues de 1,5 10^5 $cell.mL^{-1}$ et de Nile red de 0,25 $\mu g.mL^{-1}$ injectées à 1 µl par mL de culture, ainsi qu'une durée d'incubation de 2 min à l'obscurité en présence du marqueur, étaient optimales pour le marquage de *C. closterium*.

Comparaison des souches initiales et finales. A l'issue des 180 jours de sélection, les populations sauvages WT et adaptées SA1 et SA2 ont été maintenues en batch dans des photobioréacteurs cylindriques et dans des conditions de croissance constantes: pH de 8,2, température de 24°C et l'intensité lumineuse à 340 ± 2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ mesurée par une sonde PAR sphérique dans l'air, au centre du photobioréacteur. La cinétique de croissance et d'accumulation des lipides de chaque duplicats a été suivie par des comptages au HIAC et un marquage au Nile red respectivement.

iii. Résultats

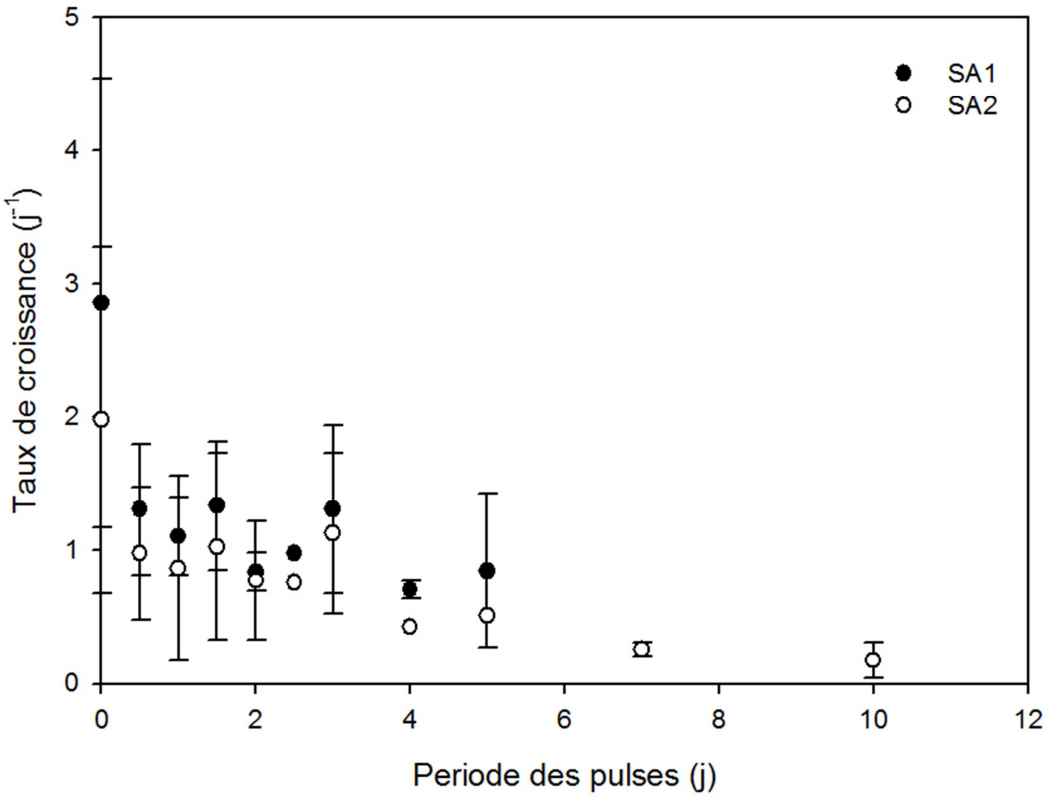


Figure F7 : évolution des taux de croissance moyens au cours de la sélection en fonction de la période des pulses.

Dérive des souches au cours de la sélection. Durant le cycle 1, lorsque l'apport en nitrates dans le milieu est tel que sa concentration est strictement supérieure à 0 µmol.L^{-1}, un taux de croissance important de 2.5 j^{-1} est mesuré (Fig. F7). Au cours du cycle 2, la période des pulses devient suffisante pour entrainer une situation de carence qui, bien que transitoire, entraine une réduction par 2 du taux de croissance. Ensuite, pour les périodes de pulses restant inférieures à 5 jours, le taux de croissance demeure faiblement impacté. Des apports encore plus espacés d'azote (période ≥ 4 jours), entrainent une décroissance progressive du taux de croissance qui atteint une valeur de 0,2 j^{-1} à l'arrêt de l'expérience. L'imprécision des mesures, qui se traduit par un écart type relativement élevé sur le taux de croissance, est due à des instabilités, sur la période du logiciel de pilotage. Dans les faits, l'algorithme n'étant pas tout à fait opérationnel, le contrôle n'était pas synchrone avec l'évolution de la turbidité à l'échelle de la journée, entrainant des retards à la dilution ou au contraire des sur-dilutions.

Les mesures de nitrates effectuées pour suivre leur consommation, consécutivement aux pulses, n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives sur les taux de fixation (ANOVA, p-value > 0.01, Fig. F8)

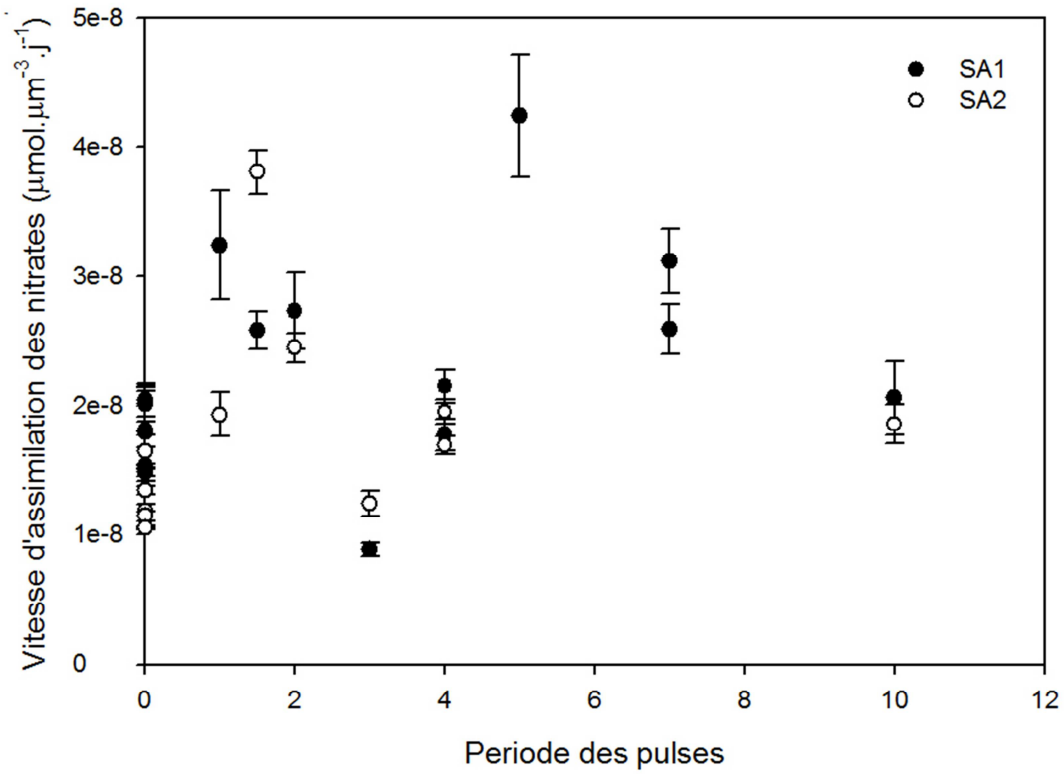


Figure F8 : évolution des vitesses d'assimilation des nitrates au cours de la sélection en fonction de la période des pulses.

Evolution de la souche. La comparaison des taux de croissance mesurés avant et après application du protocole de sélection montre clairement que le taux de division du phénotype sauvage est supérieur de 57 et 41% à celui des nouvelles souches SA1 et SA2 respectivement. Cette différence est plus faible (26 et 12%) pour les taux de croissance mesurés à partir de la variation de la biomasse (biovolume ; Fig. F9). En revanche, la fluorescence du Nile red des souches SA1 et SA2 (fluorescence par unité de volume cellulaire, moyennée sur la durée de la culture en batch) excède de 12% celle de la souche sauvage (Fig. F10).

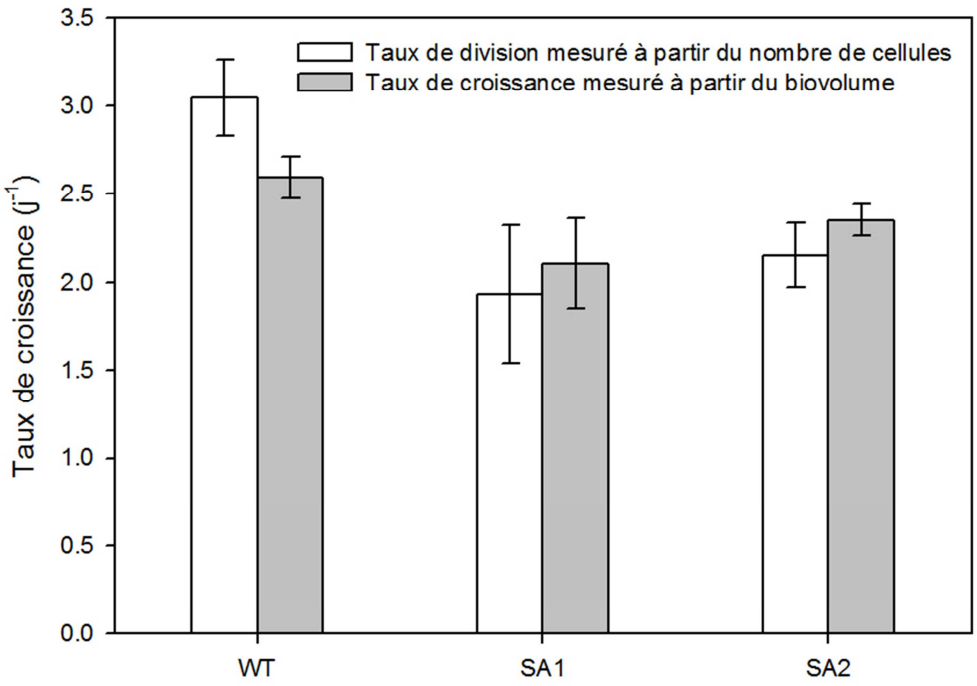


Figure F9 : comparaison des souches en conditions normalisées. Taux de division cellulaire mesuré à partir de l'évolution de la concentration cellulaire et taux de croissance de la biomasse mesuré à partir de l'évolution du biovolume.

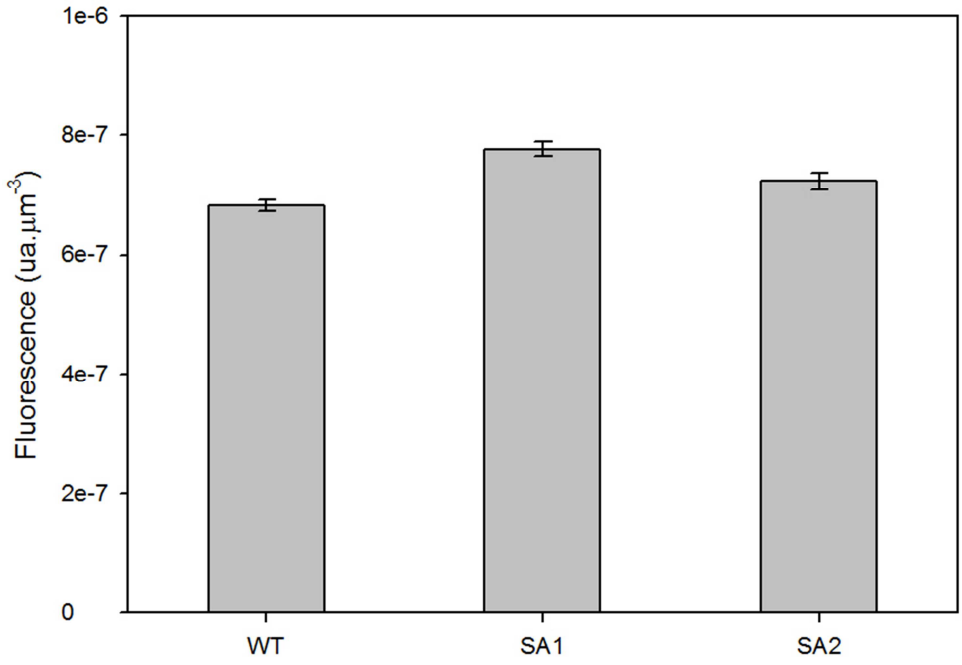


Figure F10 : comparaison des souches en conditions normalisées. Comparaison qualitative du contenu en triglycérides par l'utilisation d'un marqueur, le Nile red.

iv. Discussion

Evolution des souches au cours de la sélection. Sciandra (1991) a observé que le taux de croissance de *Prorocentrum minimum* commence à être affecté par des apports discrets d'azote pour des périodes supérieures à 1 jour. Chez *C. closterium*, deux types de seuil semblent avoir été mis en évidence. Le premier est atteint dès que l'apport en nitrates devient discontinu, donc juste après le cycle 1 et à partir du cycle 2 (période des apports de 0,5 jour). Cette limite distingue les conditions où les nitrates sont toujours disponibles dans le milieu de culture de celles où leur concentration s'annule périodiquement, ne serait-ce que pendant une courte période. Le deuxième seuil se situe plus tardivement, à partir du cycle de sélection 8 (période des apports : 4 jours ; Fig. F7). Il marque probablement la transition d'un état physiologique vers un autre. Le premier état, résulte d'une limitation azotée: les temps de carence étant trop courts pour que l'algue épuise l'intégralité de ses réserves azotées, son quota en azote reste toujours supérieur à sa valeur minimale ($q>q_0$). Le second état s'apparente davantage à une carence: les durées sans nitrate étaient suffisamment prolongées pour que l'algue épuise ses réserves, son quota en azote diminue jusqu'à son niveau de subsistance q_0.

L'analyse du carbone et de l'azote particulaires permettra de confirmer cette hypothèse. Pour des cycles de sélection dont les périodes d'impulsions varient entre 0 et 4 jours, les cellules ne subissent pas réellement de stress (taux de croissance faiblement impacté), les phénomènes observés sont principalement de l'ordre de l'acclimatation. La sélection, telle que nous l'avons définie, prend donc effet relativement tard dans cette expérience, et il est probable que seuls les 4 derniers cycles ont eu un effet. Cette sélection tardive se retrouve dans l'absence de modification de la vitesse d'absorption des nitrates (Fig. F8), contrairement aux observations de Sciandra (1991).

Validation des souches et estimation de leur teneur en lipides. La sélection réalisée dans cette expérience, bien que mise en place tardivement, semble cependant avoir modifié la population initiale de manière importante. En effet, le taux de division des souches sélectionnées est

significativement réduit (Fig. F9). Ce résultat va à l'encontre des prédictions des modèles mathématiques, selon lesquelles les individus se divisant le plus rapidement dans une culture continue persistent au détriment des autres (Masci et al., 2008). Une des conditions nécessaire à cette hypothèse, est l'homogénéité de la culture. Si les microalgues sont à la fois en suspension et attachées en biofilm, la sélection n'opère que sur les individus présents dans la phase liquide (les seuls à être évacués par le trop-plein), alors que les individus qui composent le biofilm ne sont pas éliminés, et continuent d'enrichir le milieu avec leurs génotypes. Les diatomées et particulièrement *C. closterium*, sont connues pour leur capacité à former des biofilms, qui leur confèrent une résistance accrue aux stress abiotiques (Steele, Franklin, & Underwood, 2014). Malgré un système anti-biofilm et de nombreux nettoyages, un biofilm s'installait rapidement, perturbant probablement le principe de sélection propre aux cultures continues. Ce biais pourrait avoir conduit à la sélection d'individus à la croissance plus lente en milieu liquide, mais capables de former rapidement des biofilms leur permettant de résister aux épisodes stressants de carence en azote. Des analyses de la modification des capacités d'excrétion du carbone apporteraient une réponse à cette hypothèse.

La teneur moyenne en lipides, mesurée sur la durée des cultures en batch, est 12% supérieure dans les souches sélectionnées par rapport à la souche sauvage. Bien que faible, cette différence est néanmoins significative (test de Student, erreur à 1%), particulièrement en considérant que la sélection n'a eu lieu que très tardivement et donc sur une période assez restreinte (70 jours seulement). Deux hypothèses peuvent expliquer ce gain en triglycérides. Selon la première, il serait la conséquence indirecte d'une croissance réduite, et non la conséquence directe des pulses d'azote. Il est connu que l'application d'un stress physiologique (nutriments, lumière, etc…), entrainant une réduction du taux de croissance, conduit généralement à une augmentation des lipides de réserve (voir chapitre B). Cette réponse d'acclimatation, peut se transposer à une échelle évolutive. Les microalgues ayant d'importantes réserves en triglycérides poussent généralement moins vite mais restent compétitives dans des environnements variables et transitoires. Cette hypothèse n'a pas été traitée explicitement dans la littérature, et est même inexacte en considérant les lipides totaux

(Griffiths et al. 2012 ; Griffiths & Harrison 2009). Néanmoins, les dynamiques des lipides totaux et de réserve ne peuvent être aussi simplement confondues. Certaines études montrent que la proportion d'acides gras saturés, caractéristiques des lipides de réserve, est négativement corrélée avec le taux de croissance moyen d'une espèce (Griffiths et al. 2012 ; Hu et al. 2008 ; Fig. F11). Le même lien peut donc probablement être retrouvé entre taux de croissance et lipides de réserve, pouvant expliquer nos résultats.

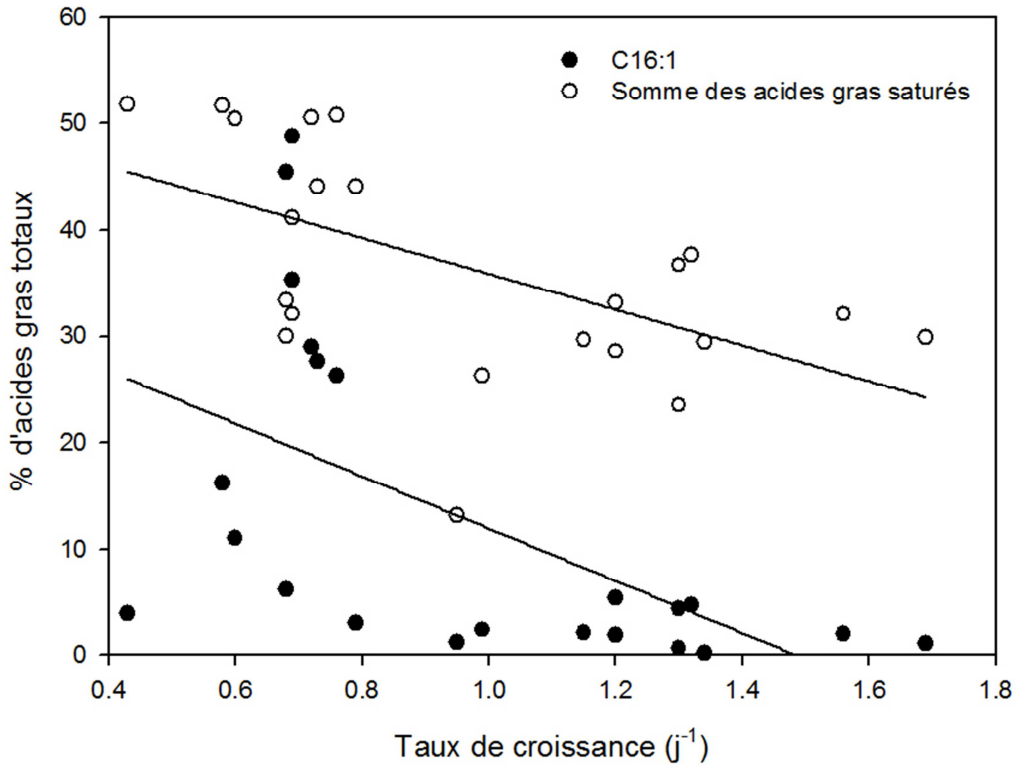


Figure F11 : relation entre acides gras saturés et mono-insaturés et taux de croissance (Griffiths & Harrison, 2009).

Selon la seconde hypothèse, la sélection, comme évoquée au début de ce chapitre, a bien été réalisée. Des souches de microalgues ayant un rapport $\frac{q_m}{q_0}$ augmenté ont été obtenues, menant à une augmentation de la concentration en lipides, cette augmentation ayant entrainé une diminution du taux de croissance. Il est en effet assez connu que le gain d'une fonction donnée entraine, en général, une perte sur une autre fonction, c'est le trade-off évolutif (Jasmin et al., 2012). Des analyses complémentaires de l'évolution des quotas azotés doivent donc être réalisées pour vérifier ces hypothèses.

v. Conclusions

Ces résultats mettent en évidence à quel point la sélection par pression continue est un processus complexe, délicat à mettre en œuvre, et qui demande donc une parfaite maitrise des conditions opératoires, sans laquelle des génotypes non-souhaités peuvent être finalement sélectionnés. Une sélection a bien été opérée, mais qui a paradoxalement produit des organismes ayant d'un côté un taux de croissance réduit (effet non recherché), et de l'autre des teneurs en lipides accrues (effet recherché). L'analyse complète des échantillons récoltés au cours de cette expérience n'a pas pu être menée à son terme, faute de temps, de sorte qu'il nous est difficile de statuer sur les mécanismes réellement impliqués dans le processus de cette sélection. Cette analyse sera cependant effectuée ultérieurement. Enfin, pour les diatomées, il est possible que la carence en azote ne soit pas la plus adaptée pour stimuler la production de lipides. Les effets de la carence en silice sur la synthèse des lipides pourraient être bien plus marqués en fonction des espèces et conduire à des résultats plus spectaculaires (Griffiths & Harrison, 2009).

III. Transparence accrue pour une biomasse finale accrue ?

i. Introduction : le contenu en pigment, fonction de l'intensité lumineuse

L'appareil photosynthétique capte les photons à l'aide d'antennes collectrices composées de différents pigments. Les pigments primaires vont transmettre l'énergie lumineuse vers le centre réactionnel où, une molécule de chlorophylle va initier la chaine d'oxydoréduction menant à la production d'ATP : c'est le quenching photochimique (photochimical quenching) ou phase claire de la photosynthèse. Les pigments accessoires interviennent pour capter des photons en dehors des domaines d'absorption de la chlorophylle. Ils contribuent également à la protection des unités photosynthétiques. En cas de trop fortes irradiations, ils dissipent l'énergie excédentaire sous forme de chaleur : c'est le quenching non photochimique (non photochemical quenching ; NPQ). Une fraction plus faible de l'énergie est également dissipée par fluorescence (1-2 % de l'énergie dissipée). Lorsque la lumière est limitante, comme souvent dans le milieu naturel, ces antennes photosynthétiques atteignent leur taille maximale. Dans ces conditions, les individus ayant les plus grandes antennes sont favorisés, ils captent mieux la lumière et créent de l'ombrage, limitant la croissance des autres individus.

Dans le cadre d'une culture à grande échelle, c'est la population globale dont il faut optimiser la croissance et non d'un seul individu. Une forte pigmentation cellulaire est contre-productive à cette échelle. Il existe donc un réel intérêt à produire des souches dont la teneur en chlorophylle est réduite et la transparence accrue pour accroitre la productivité des cultures denses (Molina-Grima et al., 1996). Jusqu'à maintenant, seules des méthodes utilisant des OGM ou des protocoles de mutation-sélection ont été utilisés, avec comme effets collatéraux, une croissance dégradée (Melis, 2009). Les protocoles de sélection par pression continue, développés au cours de cette thèse, permettent également d'atteindre ces objectifs en utilisant une caractéristique propre aux organismes photosynthétiques, leur importante capacité de photo-acclimatation. Ce phénomène,

bien étudié chez les végétaux, est l'ensemble des modifications biophysiques, biochimiques, morphologiques et physiologiques observées suite à une modification des conditions d'éclairement (partie B ; MacIntyre et al. 2002).

L'expérience a consisté à exercer régulièrement un stress lumineux engendrant une photoinhibition périodique. Le signal lumineux carré, appliqué sur les cultures, est une succession de phases de fortes intensités et d'obscurité. L'amplitude croissance de ce signal, au cours des semaines de sélection permet de maintenir en permanence une forte pression de sélection. Les microalgues s'acclimatent à l'intensité lumineuse moyenne perçue (Combe et al., 2015). Il est donc essentiel d'appliquer une lumière moyenne faible, pour forcer les microalgues à augmenter leur pigmentation et leur sensibilité à la photoinhibition. En effet, malgré la lumière moyenne réduite, elles subissent ponctuellement de très fortes intensités lumineuses. Les génotypes possédant de plus grandes antennes vont être davantage photoinhibés et disparaitront progressivement du turbidostat. Les autres génotypes, avec des antennes réduites, auront un avantage compétitif, et vont progressivement dominer la population. Une nouvelle souche d'algues plus transparentes va émerger.

Une analyse des performances de la population est régulièrement réalisée dans un système de culture à part, pour suivre l'évolution du processus sélection. Dans ce système indépendant, les conditions de cultures sont normalisées et constantes, en particulier l'intensité lumineuse. Par ailleurs, pour évaluer l'efficacité photosynthétique des populations au cours du temps, un PAM (Pulse Amplitude Modulation) est utilisé. Cet appareil mesure la réponse de la fluorescence du photosystème II à divers stimuli lumineux et fournit des indications sur l'efficacité de la photosynthèse, l'intensité de lumière saturante, le maximum du taux de photosynthèse (Maxwell & Johnson, 2000). Enfin, une expérience finale de comparaison des productivités des souches adaptées et sauvages a permis de quantifier le gain de productivité en réacteur à haute densité.

Après 130 jours de sélection, deux souches de microalgues aux teneurs en pigments réduites ont été obtenues. La productivité de ces souches, en culture dense, s'avère être quasiment le double de celle du phénotype initial.

ii. Matériel et méthode

Cultures. La souche *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/17) modifiée par l'IFREMER de Nantes a été utilisée comme 'souche sauvage' et nommée W2X (Bougaran et al., 2012).

Caractérisation de l'acclimatation hautes/faibles intensités lumineuses. Avant la phase de sélection, une étude des cinétiques d'acclimatation aux hautes puis faibles intensités a été réalisée en mode turbidostat sur la souche initiale W2X. Les sélectiostats ont été utilisés en dupliquât. L'intensité lumineuse des cultures acclimatées depuis 2 jours à 130 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, est passée à 700 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ pendant 3 jours. Puis, l'intensité lumineuse est diminuée jusqu'à 200 $\mu mol\ m^{-2}.s^{-1}$ pour étudier, pendant 6 jours, l'acclimatation des microalgues à faible intensité lumineuse.

Protocole de sélection dirigée. La sélection a été réalisée en dupliquât dans les sélectiostats. Ces systèmes, fiables, ont été utilisés en mode turbidostat pendant plus de 130 jours, permettant la production de deux souches adaptées SA1 et SA4 (Fig. F14). Le pH est contrôlé à 8,2 et la température à 28,2°C. Le montage, la stérilisation et l'inoculation de ces systèmes sont décrits dans la partie C. Des créneaux d'intensité lumineuse forte (I_{HL}) et nulle (I_{LL}) sont appliqués à haute fréquence (période d'environ 2 heures). L'accroissement de la pression de sélection se fait en augmentant la valeur de l'intensité lumineuse (I_{HL}) et en diminuant sa durée pour conserver une intensité lumineuse moyenne (I_m) faible. La valeur I_{HL} - I_m, qui caractérise la pression de sélection, augmente donc progressivement au cours de la sélection, maintenant une très forte pression sur les cultures (Tab. 16). Le prélèvement des cultures, pour en analyser les caractéristiques physiologiques, est réalisé une fois par semaine, juste avant qu'une partie de la culture ne soit transférée dans les photobioréacteurs de suivi en conditions normalisées.

	I_{HL} ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	I_m ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	I_{HL}-I_m ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	Temps haute intensité lumineuse (s)	Temps faible intensité lumineuse (s)	Nombre de créneaux en 2 semaines
Cycle 1	800	200	600	1800	3600	16
Cycle 2	1000	300	700	2160	5040	12
Cycle 3	1200	350	850	2100	5100	12
Cycle 4	1400	350	1050	1800	5400	12
Cycle 5	1600	400	1200	1800	5400	12

Table 16 : Récapitulatif des caractéristiques du signal créneau de lumière appliqué aux cultures, au cours de la sélection.

Protocole de suivi de la dérive des souches en conditions normalisées. Des photobioréacteurs cylindriques en verre, de deux litres, ont été utilisés pour le suivi de la dérive des souches (Fig. F12). Une fois par semaine, 200 mL de culture y sont transférés depuis les sélectiostats, puis dilués par 2 avec du milieu de culture frais et stérile. Du milieu nutritif est ajouté pour une concentration finale en nutriment dans l'enceinte de culture, équivalente au f/2 (Guillard, 1975). La culture est conduite en batch, l'intensité lumineuse incidente est fixée à 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, le pH contrôlé à 8,3 et la température fixée à 28,2°C. 4 jours plus tard, la biomasse finale, le taux de croissance, le contenu en pigments ainsi que l'efficacité de la photosynthèse sont mesués dans la phase pseudo-stationnaire limitée par la lumière.

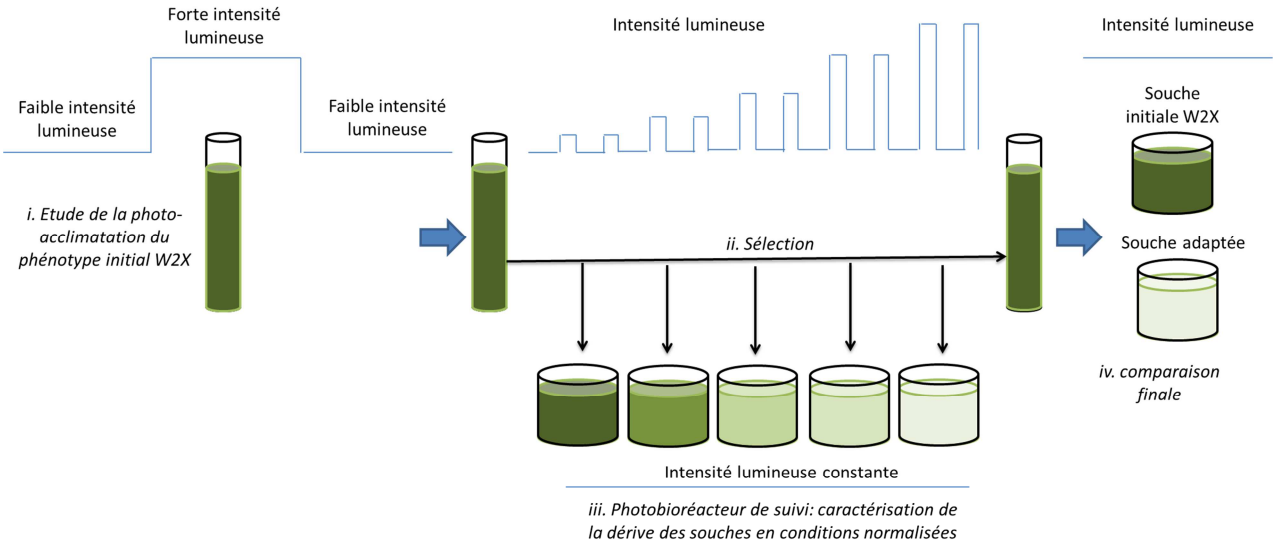


Figure F12 : synoptique des différents types de culture réalisés au cours de l'expérience de sélection

Comparaison finale des souches. Une expérience finale est menée pour comparer le phénotype initial (W2X) avec les souches adaptées à l'issue de la sélection. Les cultures sont conduites en batch, dans les sélectiostats et régulièrement suppléées par des nutriments pour éviter les carences et optimiser la production de biomasse. Les paramètres de culture sont constants et fixés à 130 ± 12 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ pour l'intensité lumineuse mesurée à la sortie des réacteurs vides, 8,2 pour le pH et 28,2°C pour la température. Après une acclimatation de 5 jours à ces conditions, une dilution est réalisée puis, le suivi de l'évolution de la culture est mis en place jusqu'à ce que les cultures atteignent une phase pseudo-stationnaire, limitée par la lumière.

Suivi du taux de croissance. Pour les cultures en continu, les taux de croissance moyens sont calculés à partir de l'enregistrement du taux de dilution et de la turbidité. Un compteur de particules (HIAC) a permis la calibration deux fois par semaine, de la sonde de turbidité afin de s'assurer de son bon fonctionnement. Dans les photobioréacteurs de suivi, en conditions normalisées ainsi que pour l'expérience finale de comparaison des souches, ces comptages ont permis d'estimer la biomasse et son taux de croissance.

Estimation de la teneur en pigments. L'évolution de la concentration en pigments dans les sélectiostats et dans les photobioréacteurs de suivi en conditions normalisées a été suivie par trois méthodes distinctes.

Mesure de la fluorescence in vivo. Une dilution pour une concentration finale de 50 000 cell.mL^{-1} est réalisée, puis les cellules sont acclimatées 5 min dans le noir. Les cultures diluées sont excitées à 440 et 465 nm dans une cuve en quartz de 4 mL. Une lecture du maximum d'émission de fluorescence à 680 et 682 nm permet une estimation relative des contenus en chlorophylle a et b respectivement (spectrofluorimètre Eclipse CARY).

Mesure du contenu en chlorophylle a *et de la section efficace.* Après une mesure en triplicat sur un blanc d'eau de mer filtrée, une mesure de l'absorbance des cultures est réalisée sur tout le spectre visible à une concentration de 9,10^{5} et 1,10^{6} cellules.mL^{-1} respectivement pour les cultures en sélectiostat et en photobioréacteur de suivi en conditions normalisées (Varian, DMS100). Le calcul de la section efficace (σ_a) et de la teneur en chlorophylle a est réalisé après correction du 'packaging effect' (Bricaud et al. 1983 ; Le Floc'h et al. 2003).

Mesure de la concentration en pigments par extraction à l'acétone. Cette méthode de dosage, développée dans la partie C, consiste à extraire les pigments de la biomasse préalablement filtrée dans un solvant adapté, l'acétone. Par lecture de l'absorbance à 440, 644.8, 661.6 nm et la résolution du système de Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987), une estimation quantitative des chlorophylles a et b et des caroténoïdes totaux est réalisée.

Suivi des propriétés photosynthétiques. Après une dilution pour une concentration finale de 50 000 cell.mL^{-1}, les cellules sont acclimatées 5 min au noir puis placées dans une cuve en quartz de 4 mL dans le PAM (Multicolor PAM ; walz Effeltrich Germany). Après application d'une lumière infrarouge pendant 60 sec, l'intensité de la lumière de mesure ainsi que le gain de l'appareil sont augmentés séquentiellement pour obtenir une valeur de la fluorescence, en l'absence de lumière actinique F_0 autour de 0,2 u.a. La valeur de l'intensité lumineuse choisie, doit-être assez élevée pour déclencher

une fluorescence supérieure au bruit de fond tout en restant non actinique. Des pulses photosaturants permettent ensuite de mesurer le maximum de fluorescence (F^0_m) et le maximum de fluorescence à la lumière F_m' des cultures (Maxwell & Johnson, 2000). Ces paramètres permettront d'estimer l'efficacité photochimique du photosystème II (ϕ_{II}) ainsi que l'efficacité photochimique maximale ($\frac{F_v}{F_m^0}$).

$$\phi_{II} = \frac{F'_m - F}{F'_m}$$

$$\frac{F_v}{F_m^0} = \frac{F_m^0 - F_0}{F_m^0}$$

Une 'Rapid Light curve' est réalisée en mesurant le taux de transport des électrons (ETR ; Electron transport Rate) à différentes intensités lumineuses actiniques (0 à 1568 µmol.m^{-2}.s^{-1}).

$$ETR = PAR * \phi II * Facteur\ ETR$$

L'ajustement du modèle de Platt & Gallegos (1980) est alors utilisé pour estimer le taux de transport maximal d'électrons pour le photosystème II (ETR_{max}) ainsi que l'intensité de lumière saturante (I_s) et l'efficacité quantique de la photosynthèse (α).

Suivi du carbone et de l'azote particulaires. Cf. partie C

iii. Résultats

Paramètres photosynthétiques de la souche W2X. L'expérience d'acclimatation consistant à passer de faibles à fortes, puis de fortes à faibles intensités lumineuses a permis de caractériser les différents paramètres de réponse à la lumière de la souche initiale W2X (Tab. 17). Dans cette étude, le passage de faibles à fortes intensités lumineuses entraine, une diminution du taux de croissance moyen, du contenu en chlorophylle a, de l'efficacité photochimique maximale ainsi que de l'efficacité quantique de la photosynthèse. En revanche, l'intensité photo-saturante augmente, ainsi que le taux de photosynthèse maximal. Une étude plus minutieuse de l'évolution du taux de croissance journalier met en évidence que le passage de faibles à fortes intensités lumineuses entraine dans un premier temps une forte augmentation du taux de croissance (1 jour), avant la mise en place d'une décroissance. De même, le passage de fortes à faibles intensités lumineuses entraine une diminution du taux de croissance, avant que ce dernier n'augmente de nouveau (Fig. F13).

	Faible intensité lumineuse	Forte intensité lumineuse	Ratio faible/forte intensité lumineuse
Intensité lumineuse (µmol photon.m^{-2}.s^{-1})	200	700	0,29
Taux de croissance (j^{-1})	1,24 ± 0,08	0,74 ± 0,040	1,68
Chlorophylle a (pg.$cell^{-1}$)	0,35 ± 0,028	0,22 ± 0,037	1,59
F_v/F_m	0,60 ± 0,0088	0,37 ± 0,029	1,62
Intensité photosaturante (I_s)	73 ± 6	123 ± 14	0,59
alpha	0,22 ± 0,023	0,16 ± 0,0033	1,38
ETR_{max}	16,0 ± 1,1	19,3 ± 2,0	0,83

Table 17 : récapitulatif des principaux paramètres de la photosynthèse à faibles et fortes intensités lumineuses en conditions d'acclimatation. Chaque valeur représente la moyenne de n ≥ 4 points ± écart-type, mesurée sur 2 réacteurs indépendants.

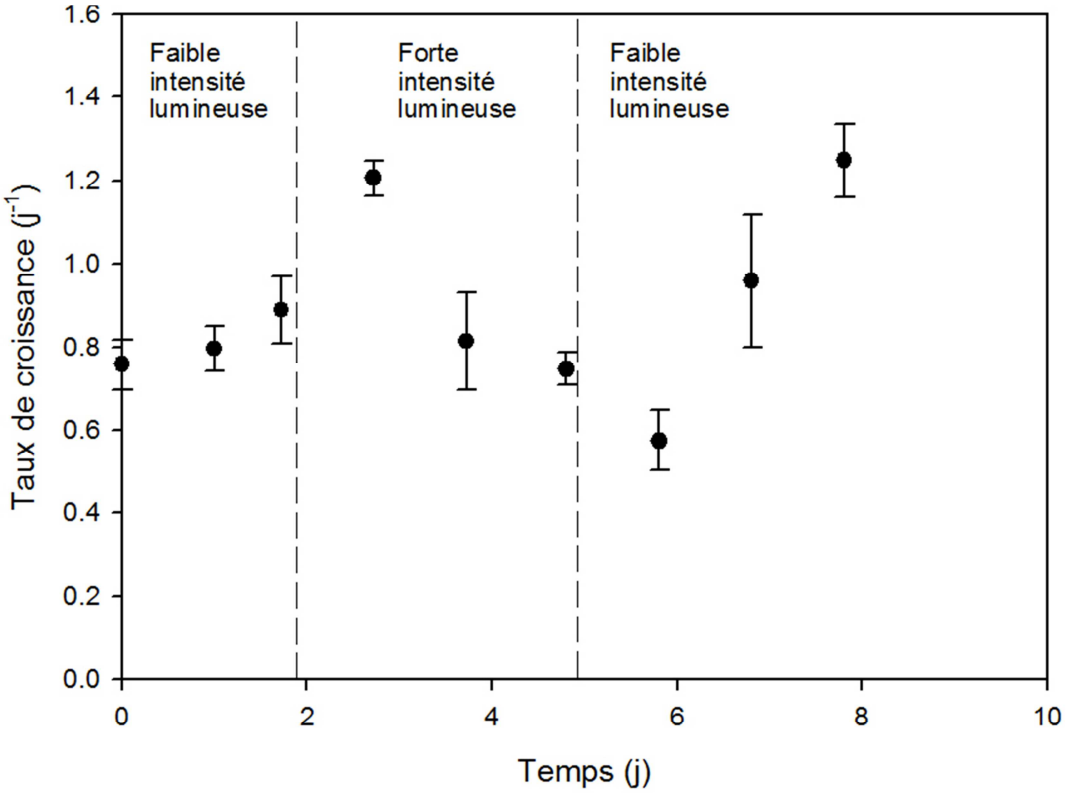


Figure F 13 : évolution du taux de croissance lors de l'acclimatation de la souche initiale W2X à différentes intensités lumineuses.

Evolution des paramètres photosynthétiques, dans les sélectiostats, au cours de la sélection. Le contenu en chlorophylle a des cultures, en sélectiostats (conditions d'éclairement variables en fonction du cycle de sélection), est constant. En revanche, l'efficacité photochimique maximale ($\frac{F_v}{F_m^0}$) décroit avec le temps (p-value < 0.005, n = 20), alors que les caroténoïdes totaux augmentent après une phase stationnaire (Fig. F14 et Fig. F15, A).

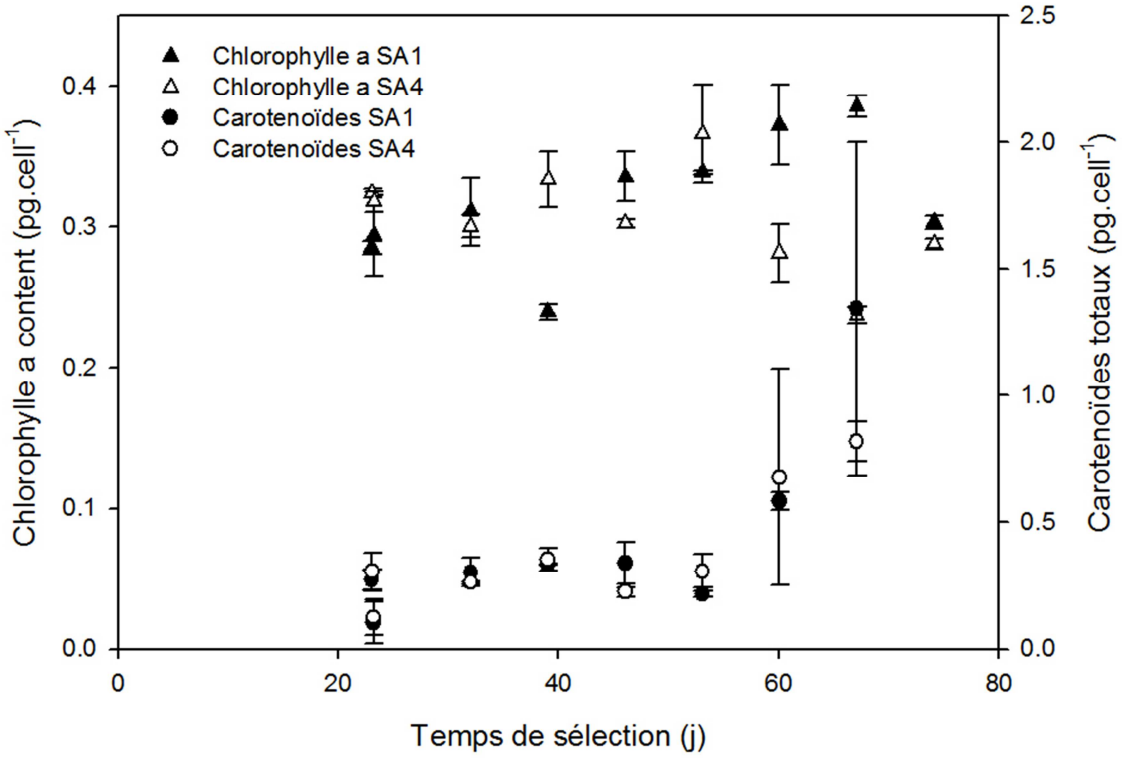


Figure F14 : évolution de la teneur en pigments, dans les cultures en sélectiostats.

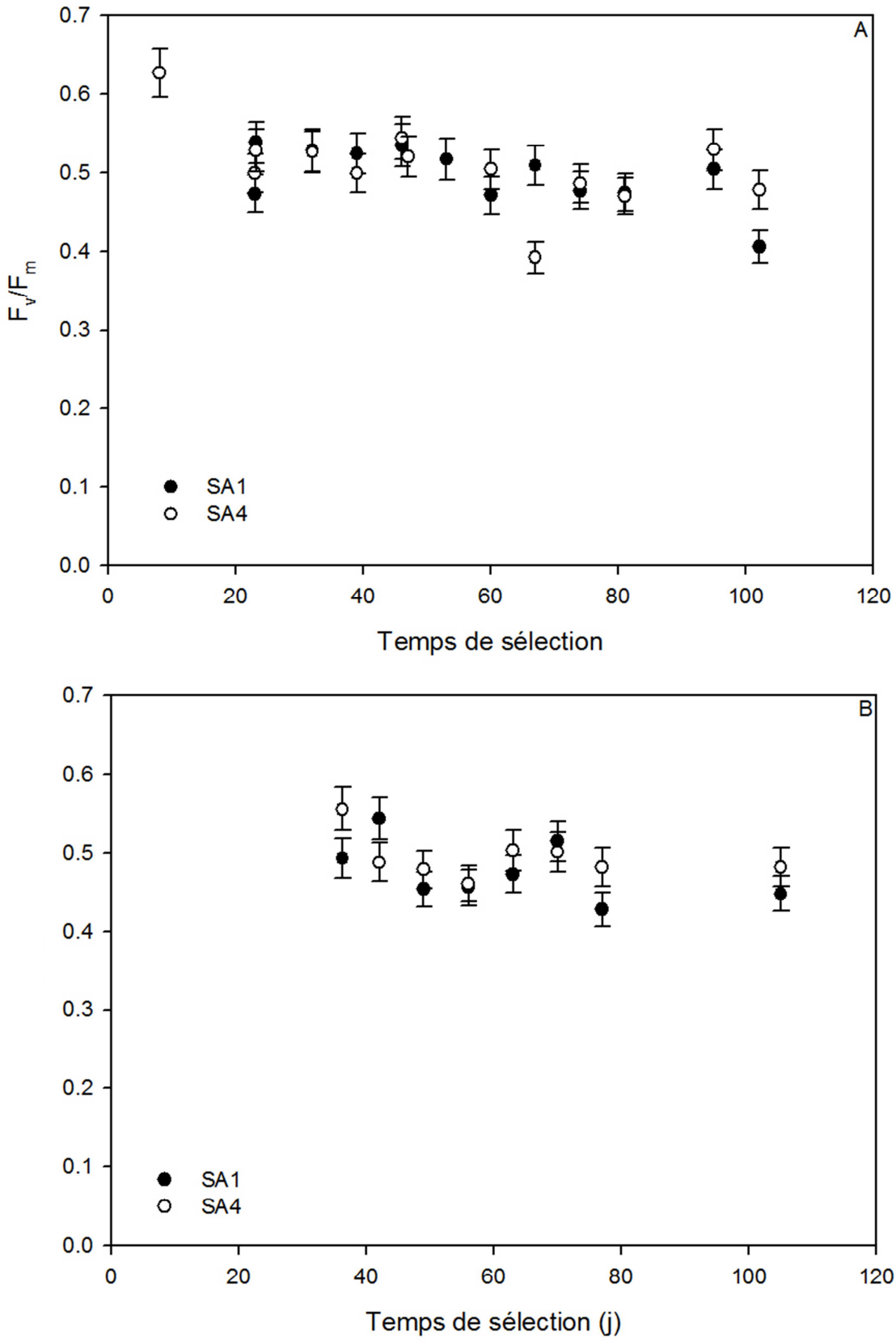


Figure F15 : évolution de l'efficacité photochimique maximale dans les cultures en sélectiostat (A) et dans les photobioréacteurs de suivi en conditions normalisées (B).

Evolution du contenu pigmentaire et de l'efficacité photosynthétique en conditions normalisées. Dans l'expérience de suivi menée en parallèle de la sélection, les conditions d'éclairement sont fixes, permettant une comparaison des souches en conditions normalisées (Fig. F12). L'efficacité photochimique maximale $\frac{F_v}{F'_m}$ ne semble pas être affectée par la sélection (Fig. F15, B ; p-value > 0.1, n = 16). Les contenus en chlorophylle a et en caroténoïdes totaux, obtenus après extraction à l'acétone passent respectivement de 0,23 ± 0,003 à 0,07 ± 0,0017 et 0,23 ± 0,024 à 0,14 ± 0,021 pg.cell^{-1} en fin de sélection, soit des divisions respectives par 3.3 et 1.6 du contenu pigmentaire (Fig. F16). Le suivi de la chlorophylle a, *in vivo* mesurée par fluorescence ou spectrophotométrie confirme cette tendance. Enfin, la valeur de la section efficace, correspondant à la probabilité qu'un photon atteigne une antenne collectrice, est divisée par 7 (Fig. 16, C).

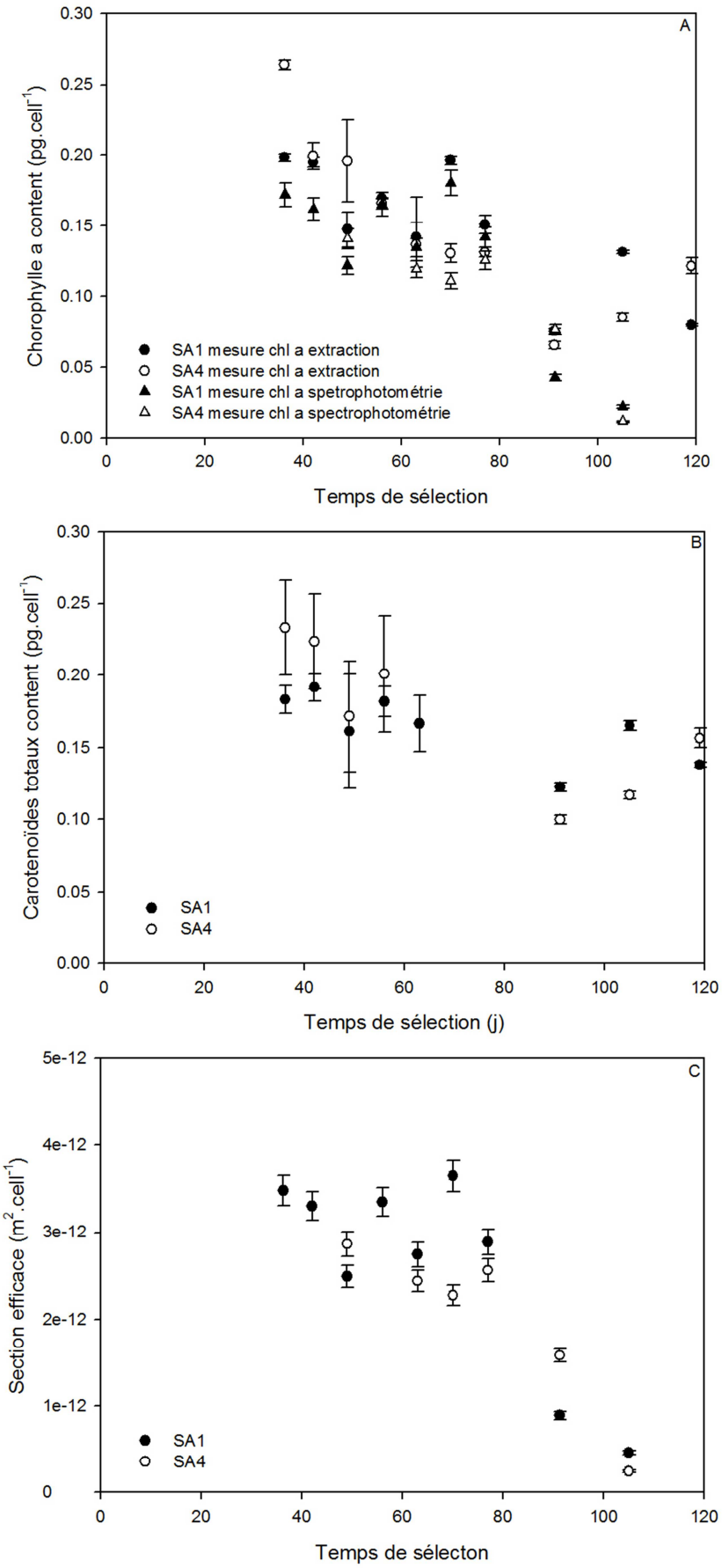


Figure F16 : évolution de la teneur en chlorophylle a (A), des caroténoïdes totaux (B), et de la section efficace (C), dans les photobioréacteurs de suivi en conditions normalisées.

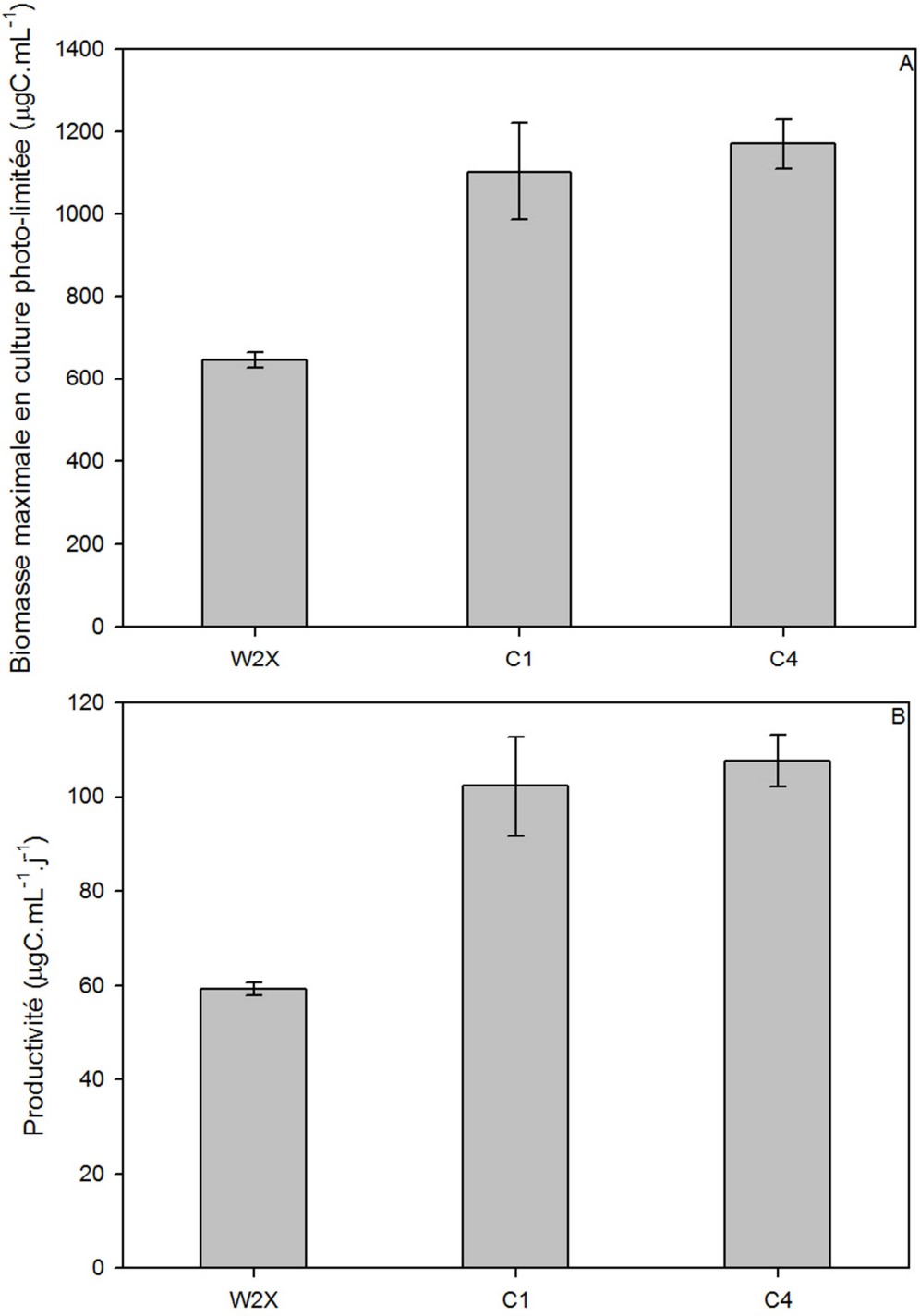


Figure F17 : comparaison finale de la souche initiale avec les souches adaptées en termes de biomasse carbonée (A) et de productivité (B). Chaque valeur représente la moyenne de n ≥ 6 points ± écart-type, mesurée sur 2 réacteurs indépendants.

Evolution du taux de croissance et de la biomasse finale. L'impact de la transparence accrue des microalgues a été testé dans une expérience de comparaison finale, en batch, en régime de photo-limitation. Le taux de croissance de la biomasse carbonée mesuré en phase exponentielle ne diffère pas significativement entre les souches. De plus, la biomasse finale des cultures adaptées, limitées uniquement par la lumière, est bien supérieure aux capacités de production de la souche initiale W2X (Fig. F17). Il en résulte un gain en productivité de 75 ± 5%.

iv. Discussion

Une photo-acclimatation 'classique' de la souche W2X aux changements d'intensité lumineuse. Un passage de fortes vers de basses intensités lumineuses conduit généralement à d'importantes modifications de l'appareil photosynthétique et de ses propriétés. En particulier, une augmentation de la teneur en chlorophylle a est observée (Falkowski, 1980). Cette augmentation s'accompagne classiquement d'une diminution de l'intensité de lumière photosaturante (I_s) et du taux de croissance, alors que l'efficacité quantique de la photosynthèse (α), l'efficacité photochimique maximum et le taux de photosynthèse maximum (P_{max}) augmentent (Fisher et al. 1996 ; Anning et al. 2000). Dans cette étude, les résultats de photo-acclimatation confirment que, pour *T. lutea*, la réponse aux variations d'intensité lumineuse est classique. Toutefois, le taux de croissance a une réponse plus complexe. En particulier, le passage de faibles à fortes intensités lumineuses, entraine une augmentation rapide du taux de croissance, comme observée dans la littérature, mettant en évidence qu'aux faibles intensités lumineuses, les cellules étaient photo-limitées. Par contre, après 1 jour, le taux de croissance se met rapidement à décroitre. La dynamique de la photoinhibition, associée à des mécanismes de photo-acclimatation expliquent probablement ce phénomène. Marchetti et al. (2012), pour une souche très proche, montrent que l'intensité de photo-saturation est assez faible (75 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Cette souche est donc particulièrement sensible à la photoinhibition, ce qui explique la décroissance du taux de croissance à forte intensité lumineuse. De même, le passage de fortes à faibles intensité lumineuses entraine dans un premier temps une réduction du taux de croissance due à la photo-limitation des cellules dans ces conditions, ce qui est classiquement retrouvée dans la littérature. Rapidement, l'acclimatation se met en place, menant à une restructuration de l'appareil photosynthétique qui entraine la ré-augmentation du taux de croissance. La plupart des auteurs sur le sujet ne sont pas en mesure d'évaluer précisément le taux de croissance journalier car ils travaillent en batch. Ils ne peuvent donc pas mettre en évidence ces modifications rapides et ne comparent que des taux de croissance moyennés sur la période de photo-acclimatation (échelle de la semaine).

Les cinétiques d'acclimatation à la lumière sont relativement rapides (Falkowski, 1980). Elles varient, en fonction des espèces de plusieurs heures à quelques jours. Pour *T. lutea*, l'équilibre pigmentaire est atteint deux jours après le changement d'intensité lumineuse. L'expérience n'a, par contre, pas duré assez longtemps pour que le taux de croissance s'équilibre. Ces expériences préliminaires soulignent que *T. lutea* est particulièrement sensible et réactive aux modifications d'intensité lumineuse. Cet aspect est nécessaire pour le fonctionnement du protocole de sélection bien que tous les groupes de microalgues n'aient pas la même sensibilité à la photo-acclimatation (Falkowski, 1980).

Un stress croissant des cultures dans les sélectiostats. Pour être efficace, le protocole de sélection doit générer un stress progressif dans les cultures. La décroissance de l'efficacité photochimique maximale, caractéristique d'une acclimatation à des intensités lumineuses stressantes (Ezequiel, Laviale, Frankenbach, Cartaxana, & Serôdio, 2015), confirme que les algues répondent de plus en plus fortement à l'augmentation de l'intensité maximale de la lumière perçue (Fig. F15, A). Cette idée est renforcée par l'examen des caroténoïdes. La synthèse de ces pigments secondaires photo-protectants est déclenchée en cas de stress oxydatif, induit notamment par un excès de lumière (Lamers et al., 2008). Jusqu'au 40ième jour de sélection (cycle 2), le contenu en caroténoïdes totaux est constant, puis se met à augmenter rapidement, démontrant les effets du stress lumineux (Fig. F14). Néanmoins, la teneur en chlorophylle a est constante dans les sélectiostats. Ce résultat, confirme que l'hypothèse de base sur laquelle repose l'expérience, à savoir que les microalgues acclimatent leur contenu en pigments primaires à l'intensité lumineuse moyenne perçue, est justifiée (Fig. F14 ; Combe et al. 2015).

Une souche plus transparente et plus productive. L'intérêt porté à l'augmentation de la transparence des microalgues pour augmenter leur productivité n'est pas nouveau (Olive, Wollman, Bennoun, & Recouvreur, 1981). Trois approches existent. La première consiste à créer un OGM en insérant ou modifiant volontairement un gène responsable de la concentration en chlorophylle ou de

la taille des antennes (Polle et al., 2003). La seconde technique, en couplant une étape de mutagénèse et de sélection, permet de créer de la diversité génétique et, au sein de cette diversité, d'en extraire des individus d'intérêt par des méthodes de screening (Nakajima & Ueda, 2000). Enfin, une troisième technique, à notre connaissance jamais explorée jusqu'à maintenant, consiste à exercer une pression de sélection sur une population pour en faire progressivement émerger les individus d'intérêt.

Les conditions d'éclairement étant continuellement modifiées au cours de la sélection dans les sélectiostats, seule l'expérience de suivi en conditions constantes et normalisées permet de mesurer la dérive des souches. L'efficacité photochimique maximale $\frac{F_v}{F_m^0}$ reste constante au cours de la sélection et confirme que malgré la sélection, le rendement de la photosynthèse n'a pas été affecté (Fig. F15, B). Le protocole de sélection développé dans cette étude, mime une acclimatation perpétuelle aux fortes intensités lumineuses et aurait donc pu conduire à une diminution de ce rapport (Ezequiel et al. 2015 ; Anning et al. 2000). Polle et al. (2003), en réduisant la taille des antennes photosynthétiques d'une souche de *Chlamydomonas reinhardtii*, observent une diminution de l'efficacité photochimique maximale chez leur mutant. D'autres auteurs, en sélectionnant par mutagénèse des souches plus transparentes, n'observent aucune différence avec le phénotype sauvage (Cazzaniga et al., 2014). Les protocoles de sélection dans ces différents cas sont très différents et induisent probablement des réorganisations différentes de l'appareil photosynthétique, menant à des réponses d'amplitude variable.

De plus, une diminution importante de la teneur en pigments est observée. Les souches adaptées ont 3,3 et 1,6 fois moins de chlorophylle a et de caroténoïdes totaux respectivement que la souche initiale W2X (mesurés par extraction à l'acétone). De même, la teneur en chlorophylle a mesurée *in vivo* montre une diminution d'un facteur 9. Cette différence pourrait être due aux méthodes de mesure. La mesure des pigments obtenue par extraction à l'acétone ne tient pas compte de leur répartition au sein la cellule, de leurs interactions avec les membranes ou encore du 'packaging

effect' (Sciandra, Lazzara, Claustre & Babin, 2000). En revanche, la mesure *in vivo* au spectrophotomètre avec sphère d'intégration estime le contenu pigmentaire en se basant sur une modification de l'absorbance. Cette mesure prend donc en compte la répartition des pigments et leurs interactions biologiques. Elle s'apparente plus à une mesure de la transparence des microalgues, tout comme la section efficace qui, en mesurant la probabilité qu'un photon atteigne l'unité photosynthétique, est une approximation de la taille des antennes collectrices (T. De Mooij et al., 2015). Dans tous les cas, une importante diminution de la concentration en pigments, menant à une augmentation de la transparence est observée sur les souches nouvellement adaptées.

Les effets à l'échelle cellulaire de cette augmentation de la transparence des microalgues sont mal cernés. Deux stratégies de photo-acclimatation ont été décrites dans la littérature. Certaines espèces diminuent le nombre d'antennes photosynthétiques sans changer leur taille (nombre de molécules de chlorophylle par antenne), d'autres au contraire, diminuent leur taille sans changer leur nombre (antennes tronquées ; Fisher et al. 1996). Cette étude ne permet pas de conclure sur la stratégie développée par les souches adaptées. Des analyses plus poussées de mesure de la taille des antennes et de leur structure doivent être réalisées pour comprendre plus en détails les mécanismes sous-jacents à cette sélection (Polle et al., 2003).

Dans certains cas, la diminution de la teneur en pigment n'entraine pas d'augmentation de la biomasse produite ni de la productivité (Tab. 18 ; De Mooij et al. 2015). Il est donc nécessaire de réaliser une expérience de comparaison, en conditions de photo-limitation, entre la souche sauvage et les nouvelles souches obtenues. La comparaison des souches durant l'expérience finale d'inter-comparaison montre que les taux de croissance de la biomasse en phase exponentielle sont identiques, tout comme les taux de croissance, en régime de photo-limitation. Au définitive, la biomasse en régime de photo-limitation donc la productivité est accrue de 75% (Fig. F17). Il est donc effectivement possible d'augmenter la productivité d'un système de culture en diminuant la teneur en pigments des algues (Perin et al., 2015).

Dans la plupart des études visant à rendre les microalgues plus transparentes par mutagénèse ou OGM, le gain en productivité du système est faible, voire nul (Tab. 18). Ces approches ont la plupart du temps un impact négatif sur la croissance des microalgues. Elles conduisent à des modifications de structure des photosystèmes et des protéines associées, rendant les microalgues plus sensibles à la photoinhibition ou ayant un rendement photosynthétique faible. Finalement, bien que les microalgues soient plus transparentes, les taux de croissance sont diminués. Ces approches peuvent également entrainer des mutations aléatoires multiples, aux effets délétères (T. De Mooij et al., 2015). Le protocole développé dans cette étude s'avère beaucoup plus robuste. Les mutations qui génèreraient des individus plus transparents mais avec un taux de croissance déficient ont été automatiquement éliminées par le mode de culture en turbidostat. Les individus restant, quelles que soient les mutations qu'ils ont accumulées, ont obligatoirement un taux de croissance *à minima* identique à la souche initiale et une transparence accrue.

A notre connaissance, ces expériences sont les premières à être capables de doubler la productivité, démontrant ainsi le potentiel de l'approche de sélection non OGM (Fig. 17 ; Tab. 18).

		Ratio WT/mutant				
		Chl a	Caroténoïdes totaux	µ	Biomasse finale	Productivité
Cette étude S1	*T. lutea*	3.3	1.6	0.96	0.57	0.56
TAM2 (Cazzaniga et al., 2014)	*Chlorella sorokiniana*	1.6		1.1		0.76
E2 (Perin et al., 2015)	*Nannochloropsis gaditana*	2		1		0.8
LCH-1 (Y Nakajima & Ueda, 2000)	*Chlamydomonas perigranulata*	2.4				0.82
Tla3 (Kirst, Garcia-Cerdan, Zurbriggen, Ruehle, et al., 2012)	*Chlamydomonas reinhardtii*	7	3			
Stm3LR3 (De Mooij et al. 2015 ; Mussgnug et al. 2007)	*Chlamydomonas reinhardtii,*	3.1		1.5	0.8	1.0
TLA2 (De Mooij et al. 2015 ; Kirst, Garcia-Cerdan, Zurbriggen & Melis 2012)	*Chlamydomonas reinhardtii*	5.8		1	1	1.05
Tla1 (Polle et al., 2003)	*Chlamydomonas reinhardtii*	2.67				
CM1-1 (Huesemann et al., 2009)	*Cyclotella sp*	2.3		1.04	0.69	1.18
AS2.2 (de Mooij et al. 2015 ; Bonente et al. 2011)	*Chlamydomonas reinhardtii*	1	0.28	1.5	1	1.30
BF4 (T. De Mooij et al., 2015)	*Chlamydomonas reinhardtii,*			2	0.55	1.33

Table 18 : classement en fonction de la productivité des différents résultats de la littérature. Le ratio souche initiale/ souche mutée a été utilisé pour s'affranchir des différences de protocole de mesure. En bleu les valeurs menant à une amélioration du critère par rapport à la souche initiale.

v. Conclusions

L'amélioration de la productivité que nous avons obtenue par pression de sélection n'a jamais été atteinte précédemment par les méthodes classiques de sélection et illustre le potentiel important de cette approche. Les perspectives sont nombreuses. Il faudrait entre autres caractériser plus en détail le profil pigmentaire des nouvelles souches pour comprendre quelles modifications de l'appareil photosynthétique ont été engendrées. Une sélection plus poussée pourrait également être réalisée pour tester les limites du système.

G. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En toute chose, il faut considérer la fin.
Jean de La Fontaine (1621 – 1695)

La sélection variétale développée dans l'agriculture moderne est un processus ancien qui a permis d'obtenir le maïs tel que nous le connaissons aujourd'hui à partir de la téosinte, plante sauvage ne produisant que quelques minuscules grains d'amidon. Cette méthode de sélection traditionnelle repose sur des critères aisément mesurables comme le nombre de grains ou la vitesse de croissance, pour identifier des individus d'intérêt au sein d'une population variée. L'approche consiste également à croiser les meilleurs individus pour améliorer la descendance par effet hétérosis (la descendance hérite des capacités améliorées, c'est-à-dire supérieures à la simple somme de celles des parents, autrement dit, 1 + 1 >> 2). Pour que la filière microalgue puisse un jour devenir économiquement viable, notamment pour des applications à faible valeur ajoutée telles que les biocarburants, un processus similaire de sélection d'individus plus performants doit être réalisé. Malheureusement, deux contraintes obligent à repenser complètement ce processus chez les microalgues. Premièrement, la mise en évidence de critères mesurables est difficile. Les microalgues ayant une réactivité aux conditions climatiques bien plus forte que les plantes supérieures, elles sont très difficiles à caractériser (taux de croissance, teneur en lipides, etc…). De plus, les mécanismes génétiques régissant la multiplication de ces organismes ne sont toujours pas élucidés. La simple connaissance de leur ploïdie est difficile. En y ajoutant le faible niveau de connaissances de la reproduction sexuée, ainsi que l'importante propension de ces organismes à muter, il en résulte une forte incompréhension des mécanismes de transmission héréditaire. De nouvelles stratégies de sélection doivent donc être développées pour permettre leur industrialisation dans une optique de production de biocarburants. Elles s'appuieront nécessairement sur une compréhension fine des mécanismes physiologiques de stockage des molécules carbonées énergétiques.

I. La compréhension de la physiologie des microalgues et la construction de modèles prédictifs : outils de décision pour la sélection

La physiologie des microalgues est étudiée depuis plus d'un siècle, notamment leur capacité d'acclimatation aux conditions environnementales. Les principales réponses du métabolisme, et plus particulièrement de la photosynthèse aux paramètres abiotiques tels que la lumière, la température ou encore les nutriments sont maintenant assez bien connues. Des modèles robustes, développés et validés expérimentalement, permettent d'affiner cette compréhension. Néanmoins, la plupart de ces réponses ayant été analysées à l'équilibre, ces résultats, issus d'expériences de laboratoire, sont difficilement extrapolables à la modélisation des milieux naturels et des cultures industrielles en extérieur. Ces dispositifs, soumis aux aléas climatiques, conduisent à des conditions de croissance variables menant à des dynamiques d'accumulation du carbone différentes. En outre, l'importante diversité de réponses qui se manifeste d'une espèce à l'autre, mais également au sein d'une même espèce, reste un sujet d'étude de premier ordre. Des travaux ont donc été menés durant cette thèse sur la physiologie des microalgues dans le but d'améliorer la prédiction des modèles, et pour finalement proposer des modes de sélection robustes.

i. Les variations journalières de la température, paramètre clef du métabolisme

Une première expérience, en conditions dynamiques et contrôlées, a été menée pour comprendre les effets concomitants de variations diurnes de lumière **et** de température, telles qu'elles ont pues être mesurées dans des bassins de production, en extérieur. Cette étude a montré qu'en comparaison de conditions où la lumière serait cyclique et la température constante, les conditions où lumière et température varient simultanément permettent un surcroit de fixation de carbone de 25%. Un effet synergique de la température pendant le jour expliquerait cette différence. Comme pour la lumière (Nielsen, 1992), la productivité des microalgues est stimulée par une variation de

température. Cette expérience a également permis de montrer que les observations de Grobbelaar & Soeder (1985), acquises en conditions statiques, se vérifient aussi en conditions dynamiques de croissance. La respiration nocturne est donc bien une fonction de la température instantanée (lois d'Arrhenius), mais résulte également de la température et de la lumière perçues durant la phase lumineuse. Enfin, nous avons montré pour la première fois que les triglycérides produits le jour par *D. Salina* sont re-consommés la nuit, et que les pigments sont synthétisés le jour et la nuit avec des vitesses réduites particulièrement au moment de la division cellulaire. Ces résultats suggèrent que pour optimiser la production de lipides et de biomasse en extérieur, il est préférable de récolter la biomasse en fin de journée, d'apporter des nutriments en continu ou *a minima* le jour et en début de nuit, et d'appliquer des températures basses la nuit et hautes le jour.

Ces expériences de laboratoire hyper-contrôlées nous ont permis de simuler des conditions de terrain réelles. Elles sont essentielles pour valider des modèles prédictifs, outils fondamentaux pour une gestion plus précise et efficace des cultures en extérieur. Elles démontrent également que l'étude des effets synergiques des variations diurnes de température et de lumière est essentielle. En raison de leur non-linéarité, ces effets sont souvent plus complexes que les simples lois d'additivité et de multiplication généralement adoptées dans les modèles empiriques.

Les effets de la température ont (paradoxalement) été moins étudiés que ceux de la lumière, et encore moins pour ce qui concerne leur périodicité diurne. Comme pour la lumière, différents régimes de variation de température devraient être testés pour mieux en appréhender les effets. Il est également probable que les réponses inter- et intra-spécifiques des microalgues à la température soient caractérisées par une forte variabilité (Thompson, Guo, & Harrison, 1992). De nouveaux jeux de données devront donc être acquis pour mieux cerner ce phénomène. Enfin, il convient de rappeler que la température joue probablement un rôle au moins équivalent à celui de la lumière dans la synchronisation des cellules (Wegmann & Metzner, 1971). Cet effet a été montré durant l'expérience de sélection de *Tisochrysis lutea* par des variations de température (chapitre F et Fig.

G1). L'action concomitante de la température sur la synchronisation des cellules est donc à prendre en compte dans la compréhension de la régulation du cycle cellulaire chez les autotrophes. A l'heure actuelle, la majorité des études font l'hypothèse que la dynamique de ce cycle est uniquement contrainte par la dose de lumière reçue (Spudich & Sager, 1980) et des nutriments.

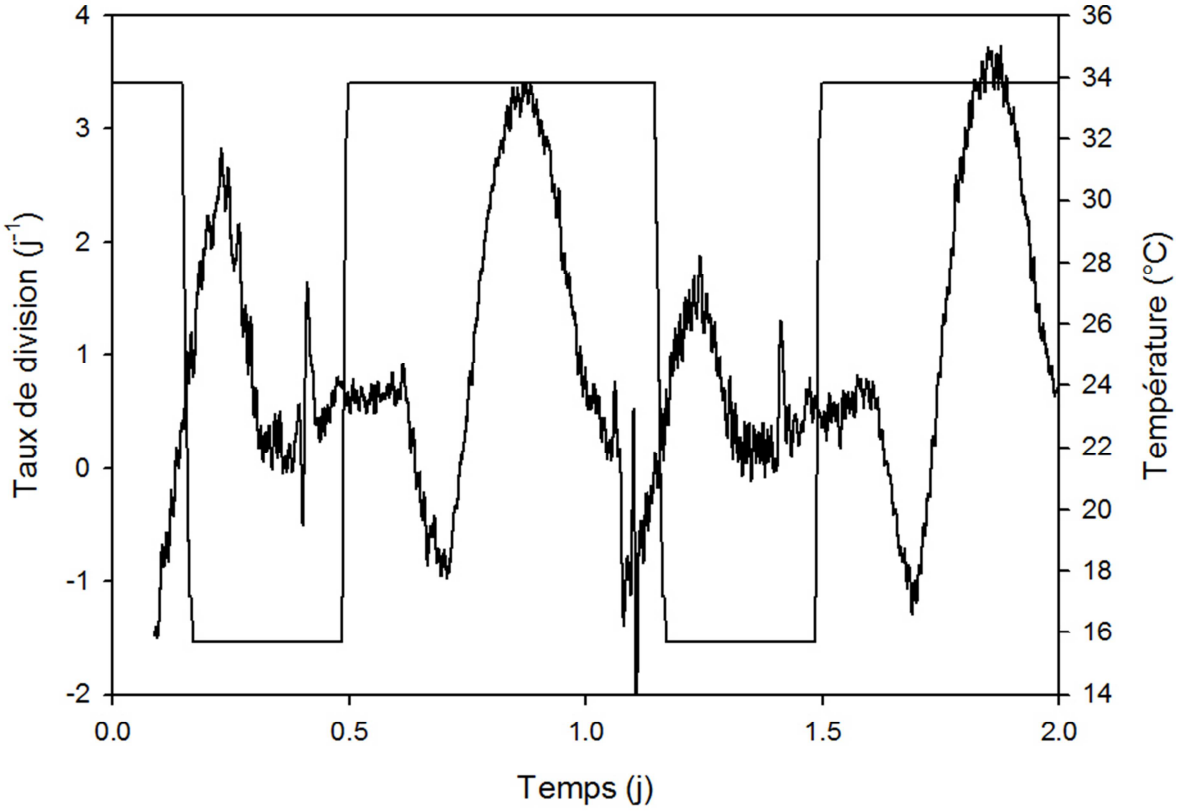


Figure G1 : effets de variations périodiques de température sur la synchronisation des cellules

Pour affiner les modèles et prédire avec plus d'exactitude la réponse des microalgues cultivées en extérieur dans des conditions hautement variables et complexes, il faut donc passer à un niveau supérieur de complexité en étudiant en conditions dynamiques la covariance de tous les paramètres abiotiques agissant sur les microalgues. Un couplage de ces travaux avec le suivi des différentes classes de lipides procurera une meilleure compréhension des mécanismes de stockage du carbone de réserve au cours du cycle cellulaire. Ces clefs de lecture permettront d'optimiser les procédés de culture et la période de récolte des microalgues pour la production de biocarburants.

ii. L'apport en nutriment : contenu en lipides versus productivité

De nombreux travaux se sont intéressés à l'impact du statut azoté des microalgues sur la production de lipides. Cependant, la plupart se sont limités à une analyse des lipides totaux et ne permettent donc pas de conclure réellement sur la production effective de lipides de réserve. En effet, les lipides sont une famille de molécules complexes aux rôles biologiques souvent antagonistes, et les lipides totaux n'en sont que la résultante. En outre, pour que les différentes études soient réellement comparables, il faudrait que les quotas en azote (rapport N:C) soient systématiquement mesurés pour connaitre avec précision le degré de limitation des cellules.

L'expérience conduite avec *D. salina* nous a permis de caractériser les effets d'une limitation azotée variable sur sa croissance et sa production de lipides. Le modèle à quota de Droop (1966) a ainsi pu être paramétré pour cette souche. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature met en évidence des stratégies de stockage de lipides différentes entre espèces. D'un côté il y a, à l'instar de *D. salina*, les espèces dont la teneur en lipides est une fonction affine du quota en azote, et de l'autre, celles dont le contenu en lipides est une fonction plus complexe du quota en azote (Lacour et al., 2012b). Cette étude a également révélé que les synthèses des triglycérides et du bêta-carotène sont très corrélées chez *D. salina* et qu'il existe un découplage entre bêta-carotène et triglycérides pour les hautes concentrations en triglycérides.

La cinétique d'accumulation du bêta-carotène dans les gouttelettes de triglycérides, bien qu'avérée, semble complexe. Pour l'instant, l'unique étude de Rabbani et al., (1998), suggère un mécanisme passif de transfert du bêta-carotène de leur lieu de production (chloroplastes) jusque dans les gouttelettes lipidiques (cytosol). Ce transfert, en modifiant la stœchiométrie de la réaction de synthèse du bêta-carotène, favoriserait sa production. Néanmoins, nos travaux, ainsi que des études conduites *in vitro* sur la diffusion du bêta-carotène dans des gouttelettes synthétiques de triglycérides, montrent que la suraccumulation du bêta-carotène est probablement le fait de mécanismes actifs plus complexes probablement de surconcentration par l'action de protéines

stabilisatrices des gouttelettes lipidiques (Borel et al., 1996). De récentes avancées chez *Chlamydomonas reinhardtii* mettent en évidence que ces gouttelettes riches en caroténoïdes ne sont pas de simples organites de stockage, mais pourraient avoir une activité métabolique plus développée en contrôlant la dégradation des lipides ou encore en intervenant dans la structuration de photorécepteurs (Schmidt et al. 2006 , Katz et al. 1995). Il est donc nécessaire, à l'aide d'approches protéomiques et lipidomiques, de mieux comprendre la composition et l'organisation de ces organites.

Il existe maintenant des modèles capables de prédire la productivité en lipides neutres chez les microalgues (Mairet et al. 2011 ; Packer et al. 2011 ; Yang et al. 2011). L'avantage des microalgues résidant aussi dans leur capacité à synthétiser d'autres molécules d'intérêt, comme par exemple les acides gras ou le bêta-carotène, il devient essentiel de construire des modèles plus complets capables de prédire ces voies de synthèse. Certaines méthodes de modélisation des flux métaboliques le permettent (Baroukh, Muñoz-Tamayo, Steyer, & Bernard, 2014), mais, pour être validées, elles se heurtent généralement à une insuffisance de données, voire au manque de connaissance des mécanismes cellulaires. De surcroit, les modèles existants ne prennent pas en compte l'excrétion cellulaire, avec comme conséquence directe une estimation biaisée entre les fixations nette et brute de carbone. Pourtant, la carence en azote, souvent utilisée pour stimuler l'accumulation de lipides neutres, est connue pour induire une excrétion importante de TEP (Transparent Exo-polymerique Substance) et d'EPS (Extracellular Polymeric Substance ; Staats et al. 2000). Cette excrétion, très variable d'une espèce à l'autre, peut parfois être considérable. Elle atteint par exemple 56% des carbohydrates totaux chez *Chlorella curvisetus* (Myklestad, 1995). Il est donc nécessaire, par des expériences en chémostats limités par l'azote, de caractériser l'excrétion des microalgues de façon à intégrer ce processus dans les modèles. Pour cela, les protocoles d'analyse de ces molécules complexes devront être améliorés.

II. La sélection par pression de sélection : une approche novatrice et prometteuse

L'utilisation des principes évolutionnistes à des fins appliquées est assez récente, notamment dans le domaine des microalgues. L'objectif principal de cette étude était de démontrer que la productivité en lipides des microalgues pouvait être accrue en mettant en œuvre un procédé de sélection continue. La productivité (P) en lipides peut être optimisée en agissant sur un ou plusieurs des trois termes qui permettent de la calculer :

P = Taux de croissance de la biomasse *x* Lipides par unité de biomasse *x* Biomasse (1)

Trois expériences ont donc été réalisées. La première a augmenté le premier terme de l'équation, en élargissant la niche thermique de l'espèce. La seconde a permis d'augmenter le contenu en lipides par unité de biomasse (second terme de l'équation), en soumettant les microalgues à des apports pulsés d'azote. Enfin, la dernière expérience, en modifiant le contenu pigmentaire des microalgues, a permis d'augmenter leur biomasse pour une même intensité lumineuse. Dans ces trois cas, une augmentation de la productivité a été obtenue. Ces trois expériences ont été menées sur une souche sauvage, en améliorant un unique facteur de productivité. Il convient maintenant de réaliser, successivement et sur la même souche, ce même type d'approche pour augmenter simultanément les trois aspects et obtenir une souche très compétitive.

i. 3 expériences de longue durée pour trois aspects de la sélection

Le sélectiostat : retour d'expérience. Ce travail de sélection a été rendu possible grâce au développement d'un nouveau système de culture dédié, le sélectiostat[6], couplé avec un logiciel de pilotage des cultures, tout aussi spécifique, Odin[7]. De très nombreuses interactions ont eu lieu aux cours de ces travaux pour une amélioration continuelle de ces deux outils. Le tableau suivant récapitule le retour de trois années d'expérience.

Points forts validés	Points faibles améliorés ou à améliorer
Robustesse du matériel : les sélectiostats ont fonctionnés plus de 300 jours dans les conditions corrosives du milieu marin avec une efficacité constante.	
Simplicité : le montage et l'entretien des réacteurs sont simples.	Réglage des agitateurs magnétiques fastidieux. Besoin de connaitre la vitesse de rotation, pour l'instant trop opérateur dépendant.
Modularité : possibilité d'ajouter de nouveaux actionneurs (pompes, capteurs, etc…) en fonction du mode de sélection souhaitée.	
Contrôle de la température : les transferts thermiques permettent un contrôle minutieux de la température ainsi que sa modification rapide.	Pas de boucle de rétrocontrôle connectée aux sélectiostats.
Contrôle de la lumière : possibilité de réaliser des cycles lumineux de fréquence et d'amplitude variables.	Impossibilité d'avoir de très faibles intensités lumineuses (1 et 75 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). Système de sélection aux UV non opérationnel.
Capteurs : le suivi de l'intensité lumineuse, de la température et du pH est opérationnel sur de très longues échelles de temps.	L'acquisition en ligne de certains paramètres biologiques n'est toujours pas opérationnelle. Le développement de nouveaux capteurs et d'observateurs est néanmoins en cours.
Milieu homogène : le système d'agitation, couplé à une régulation du bullage, permet de garantir un milieu homogène sur toute la hauteur d'eau.	La *formation de biofilm*, plus importante en conditions stressantes, a parfois affecté l'homogénéité des cultures ainsi que l'efficacité des capteurs. Un système de nettoyage mécanique, non invasif, a été développé. Un protocole de routine pour le nettoyage a également été mis en place.
Système *de prélèvement* : haut, milieu, bas du réacteur.	Culture en continu avec une alimentation par le bas non fonctionnelle.

[6] Développé par Eric Pruvost, ingénieur LOV/INRIA
[7] Développé en partie par Mélaine Gautier, ingénieur INRIA

Eclairage : LED (éclairage homogène et constant tout au long des expériences dans une gamme d'intensité extrêmement importante).	Un système de refroidissement à air des LED a dû être développé, particulièrement pour les expériences à fortes intensités lumineuses (>1500 µmol.m^{-2}.s^{-1}). Faible durabilité du système de refroidissement qui de plus, est insuffisant pour les très hautes intensités lumineuses (>2500 µmol.m^{-2}.s^{-1}).
Mode de culture : les cultures en chémostat et turbidostat sont opérationnelles sur de longues durées sans entretien ni calibration régulière des pompes. Le capteur de turbidité est opérationnel et adapté à de très nombreuses conditions de culture.	Bruit du signal de turbidité trop important et gamme de 'vision' beaucoup trop étroite. Capteur trop sensible aux modifications biologiques des algues. Mise en place d'un capteur laser à la place des LED.
Logiciel d'acquisition et de control : Odin a permis d'enregistrer les données sur de longues périodes. Sa conception a également permis de développer des séquences d'actions sur les cultures.	Robustesse, lissage, gestion des erreurs : non fonctionnels. Nombreuses fonctionnalités sur les séquences ajoutées pour un gain d'efficacité et de robustesse.
	Algorithme de gestion du turbidostat trop peu réactif en regard des expériences hautement variables réalisées. Mise en place d'un système tout ou rien de gestion de la turbidité.

Table 19 : retour d'expérience du système de sélection.

La température pour améliorer le taux de croissance. La première expérience avait pour objectif d'améliorer la réponse des microalgues à la température. Nous avons vu dans le Chapitre D que la température est un paramètre clef de la productivité des microalgues (Ras et al., 2013). L'augmentation de la niche thermique permet de réduire l'effet délétère des températures extrêmes rencontrées parfois l'été, et de maintenir une production significative de microalgues aux intersaisons (printemps, automne). L'application journalière d'un signal en créneaux de températures basses et hautes, en mode turbidostat, a permis d'exercer une pression de sélection, laquelle a été progressivement augmentée par l'incrémentation hebdomadaire de l'écart entre températures basses et hautes, autour d'une valeur moyenne constante. Les réponses du taux de croissance à la température (courbe µ=f(T)) de *T. lutea* avant et après sélection ont été comparées puis, *via* un modèle, les températures cardinales de chaque souche ont été déterminées. Cette expérience a mis en évidence une amélioration significative de la niche thermique, avec une température cardinale maximale T_{max} significativement plus haute, et une température cardinale minimale T_{min} plus basse, même si ce second terme reste plus difficile à déterminer. En effet, la réponse des microalgues étant

moins bien mesurée aux basses températures, T_{min} est estimée avec moins de précision. Finalement, cette expérience a aussi montré que la réponse physiologique des microalgues adaptées à ces variations de températures s'apparente à celle des microalgues psychrophiles, et se traduit par des teneurs en chlorophylle ainsi qu'un rapport C : N plus faible, et une importante teneur en acides gras insaturés.

Des pulses de nitrates pour la sélection de souches plus grasses. Le rapport des quotas maximum et minimum en azote $\frac{q_m}{q_0}$, qui varie d'une espèce à l'autre, a été présenté comme un indicateur de la capacité de production de triglycérides d'une microalgue (Shifrin & Chisholm, 1981). L'apport d'azote sous forme de pulses, bien que peu étudié, est théoriquement un mode puissant de sélection. Il favorise les individus qui possèdent une vitesse d'acquisition et un quota maximum (q_m) élevés (partie F). Aucune information n'existe, à notre connaissance, sur l'effet de pulses de nutriment sur l'évolution du quota minimum q_0, même s'il est probable que cette constante soit affectée par ce mode de nutrition. Nous avons donc soumis des cultures d'une diatomée épipélique, *C. closterium,* à un régime impulsionnel de nitrates pendant plus de 4 mois. L'amplitude constante et la fréquence décroissante des apports successifs a entrainé une augmentation des temps de carence et donc, de la pression de sélection. La comparaison des souches adaptées et sauvages a permis de mettre en évidence différentes évolutions, dont une augmentation significative de la teneur en lipides. Malgré un protocole probablement trop peu sélectif, ce résultat préliminaire est encourageant et montre le potentiel de cette approche. Cette expérience a également permis de mieux comprendre les écueils de la sélection par pression dirigée pour en affiner les protocoles.

L'alternance de fortes intensités lumineuses et d'obscurité pour la sélection de souches plus transparentes. L'auto-ombrage des microalgues, en culture dense, est le principal facteur limitant la productivité (Molina-Grima et al., 1996). La capacité de photo-acclimatation des microalgues est bien documentée dans la littérature et se traduit par d'importantes modifications de l'appareil photosynthétique en réponse aux changements de l'intensité lumineuse moyenne perçue. Une

étude préliminaire a mis en évidence que ces mécanismes étaient particulièrement actifs chez *T. lutea*. Ensuite, l'application d'un signal carré d'amplitude croissante où intensités lumineuses fortes et nulles alternent autour d'une valeur moyenne faible a permis de sélectionner des microalgues plus transparentes. Les souches nouvellement obtenues présentent un contenu en chlorophylle *a* divisé par 3,3, et une augmentation de la productivité de 75%. Cette étude met en relief les avantages importants de ce type de sélection en comparaison avec les voies classiques (OGM, mutation UV,…) qui mènent le plus souvent à des organismes plus transparents mais moins productifs en raison de l'action négative incontrôlée des mutations sur des gènes impliqués dans la photosynthèse.

ii. Perspectives

Les règles de la sélection par pression continue. L'obtention de nouvelles souches plus productives est une opération longue (en moyenne 200 jours), qui nécessite un système de culture performant, capable de contrôler dynamiquement de nombreux paramètres. C'est également une opération qui comporte au départ, une prise de risque importante puisqu'elle consiste à soumettre des organismes à un stress permanent et croissant dont l'issue est incertaine, notamment à cause du manque de recul sur le sujet. Ces trois années de travaux permettent de tirer quelques grandes conclusions. Pour minimiser les risques, il est nécessaire :

- de disposer d'un système de culture robuste, capable de fonctionner sans faille sur de très longues périodes
- d'exercer une pression de sélection croissante au cours du temps dont l'accroissement serait régi par une règle de décision facilement mesurable (ex : taux de croissance, teneur en lipide etc…).
- de prévoir des premiers cycles de sélection rapidement franchis car souvent inutiles (acclimatation).
- De réaliser, dans la mesure du possible, des cycles de sélection courts pour une haute fréquence de sélection (1 semaine).
- de caractériser régulièrement, en conditions normalisées et mesurables, l'efficacité de la sélection pour estimer l'évolution de la souche et arrêter l'expérience si l'effet escompté n'apparaît pas.
- de conduire une expérience finale pour comparer les souches initiales et finales.

Finalement, il est essentiel d'approfondir la compréhension de la physiologie des microalgues pour développer de nouveaux protocoles de sélection plus performants. D'autres propriétés (voir ci-dessous) encore mal connues chez les microalgues devront également être étudiées.

Du sexe dans la sélection. Darwin a évoqué l'importance de la reproduction sexuée lors du processus de sélection. Ce mécanisme, bien que complexe, est relativement bien connu chez les organismes supérieurs. Les microalgues, comme les bactéries, se multiplient principalement par scission binaire asexuée. La cellule divise son ADN au moment de la mitose, puis se scinde en deux cellules filles dont le génome est identique à celui de la cellule mère. Néanmoins, dans certains cas (conditions stressantes par exemple), les microalgues sont capables de réaliser une reproduction sexuée. Un des exemples les plus simples et les mieux maitrisés est la reproduction sexuée de *Chlamydomonas reinhardtii,* chez qui la carence en azote est connu pour induire la spéciation de cellules végétatives en gamètes. La production de certaines molécules au niveau des flagelles permet aux gamètes + et – de s'associer; c'est la fertilisation menant à la formation d'un zygote. Cet œuf se divisera ensuite pour donner deux cellules filles aux génomes différents de celui des parents (Fig. G2). Des mécanismes de reproduction sexuée bien plus complexes existent également, faisant intervenir des phérormones et induisent la spéciation des microalgues en gamètes (Frenkel et al. 2014).

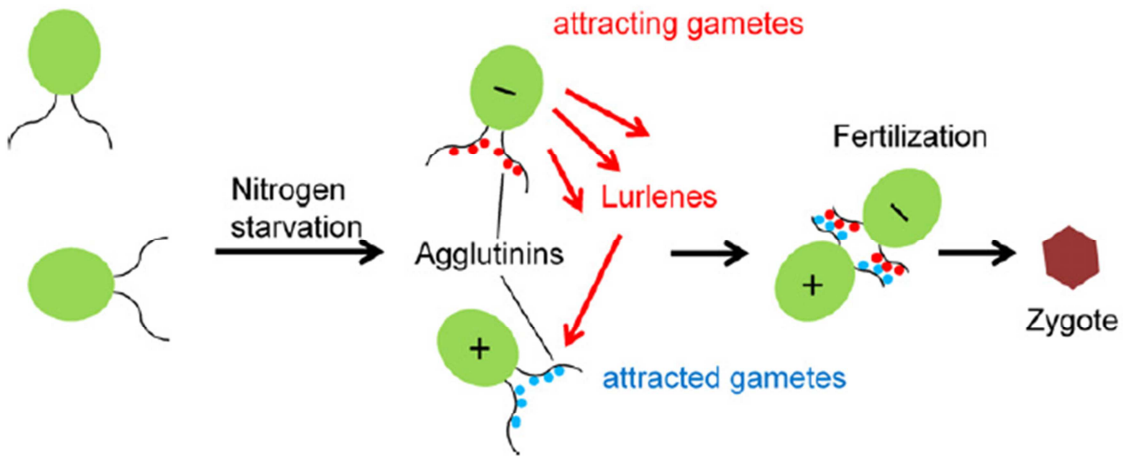


Figure G2 : un des mécanismes de reproduction sexuée chez les microalgues, le cas simple de C. reinhardtii (Frenkel et al., 2014)**.**

Ce mode de multiplication, dont le coût énergétique est énorme, ne présente aucun intérêt à l'échelle de l'individu (Lewis, 1983). Par contre, en créant de la diversité génétique, il favorise l'ensemble de la population, parce qu'il en permet l'émergence de nouveaux génotypes potentiellement plus résistants face à des conditions environnementales dégradées. Lachapelle &

Bell (2012) ont montré qu'une population de *C. reinhardtii* caractérisée par une faible diversité génétique et incapable de reproduction sexuée était favorisée par de faibles variations environnementales (dans leur cas, une augmentation de la salinité). En revanche, les populations caractérisée par une haute diversité génétique et capables d'effectuer de la reproduction sexuée avaient une résistance bien supérieure face aux très fortes perturbations environnementales. A 25 $g.L^{-1}$ de NaCl, 60% des populations douées de reproduction sexuée avaient survécu contre seulement 40% pour les autres.

La reproduction sexuée contrôlée est donc un moyen de créer une diversité génétique énorme favorable à l'émergence de nouvelles populations. Cette approche est probablement bien plus puissante que les techniques actuelles basées sur la mutagénèse UV ou chimique. En fonction de la pression de sélection choisie, il sera bien plus facile d'obtenir des individus d'intérêt avec des productivités accrues. Le simple screening d'individus plus productifs est également possible dans un protocole de mutation-sélection où l'étape de mutation serait remplacée par de la reproduction sexuée. Chez *C. closterium* et *D. salina*, la reproduction sexuée a été observée (Oren 2005 ; Vanormelingen et al. 2015). Chez *T. lutea*, nous n'avons pas trouvé de publications sur le sujet, mais les algues vertes sont connues pour avoir cette capacité (Frenkel et al., 2014). Les facteurs déclenchant ce mode de multiplication, bien que mal identifiés, se divisent en deux catégories ; les stress abiotiques (carence en azote, choc thermique, modification de l'intensité et de la qualité de la lumière, de la photopériode, de la salinité) ou biotiques (interaction avec des bactéries, hautes concentrations de microalgues, réduction du diamètre cellulaire chez les organismes à frustule). Les pressions de sélection que nous avons exercées sur les microalgues (stress thermique, carence en nitrates, choc lumineux) sont clairement des inducteurs de la reproduction sexuée. Les résultats obtenus au cours de nos travaux traduisent très probablement trois mécanismes d'adaptation distincts mais difficilement dissociables en l'état actuel des connaissances : les mutations pré-sélectives (variabilité génétique initiale de la culture à t = 0), les mutations adaptatives (production

d'une variabilité génétique par mutation durant le stress) et la reproduction sexuée (production de variabilité génétique par mélange des génomes durant le stress).

En conclusion, maitriser la reproduction sexuée permettra dans un premier temps de créer de la diversité génétique, source de nouveaux génotypes d'intérêt. Dans un second temps, cela permettra aussi de procéder à de la sélection variétale au sens agronomique, c'est-à-dire croiser une variété de microalgues caractérisée par une forte teneur en lipides avec une variété ayant un taux de croissance élevé, pour obtenir une descendance dont la productivité est accrue (vitesse de croissance et teneur en lipides élevées).

Etude de la phycosphère. Les interactions entre les microalgues et le microbiome environnant (phycosphère) sont de plus en plus étudiées. Les bactéries peuvent être libres autour des microalgues ou y être attachées, mais dans les deux cas les interactions sont très nombreuses. Les bactéries peuvent avoir des effets négatifs sur la croissance des microalgues, soit directement en lysant les cellules, soit indirectement par le biais d'une compétition pour un substrat tel que les nitrates ou les phosphates. Elles peuvent également produire des molécules allélopathiques, pour l'instant mal caractérisées. Les bactéries ont aussi des effets positifs. En reminéralisant la matière organique, elles rendent accessibles des macronutriments essentiels à la croissance des microalgues. Les bactéries sont également capables de synthétiser *de novo* des vitamines (B_{12} par exemple), cofacteurs indispensables (Cole, 1982). De plus, il a été montré que l'association d'algues avec certaines bactéries rendaient les premières plus résistantes à des variations brusques de l'environnement (Dittami et al., 2015). Ces effets négatifs et positifs dépendent de l'espèce d'algue considérée et des bactéries associées. A l'état naturel, il existe probablement un équilibre entre bactéries inhibitrices et stimulatrices (Le Chevanton et al., 2013).

Les expériences réalisées en sélectiostat, monospécifiques mais non axéniques, ont probablement conduit à la sélection non pas d'une nouvelle souche de microalgue mais d'une nouvelle phycosphère. Néanmoins, cet aspect n'a absolument pas été approfondi. Les nouveaux outils de la

biologie moléculaire et de la génétique procurent maintenant la possibilité de caractériser finement ce type d'association, et surtout son évolution entre le phénotype sauvage et la souche adaptée (Le Chevanton et al., 2013). En considérant, non plus la cellule de microalgue comme un élément unique mais comme intégrée au sein d'une phycosphère, la compréhension des mécanismes de sélection serait accrue, et ce au bénéfice de nouveaux protocoles. De plus, les enceintes de culture de microalgues en extérieur étant non axéniques, leur ensemencement par des bactéries sélectionnées, bénéfiques aux microalgues et capables de rentrer en compétition avec les bactéries néfastes, apparait comme une voie prometteuse d'amélioration de la productivité des microalgues (Le Chevanton et al., 2013).

III. Conclusion

Le bilan de ces travaux est riche de deux enseignements. En premier lieu, il apparait évident que la sélection de souches plus productives par pression de sélection, bien que très peu développée, est un outil extrêmement puissant pour l'industrialisation future des microalgues et s'annonce d'avenir, et plus particulièrement dans le contexte actuel de méfiance envers les OGM. Deuxièmement, la production économiquement viable de biocarburants à base de microalgues, passera obligatoirement par la sélection. En partant d'une souche sauvage de productivité P_{WT}, l'IFREMER de Nantes a multiplié par 2 sa teneur en lipides de réserve par une approche de mutation-sélection. Puis partant de cette souche et en exerçant une pression de sélection continue, nous avons été en mesure de doubler la biomasse donc de multiplier par 4 la productivité par rapport à la souche sauvage ($P_{finale} = 2 \times 2 \times P_{WT}$). L'histoire ne s'arrête pas là. En modifiant la niche thermique des microalgues, leur taux de croissance à l'échelle de l'année a été multiplié entre 1.5 et 2. Bien que l'amélioration de la niche thermique n'ait pas été réalisée sur la même souche, nous avons mis en évidence que notre approche de la sélection, limitait les phénomènes de trade-off (pas de diminution de la teneur en lipides, augmentation de la niche thermique parallèlement à l'augmentation du taux de croissance). Les arguments, accumulés au cours de ces travaux, permettent donc de dire qu'une nouvelle souche F8, dont la productivité serait multipliée par 8 par rapport au phénotype sauvage, est envisageable dans un avenir très proche.

En allant plus loin, et au regard les informations disponibles dans la littérature, le potentiel de sélection est bien plus vaste. L'IFREMER de Nantes est en très bonne voie pour obtenir une souche ayant 4 fois plus de lipides de réserve. Quelle que soit la méthode de sélection utilisée, il semble donc possible d'augmenter à *minima*, par 4 la concentration en lipides de réserve chez une microalgue. De plus, Kirst et al. (2012) sont parvenus par voie OGM à diminuer par 7 la teneur en chlorophylle *a* de *Chlamydomonas reinhardtii* contre 3 dans nos travaux. Il existe donc une importante marge de progression pour augmenter la transparence par pression continue et la

biomasse du système d'un facteur 2, au moins. Enfin, concernant la température, nos travaux très préliminaires n'ont pas délivré tout leur potentiel. L'utilisation intelligente du turbidostat avec des protocoles de sélection à la température permettra encore d'augmenter le taux de croissance. Un facteur 2 supplémentaire, semble aisément atteignable.

En conclusion, le facteur 4 a été atteint au cours de cette thèse en partant des travaux de l'IFREMER. Le facteur 8 est possible rapidement et la multiplication d'un facteur supérieur à 10 de la productivité d'une souche sauvage ne semble absolument pas absurde au regard des informations disponibles. Son utilisation nécessitera de développer des procédures de conservation pointues (cryo-préservation) et de revoir les techniques actuelles de culture qui ont tendance à ne travailler que par dilutions successives, sans jamais repartir de la souche initiale. Avec l'amélioration des technologies de production réduisant la consommation en eau et en énergie, la production économiquement viable de biocarburant de troisième génération, ne sera bientôt plus une légende.

H. BIBLIOGRAPHIE

Ackman, R. (1981). Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. *Methods in Enzymology*. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687981720135

ADEME. (2014). Feuille de route biocarburants avancés. *Réseaux*.

Affan, A., Heo, S., & Lee, J. (2009). OPTIMAL GROWTH CONDITIONS AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF CYLINDROTHECA CLOSTERIUM,(BACILLARIOPHYCEAE). *Journal of Phycology*, *1415*, 1405–1415. doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00763.x

Ahmad, I., Fatma, Z., Yazdani, S. S., & Kumar, S. (2012). DNA barcode and lipid analysis of new marine algae potential for biofuel. *Algal Research*. doi:10.1016/j.algal.2012.10.003

Albertsson, P.-A. (2003). The contribution of photosynthetic pigments to the development of biochemical separation methods: 1900-1980. *Photosynthesis Research*, *76*(1-3), 217–25. doi:10.1023/A:1024944606930

Alonzo, F., & Mayzaud, P. (1999). Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Marine Chemistry*, *67*(3-4), 289–301. doi:10.1016/S0304-4203(99)00075-4

Andersen, R. (2005). Algal culturing techniques. *Chemistry & …*, 589.

Angioni, E., Lercker, G., Frega, N. G., Carta, G., Melis, M. P., Murru, E., … Banni, S. (2002). UV spectral properties of lipids as a tool for their identification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*(1), 59–64. doi:10.1002/1438-9312(200201)104:1<59::AID-EJLT59>3.0.CO;2-I

Anning, T., MacIntyre, H. L., Pratt, S. M., Sammes, P. J., Gibb, S., & Geider, R. J. (2000). Photoacclimation in the marine diatom Skeletonema costatum. *Limnology and Oceanography*, *45*(8), 1807–1817. doi:10.4319/lo.2000.45.8.1807

Azencott, H. R., Peter, G. F., & Prausnitz, M. R. (2007). Influence of the Cell Wall on Intracellular Delivery to Algal Cells by Electroporation and Sonication. *Ultrasound in Medicine & Biology*, *33*(11), 1805–1817. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2007.05.008

Bader, M. (1980). A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *Journal of Chemical Education*, *57*(10), 703. doi:10.1021/ed057p703

Barnes, H., & Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total”lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and …*, *12*. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022098173900403

Baroli, I., & Melis, A. (1996). Photoinhibition and repair in Dunaliella salina acclimated to different growth irradiances. *Planta*, *198*(4), 640–646. doi:10.1007/BF00262653

Baroukh, C., Muñoz-Tamayo, R., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2014). DRUM: A New

Framework for Metabolic Modeling under Non-Balanced Growth. Application to the Carbon Metabolism of Unicellular Microalgae. *PLoS ONE*, *9*(8), e104499. doi:10.1371/journal.pone.0104499

Béchet, Q., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1648–63. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.014

Béchet, Q., Shilton, A., Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Guieysse, B. (2011). Universal Temperature Model for Shallow Algal Ponds Provides Improved Accuracy. *Environmental Science & Technology*, *45*(8), 3702–9. doi:10.1021/es1040706

Ben-Amotz, a, & Avron, M. (1983). On the Factors Which Determine Massive beta-Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga Dunaliella bardawil. *Plant Physiology*, *72*(3), 593–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1066285&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Ben-Amotz, a, Lers, A., & Avron, M. (1988). Stereoisomers of beta-Carotene and Phytoene in the Alga Dunaliella bardawil. *Plant Physiology*, *86*(4), 1286–91. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1054666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Ben-Amotz, a., Katz, A., & Avron, M. (1982). Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae : purification and characterisation of beta-carotene-riche globules from Dunaliella Bardawil (chlorophyceae). *Journal of Phycology*, *18*(4), 529–537.

Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G., & Thomas, W. H. (1985). Chemical Profile of Selected Species of Microalgae with Emphasis on Lipids. *Journal of Phycology*, *21*(1), 72–81. doi:10.1111/j.0022-3646.1985.00072.x

Benbouzid, H., Le Floch, S., Stephan, L., Olier, R., & Privat, M. (2012). Combined effects of salinity and temperature on the solubility of organic compounds. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, *48*, 54–64. doi:10.1016/j.jct.2011.11.020

Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. C., & de Vargas, C. (2013). On the description of Tisochrysis lutea gen. nov. sp. nov. and Isochrysis nuda sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology*, *25*, 1763–1776. doi:10.1007/s10811-013-0037-0

Bennett, A., & Lenski, R. (1993). Evolutionary adaptation to temperature II. Thermal niches of experimental lines of Escherichia coli. *Evolution*, *47*(1), 1–12. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/10.2307/2410113

Bennett, A., Lenski, R., & Mittler, J. (1992). Evolutionary adaptation to temperature. I. Fitness responses of Escherichia coli to changes in its thermal environment. *Evolution*, *46*(1), 16–30. doi:10.2307/2409801

Bernard, O., & Mairet, F. (2015). Modelling of Microalgae Culture Systems with Applications to Control and Optimization. *Advances in Biochemical Engineering*.

Bernard, O., Malara, G., & Sciandra, A. (1996). The effects of a controlled fluctuating nutrient environment on continuous cultures of phytoplankton monitored by computers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *197*(2), 263–278. doi:10.1016/0022-0981(95)00161-1

Bernard, O., & Rémond, B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*, *123*, 520–7. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.022

Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods*, *87*(1), 17–23. doi:10.1016/j.mimet.2011.06.018

Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911–917. Retrieved from http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-099

Bonente, G., Formighieri, C., Mantelli, M., Catalanotti, C., Giuliano, G., Morosinotto, T., & Bassi, R. (2011). Mutagenesis and phenotypic selection as a strategy toward domestication of Chlamydomonas reinhardtii strains for improved performance in photobioreactors. *Photosynthesis Research*, *108*(2-3), 107–120. doi:10.1007/s11120-011-9660-2

Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, a, Lafont, H., Lairon, D., & Azais-Braesco, V. (1996). Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research*, *37*(2), 250–261.

Bougaran, G., Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., Lukomska, E., … Cadoret, J.-P. (2012). Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga Isochrysis affinis Galbana (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(11), 2737–45. doi:10.1002/bit.24560

BPstats. (2014). BP Statistical Review of World Energy June 2014, (June).

Brennan, L., Blanco Fernández, A., Mostaert, A. S., & Owende, P. (2012). Enhancement of BODIPY505/515 lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. *Journal of Microbiological Methods*, *90*(2), 137–143. doi:10.1016/j.mimet.2012.03.020

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, *124*, 217–226. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.003

Bricaud, A., Morel, A., & Prieur, L. (1983). Optical efficiency factors of some phytoplankters. *Limnology and Oceanography*, *28*(5), 816–832. doi:10.4319/lo.1983.28.5.0816

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 1551–1558. Retrieved from http://www.fasebj.org/content/9/15/1551.short

Brown, C., & Lynch, P. (1982). Matrix representations and criteria for selecting analytical wavelengths for multicomponent spectroscopic analysis. *Analytical Chemistry*, (5), 1472–1479. Retrieved from http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00246a007

Brown, S. W., & Oliver, S. G. (1982). Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *16*(2-3), 119–122. doi:10.1007/BF00500738

Brown, W. J., Sullivan, T. R., & Greenspan, P. (1992). Nile red staining of lysosomal phospholipid inclusions. *Histochemistry*, *97*(4), 349–354. doi:10.1007/BF00270037

Cadoret, J.-P., & Bernard, O. (2009). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues, *202*(3), 201–211.

Carrera-Martínez, D., Mateos-Sanz, a., López-Rodas, V., & Costas, E. (2010). Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of Dunaliella tertiolecta (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*, *97*(2), 151–159. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.016

Carrera-Martinez, D., Mateos-Sanz, A., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2011). Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology*, *101*(2), 342–350. doi:10.1016/j.aquatox.2010.11.009

Carrier, G., Garnier, M., Le Cunff, L., Bougaran, G., Probert, I., De Vargas, C., … Saint-Jean, B. (2014). Comparative transcriptome of wild type and selected strains of the microalgae Tisochrysis lutea provides insights into the genetic basis, lipid metabolism and the life cycle. *PLoS ONE*, *9*(1). doi:10.1371/journal.pone.0086889

Carroll, K. K. (1961). Separation of lipid classes by chromatography on Florisil. *Journal of Lipid Research*, *2*(2), 135–41. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13691072

Castell, L. L., & Mann, R. (1994). Optimal staining of lipids in bivalve larvae with Nile Red. *Aquaculture*, *119*(1), 89–100. doi:10.1016/0044-8486(94)90445-6

Castro, G. R., Kamdar, R. R., Panilaitis, B., & Kaplan, D. L. (2005). Triggered release of proteins from emulsan–alginate beads. *Journal of Controlled Release*, *109*(1-3), 149–157. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.042

Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S., & Bassi, R. (2014). Domestication of the green alga Chlorella sorokiniana: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, *7*(1), 157.

doi:10.1186/s13068-014-0157-z

Chen, H., Jiang, J.-G., & Wu, G.-H. (2009). Effects of salinity changes on the growth of Dunaliella salina and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 6178–82. doi:10.1021/jf900447r

Chen, W., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Bioresource Technology Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, *102*(1), 135–141. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.076

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009a). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, *77*(1), 41–47. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.001

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009b). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, *77*(1), 41–7. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.001

Chen, Z., Gong, Y., Fang, X., & Hu, H. (2012). Scenedesmus sp. NJ-1 isolated from Antarctica: a suitable renewable lipid source for biodiesel production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(11), 3219–3225. doi:10.1007/s11274-012-1132-0

Cirulis, J. T., Strasser, B. C., Scott, J. a, & Ross, G. M. (2012). Optimization of staining conditions for microalgae with three lipophilic dyes to reduce precipitation and fluorescence variability. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *81*(7), 618–26. doi:10.1002/cyto.a.22066

Cleine, J. H., & Dixon, K. E. (1985). The effect of egg rotation on the differentiation of primordial germ cells in Xenopus laevis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *90*(1), 79–99.

Cole, J. J. (1982). INTERACTIONS BETWEEN BACTERIA AND ALGAE IN AQUATIC ECOSYSTEMS. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, *13*(1982), 291–314.

Collins, S., & Bell, G. (2004). Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO2 in a green alga. *Nature*, *431*(7008), 566–9. doi:10.1038/nature02945

Collins, S., Sültemeyer, D., & Bell, G. (2006). Changes in C uptake in populations of Chlamydomonas reinhardtii selected at high CO2. *Plant, Cell and Environment*, *29*(9), 1812–1819. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01559.x

Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., & Harrison, P. J. (1999). An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, *11*(2), 179–184. doi:10.1023/A:1008046023487

Combe, C., Hartmann, P., Rabouille, S., Talec, A., Bernard, O., & Sciandra, A. (2015). Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote Dunaliella salina. *Biotechnology and Bioengineering*, *9999*(xxx), n/a–

n/a. doi:10.1002/bit.25526

Converti, A., Casazza, A. a., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *48*(6), 1146–1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006

Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A., & Callis, P. R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods*, *6*(6), 333–345. doi:10.1016/0167-7012(87)90019-4

Cooper, M. S., D'Amico, L. A., & Henry, C. A. (1999). Confocal microscopic analysis of morphogenetic movements. *Methods in Cell Biology, Vol 59*, *59*, 179–+.

Cooper, M. S., Hardin, W. R., Petersen, T. W., & Cattolico, R. A. (2010). Visualizing "green oil" in live algal cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *109*(2), 198–201. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.08.004

Costas, E., Huertas, E. I., Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., & López-Rodas, V. (2014). Phytoplankton Ability to Physiological Acclimatization and Genetic Adaptation to Global Warming. *International Journal of Biology*, *6*(4), 24–36. doi:10.5539/ijb.v6n4p24

Dale, L., Smith, J. C., & Slack, J. M. W. (1985). Mesoderm induction in Xenopus laevis: a quantitative study using a cell lineage label and tissue-specific antibodies. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *89*(1), 289–312.

Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(31), 12788–12793. doi:10.1073/pnas.0902080106

Davidi, L., Katz, A., & Pick, U. (2012). Characterization of major lipid droplet proteins from Dunaliella. *Planta*, *236*(1), 19–33. doi:10.1007/s00425-011-1585-7

Davis, R. W., Volponi, J. V., Jones, H. D. T., Carvalho, B. J., Wu, H., & Singh, S. (2012). Multiplex fluorometric assessment of nutrient limitation as a strategy for enhanced lipid enrichment and harvesting of Neochloris oleoabundans. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(10), 2503–2512. doi:10.1002/bit.24517

De Gottardi, A., Vinciguerra, M., Sgroi, A., Moukil, M., Ravier-Dall'Antonia, F., Pazienza, V., … Hadengue, A. (2007). Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *87*(8), 792–806. doi:10.1038/labinvest.3700590

De la Hoz Siegler, H., Ayidzoe, W., Ben-Zvi, A., Burrell, R. E., & McCaffrey, W. C. (2012). Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures. *Algal Research*, *1*(2), 176–184. doi:10.1016/j.algal.2012.07.004

de la Jara, A., Mendoza, H., Martel, A., Molina, C., Nordstron, L., de la Rosa, V., & Diaz, R. (2003). Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, Crypthecodinium cohnii. *Journal of Applied Phycology*, *15*(5), 433–438. doi:10.1023/A:1026007902078

De Mooij, T., Janssen, M., Cerezo-Chinarro, O., Mussgnug, J. H., Kruse, O., Ballottari, M., … Wijffels, R. H. (2015). Antenna size reduction as a strategy to increase biomass productivity: a great potential not yet realized. *Journal of Applied Phycology*, *27*(3), 1063–1077. doi:10.1007/s10811-014-0427-y

Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5601), 2149–53. doi:10.1126/science.1078002

Devos, N., Ingouff, M., Loppes, R., & Matagne, R. F. (1998). Rubisco adaptation to low temperatures: a comparative study in psychrophilic and mesophilic unicellular algae. *Journal of Phycology*, *34*(4), 655–660. doi:10.1046/j.1529-8817.1998.340655.x

Diaz, G., Melis, M., Batetta, B., Angius, F., & Falchi, A. M. (2008). Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*, *39*(7), 819–824. doi:10.1016/j.micron.2008.01.001

Dittami, S. M., Duboscq-Bidot, L., Perennou, M., Gobet, A., Corre, E., Boyen, C., & Tonon, T. (2015). Host–microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *The ISME Journal*, (June), 2015. doi:10.1038/ismej.2015.104

Doan, T. T. Y., & Obbard, J. P. (2012). Enhanced intracellular lipid in Nannochloropsis sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Algal Research*, *1*(1), 17–21. doi:10.1016/j.algal.2012.03.001

Doan, T. T. Y., Sivaloganathan, B., & Obbard, J. P. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy*, *35*(7), 2534–2544. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.021

Doan, T.-T. Y., & Obbard, J. P. (n.d.). Enhanced lipid production in Nannochloropsis sp. using fluorescence-activated cell sorting. *GCB Bioenergy*, *3*(3), 264–270. doi:10.1111/j.1757-1707.2010.01076.x

Doan, T.-T. Y., & Obbard, J. P. (2010). Improved Nile Red staining of Nannochloropsis sp. *Journal of Applied Phycology*, *23*(5), 895–901. doi:10.1007/s10811-010-9608-5

Droop, M. (1966). Vitamin B 12 and marine ecology. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, *i*, 629–636. Retrieved from http://journals.cambridge.org/production/action/cjoGetFulltext?fulltextid=4365368

Droop, M. R. (1968). Vitamin B12 and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in Monochrysis Lutheri. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, *48*(03), 689–733. doi:10.1017/S0025315400019238

Dutta, A. K., Kamada, K., & Ohta, K. (1996). Spectroscopic studies of nile red in organic

solvents and polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *93*(1), 57–64. doi:10.1016/1010-6030(95)04140-0

Ecofys. (2013). Biofuels and food security Risks and opportunities Biofuels and food security Risks and opportunities, 29.

Elle, I. C., Olsen, L. C. B., Pultz, D., Rødkær, S. V., & Færgeman, N. J. (2010). Something worth dyeing for: Molecular tools for the dissection of lipid metabolism in Caenorhabditis elegans. *FEBS Letters*, *584*(11), 2183–2193. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.046

Elsey, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, *68*(3), 639–42. doi:10.1016/j.mimet.2006.11.008

Eppley, R. W. (1972). Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fishery Bulletin*, *70*(4).

Espinosa-Mansilla, a., Salinas, F., del Olmo, M., & de Orbe Payá, I. (1996). Determination of Synthetic Food Antioxidants in Multicomponent Mixtures Using UV-Visible Spectrophotometry and Partial Least-Squares Calibration. *Applied Spectroscopy*, *50*(4), 449–453. doi:10.1366/0003702963906131

Etude ENEA, & INRIA. (2014). ÉVALUATION DU GISEMENT POTENTIEL DE RESSOURCES ALGALES POUR L ' ENERGIE ET LA CHIMIE EN FRANCE A HORIZON 2030.

Ezequiel, J., Laviale, M., Frankenbach, S., Cartaxana, P., & Serôdio, J. (2015). Photoacclimation state determines the photobehaviour of motile microalgae: The case of a benthic diatom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *468*, 11–20. doi:10.1016/j.jembe.2015.03.004

Fabregas, J., Maseda, A., Dom, A., Ferreira, M., & Otero, A. (2002). Changes in the cell composition of the marine microalga , Nannochloropsis gaditana , during a light : dark cycle. *Cultures*, (Ccmp 527), 1699–1703.

Falkowski, P. G. (1980). Light–shade adaptation in marine phytoplankton. In *Primary productivity in the sea* (pp. 99–120).

Feng, G.-D., Zhang, F., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., & Chen, H.-L. (2013). Evaluation of FT-IR and Nile Red methods for microalgal lipid characterization and biomass composition determination. *Bioresource Technology*, *128*(0), 107–112. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.123

Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. a., Kawano, S., Bišová, K., … Vítová, M. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga Parachlorella kessleri. *Bioresource Technology*, *144*, 268–274. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.096

Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V, & Raven, J. a. (2010). Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*, *32*(1), 119–137. doi:10.1093/plankt/fbp098

Fisher, T., Minnaard, J., & Dubinsky, Z. (1996). Photoacclimation in the marine alga Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyte): a kinetic study. *Journal of Plankton Research*, *18*(10), 1797–1818. doi:10.1093/plankt/18.10.1797

Forcato, D. O., Carmine, M. P., Echeverría, G. E., Pécora, R. P., & Kivatinitz, S. C. (2005). Milk fat content measurement by a simple UV spectrophotometric method: an alternative screening method. *Journal of Dairy Science*, *88*(2), 478–481. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72709-0

Fowler, S. D., & Greenspan, P. (1985). Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *33*(8), 833–836. doi:10.1177/33.8.4020099

Frenkel, J., Vyverman, W., & Pohnert, G. (2014). Pheromone signaling during sexual reproduction in algae. *The Plant Journal*, *79*(4), 632–644. doi:10.1111/tpj.12496

García, F., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2007). Physiological characterization of Dunaliella sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*, *98*(7), 1359–65. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.051

Gardner, R. D., Cooksey, K. E., Mus, F., Macur, R., Moll, K., Eustance, E., … Peyton, B. M. (2012). Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte Scenedesmus sp. and the diatom Phaeodactylum tricornutum. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5), 1311–1320. doi:10.1007/s10811-011-9782-0

Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., & Cooksey, K. E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *Journal of Applied Phycology*, *23*(6), 1005–1016. doi:10.1007/s10811-010-9633-4

Geider, R. J. (1987). Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalagae and cyanobacteria: imoplication for physiology and growth of phytoplankton. *New Phytologist*, *106*(1), 1–34.

Ghoneim, N. (2000). Photophysics of Nile red in solution: steady state spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *56*(5), 1003–1010.

Gigova, L., Ivanova, N., Gacheva, G., Andreeva, R., & Furnadzhieva, S. (2012). Response of Trachydiscus Minutus (Xanthophyceae) To Temperature and Light1. *Journal of Phycology*, *48*(1), 85–93. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.01088.x

Gocze, P. M., & Freeman, D. A. (1994). Factors underlying the variability of lipid droplet

fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry*, *17*(2), 151–158. doi:10.1002/cyto.990170207

Gomez, P. I., & Mariela, G. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of dunaliella salina (chlorophyta) cultivated under laboratory conditions, 151–162.

González, R., García-Balboa, C., Rouco, M., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2012). Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicology*, *109*, 25–32. doi:10.1016/j.aquatox.2011.11.015

Gordillo, F., Goutx, M., Figueroa, F., & Niell, F. (1998). Effects of light intensity, CO 2 and nitrogen supply on lipid class composition of Dunaliella viridis. *Journal of Applied …*, 135–144. Retrieved from http://www.springerlink.com/index/T271HK066Q243U54.pdf

Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., & Bux, F. (2012a). BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.024

Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., & Bux, F. (2012b). BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, *114*, 507–11. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.024

Greenspan, P., & Fowler, S. D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. *Journal of Lipid Research*, *26*(7), 781–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4031658

Greenspan, P., Mayer, E., & Fowler, S. (1984). Use of Nile Red in Fluorescence Microscopy and Flow Cytometer Analysis. *Journal of Cell Biology*, *99*(4), A58–A58.

Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, *100*(3), 965–973. doi:10.1083/jcb.100.3.965

Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, *21*(5), 493–507. doi:10.1007/s10811-008-9392-7

Griffiths, M. J., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5), 989–1001. doi:10.1007/s10811-011-9723-y

Grobbelaar, J., & Soeder, C. (1985). Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. *Journal of Plankton Research*, *7*(4), 497–506. Retrieved from http://plankt.oxfordjournals.org/content/7/4/497.short

Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B., & Tremblin, G. (2010). Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine

microalgae Pavlova lutheri (Pavlovophyceae) and Odontella aurita (Bacillariophyceae). *Journal of Applied Phycology*, *22*(5), 629–638. doi:10.1007/s10811-010-9503-0

Guilbault, G. G. (1973). *Practical fluorescence; theory, methods, and techniques*. M. Dekker.

Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum*, 1975. Retrieved from http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Culture+of+phytoplankton+for+feeding+marine+invertebrates#0

Guschina, I. a, & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, *45*(2), 160–86. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001

Guzmán, H. M., Valido, A. de la J., Duarte, L. C., & Presmanes, K. F. (2010). Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from Tetraselmis suecica in response to culture conditions. *Aquaculture International*, *18*(2), 189–199. doi:10.1007/s10499-008-9235-1

Guzmán, H. M., Valido, A. de la J., Duarte, L. C., & Presmanes, K. F. (2011). Analysis of interspecific variation in relative fatty acid composition: use of flow cytometry to estimate unsaturation index and relative polyunsaturated fatty acid content in microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *23*(1), 7–15. doi:10.1007/s10811-010-9526-6

Guzmán, H. M., Valido, A. de la J., Presmanes, K. F., & Duarte, L. C. (2012). Quick estimation of intraspecific variation of fatty acid composition in Dunaliella salina using flow cytometry and Nile Red. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5), 1237–1243. doi:10.1007/s10811-011-9768-y

Hansen, S. R., & Hubbell, S. P. (1980). Single-nutrient microbial competition: qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes. *Science (New York, N.Y.)*, *207*(4438), 1491–1493. doi:10.1126/science.6767274

Harwati, T. U., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae Chlorococcum sp. *Bioresource Technology*, *121*, 54–60. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.098

Hirokawa, T., Hata, M., & Takeda, H. (1982). Correlation between the Starch Level and the Rate of Starch Synthesis during the Developmental Cycle of ChloreHa ellipsoidea. *Changes*, *23*(5), 813–820.

Hirsch, J., & Ahrens, E. H. (1958). The Separation of Complex Lipide Mixtures by the Use of Silicic Acid Chromatography The Separation of Complex Lipide Mixtures Silicic Acid Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*.

Ho, S., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J., & Kondo, A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review. *Biotechnology Advances*, *32*(8), 1448–1459. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.09.002

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A.

(2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, *54*(4), 621–639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x

Huang, G.-H., Chen, G., & Chen, F. (2009). Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass and Bioenergy*, *33*(10), 1386–1392. doi:10.1016/j.biombioe.2009.05.022

Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2010). Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *The New Phytologist*, *188*(2), 478–87. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03370.x

Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2011). Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *278*(1724), 3534–43. doi:10.1098/rspb.2011.0160

Huesemann, M. H., Hausmann, T. S., Bartha, R., Aksoy, M., Weissman, J. C., & Benemann, J. R. (2009). Biomass productivities in wild type and pigment mutant of cyclotella sp. (Diatom). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *157*, 507–526. doi:10.1007/s12010-008-8298-9

Huey, R. B., & Slatkin, M. (1976). cost and benefits of lizard thermoregulation. *The Quarterly Review Og Biology*, *51*(3), 363–384.

Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., & Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*, *31*(1), 2–16. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.007

Ira, & Krishnamoorthy, G. (2001). Probing the Link between Proton Transport and Water Content in Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, *105*(7), 1484–1488. doi:10.1021/jp003009w

Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I., & Elibol, M. (2012). Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by Chlorella saccharophila under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, *61*, 11–19. doi:10.1016/j.bej.2011.12.001

Jahnke, L. S., & White, A. L. (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga Dunaliella tertiolecta. *Journal of Plant Physiology*, *160*(10), 1193–202. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610888

Jasmin, J.-N., Dillon, M. M., & Zeyl, C. (2012). The yield of experimental yeast populations declines during selection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(July), 4382–4388. doi:10.1098/rspb.2012.1659

Jiménez, J., & Benítez, T. (1988). Selection of Ethanol-Tolerant Yeast Hybrids in pH-Regulated Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(4), 917–22. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=202573&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Johnson, a R., & Davenport, J. B. (1971). Biochemistry and methodology of lipids, 578.

Karni, L., & Avron, M. (1988). Ion content of the halotolerant alga Dunaliella salina. *Plant and Cell Physiology*, *29*(8), 1311–1314. Retrieved from http://pcp.oxfordjournals.org/content/29/8/1311.short

Katz, a., Jimenez, C., & Pick, U. (1995). Isolation and Characterization of a Protein Associated with Carotene Globules in the Alga Dunaliella bardawil. *Plant Physiology*, *108*(4), 1657–1664. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=157547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Khozin-Goldberg, I., Yu, H. Z., Adlerstein, D., Didi-Cohen, S., Heimer, Y. M., & Cohen, Z. (2000). Triacylglycerols of the red microalga Porphyridium cruentum can contribute to the biosynthesis of eukaryotic galactolipids. *Lipids*, *35*(8), 881–889. doi:10.1007/S11745-000-0597-8

Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, *56*(3), 331–338. doi:10.1016/j.mimet.2003.10.018

Kirst, H., Garcia-Cerdan, J. G., Zurbriggen, a., & Melis, a. (2012). Assembly of the Light-Harvesting Chlorophyll Antenna in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii Requires Expression of the TLA2-CpFTSY Gene. *Plant Physiology*, *158*(2), 930–945. doi:10.1104/pp.111.189910

Kirst, H., Garcia-Cerdan, J. G., Zurbriggen, a., Ruehle, T., & Melis, a. (2012). Truncated photosystem chlorophyll antenna size in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii upon deletion of the TLA3-CpSRP43 gene. *Plant Physiology*, *160*(December), 2251–2260. doi:10.1104/pp.112.206672

Klok, A. J., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2013). Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresource Technology*, *134*, 233–43. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.006

Klotzsch, S. G., & McNamara, J. R. (1990). Triglyceride measurements: A review of methods and interferences. *Clinical Chemistry*, *36*(9), 1605–1613.

Knies, J. L., Kingsolver, J. G., & Burch, C. L. (2009). Hotter is better and broader: thermal sensitivity of fitness in a population of bacteriophages. *The American Naturalist*, *173*(4), 419–430. doi:10.1086/597224

Kobayashi, Y., Harada, N., Nishimura, Y., Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., … Misumi, O. (2014). Algae Sense Exact Temperatures: Small Heat Shock Proteins Are Expressed at the Survival Threshold Temperature in Cyanidioschyzon merolae and Chlamydomonas reinhardtii. *Genome Biology and Evolution*, *6*(10), 2731–2740. doi:10.1093/gbe/evu216

Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, *6*, 52–63. doi:10.1016/j.algal.2014.09.002

Krol, M., Maxwell, D. P., & Huner, N. P. a. (1997). Exposure of Dunaliella salina to low temperature mimics the high light-induced accumulation of carotenoids and the carotenoid binding protein (Cbr). *Plant and Cell Physiology*, *38*(2), 213–216.

Lachapelle, J., & Bell, G. (2012). Evolutionary Rescue of Sexual and Asexual Populations in a Deteriorating Environment. *Evolution*, *66*(11), 3508–3518. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01697.x

Lacour, T. (2010, October). *Influence du statut azoté et du cycle lumineux diurne ur le métabolisme lipidique d'Isochrysis sp. (Haptophyceae).* Aix Marseille 2.

Lacour, T. (2011). *Influence du statut azoté et du cycle lumineux diurne sur le métabolisme lipidique d ' Isochrysis sp . (Haptophyceae). Thèse*.

Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P., & Bernard, O. (2012a). Diel Variations of Carbohydrates and Neutral Lipids in Nitrogen-Sufficient and Nitrogen-Starved Cyclostat Cultures of Isochrysis Sp.1. *Journal of Phycology*, no–no. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01177.x

Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P., & Bernard, O. (2012b). Neutral Lipid and Carbohydrate Productivities As a Response To Nitrogen Status in Isochrysis Sp. (T-Iso; Haptophyceae): Starvation Versus Limitation1. *Journal of Phycology*, *48*(3), 647–656. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01154.x

Ladygin, V. G. (2014). Biogenesis and possible modification of carotenoid composition in the eyespot of Chlamydomonas reinhardtii mutants. *Microbiology*, *83*(1-2), 30–38. doi:10.1134/S0026261714020131

Lakowicz, J. (Ed.). (2006). Quenching of Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 277–330). Springer US.

Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2008). Exploring and exploiting carotenoid accumulation in Dunaliella salina for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology*, *26*(11), 631–8. doi:10.1016/j.tibtech.2008.07.002

Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved Dunaliella salina, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, *162*(1), 21–7. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.04.018

Lamers, P. P., van de Laak, C. C. W., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C. H., … Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed Dunaliella salina. *Biotechnology and Bioengineering*, *106*(4), 638–48. doi:10.1002/bit.22725

Lardon, L., HeÌ lias, A., Sialve, B., Steyer, J., & Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology Science & Technology*, 6475–6481. Retrieved from http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es900705j

Laurens, L. M. L., & Wolfrum, E. J. (2010). Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass. *BioEnergy Research*, *4*(1), 22–35. doi:10.1007/s12155-010-9098-y

Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., … Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for Dunaliella cultures. *Algal Research*, *2*(3), 212–222. doi:10.1016/j.algal.2013.05.003

Le Floc'h, E., Malara, G., & Sciandra, A. (2003). An automatic device for in vivo absorption spectra acquisition and chlorophyll estimation in phytoplankton cultures, 435–444.

Lee, S. J., Yoon, B., & Oh, H. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga Botryococcus braunii. *Biotechnology Techniques*, *12*(7), 553–556.

Lenski, R. E., Rose, M., Simpson, S., & Tadler, S. (1991). Long -term experimental evolution in Escherichia coli. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *American Naturalist*, *138*, 1315–1341.

Levins, R. (1968). Evolution in changing environments. *Princeton Univ Press Princeton NJ*, *2*(2), 120. doi:10.2307/2173276

Lewis, W. M. (1983). Interruption of synthesis as a cost of sex in small organisms. *The American Naturalist*, *121*(6), 825–833.

Lewontin, R. C. (1974). The Genetic Basis of evolutionary change. *Columbia University Press*.

Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*, 350–382. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987480361

Lison, L. (1935). Sur le mécanisme et la signification de la coloration des lipides par le bleu de Nil. (Bull. Hist., Vol. 12, pp. 279–289).

Listenberger, L. L., & Brown, D. A. (2007). Fluorescent Detection of Lipid Droplets and Associated Proteins. In *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.

López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marva, F., García, M. E., & Costas, E. (2007). Resistance to glyphosate in the cyanobacterium Microcystis

aeruginosa as result of pre-selective mutations. *Evolutionary Ecology*, *21*(4), 535–547. doi:10.1007/s10682-006-9134-8

Loudet, A., & Burgess, K. (2007). BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chemical Reviews*, *107*(11), 4891–4932. doi:10.1021/cr078381n

Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*, *28*(6), 491–511. doi:10.1038/nature10260

Mach, H., Middaugh, C. R., & Denslow, N. (2001). Determining the identity and purity of recombinant proteins by UV absorption spectroscopy. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, *Chapter 7*(1995), Unit 7.2. doi:10.1002/0471140864.ps0702s01

MacIntyre, H. L., & Cullen, J. J. (2005). *Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae*. *Algal Culture Techniques*.

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., & Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, *38*(1), 17–38. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x

Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., & Sciandra, A. (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga Isochrysis aff. galbana under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, *102*(1), 142–9. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.138

Manandhar-Shrestha, K., & Hildebrand, M. (2013). Development of flow cytometric procedures for the efficient isolation of improved lipid accumulation mutants in a Chlorella sp microalga. *Journal of Applied Phycology*, *25*(6), 1643–1651. doi:10.1007/s10811-013-0021-8

Marchetti, J., Bougaran, G., & Dean, L. Le. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of Isochrysis affinis galbana relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, *326-329*, 106–115. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611009094

Marvá, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro, M., Toro, F. J., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2010). Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicology*, *96*(2), 130–134. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.009

Masci, P., Bernard, O., & Grognard, F. (2008). Continuous selection of the fastest growing species in the chemostat. In *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)* (Vol. 17). doi:10.3182/20080706-5-KR-1001.3265

Massart, A., Aubry, E., & Hantson, A.-L. (2010). Study of culture strategies of Dunaliella tertiolecta combining high cell density and accumulation of lipids to produce biodiesel.

Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement, *14*, 567–572.

Mata, T. M., Martins, A. a., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020

Matthews, H. D., Graham, T. L., Keverian, S., Lamontagne, C., Seto, D., & Smith, T. J. (2014). National contributions to observed global warming. *Environmental Research Letters*, *9*(1), 014010. doi:10.1088/1748-9326/9/1/014010

Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, *51*(345), 659–668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659

Mayzaud, P., & Martin, J. (1975). Some aspects of the biochemical and mineral composition of marine plankton. *Journal of Experimental Marine Biology and …*, *17*, 297–310. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022098175900052

Mchowat, J., Mchowat, J., Jones, J. H., Jones, J. H., Creer, M. H., & Creer, M. H. (1996). Quantification of individual phospholipid molecular spcecies by UV absorption measurements. *Journal Of Lipid Research*, *37*, 2450–2460.

Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, *177*, 272–280. doi:10.1016/j.plantsci.2009.06.005

Melis, A., Neidhardt, J., & Benemann, J. R. (1998). Dunaliella salina (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, *10*, 515–525. doi:10.1023/A:1008076231267

Mendoza, H., de la Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., Ramos, A. A., de Sousa Duarte, V., & Serafim Varela, J. C. (2008). Characterization of Dunaliella salina strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, *11*(4). doi:10.2225/vol11-issue4-fulltext-2

Mendoza, H., Martel, A., Río, M. Del, & Reina, G. (1999). Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in Dunaliella salina. *Journal of Applied …*, (201631), 15–19. Retrieved from http://www.springerlink.com/index/M366360278212X85.pdf

Mendoza, H., & Río, M. Del. (1996). Low-temperature-induced Î²-carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in Dunaliella salina (Chlorophyta). *European Journal of …*, (September 2011), 8–11. Retrieved from http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670269600651551

Menschik, Z. (2009). Nile Blue Histochemical Method for Phospholipids. *Biotechnic and Histochemistry*, *28*(1), 13–18.

Mitra, M., Kirst, H., Dewez, D., & Melis, A. (2012). Modulation of the light-harvesting chlorophyll antenna size in Chlamydomonas reinhardtii by TLA1 gene over-expression

and RNA interference. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *367*(1608), 3430–43. doi:10.1098/rstb.2012.0229

Mocquet, C., Sciandra, A., Talec, A., & Bernard, O. (2013). Cell cycle implication on nitrogen acquisition and synchronization in Thalassiosira weissflogii (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *49*(2), 371–380. doi:10.1111/jpy.12045

Molina-Grima, E., Camacho, F. G., Pérez, J. A. S., & Sánchez, J. L. G. (1994). Biochemical productivity and fatty acid profiles of Isochrysis galbana Parke and Tetraselmis sp. as a function of incident light intensity. *Process Biochemistry*, *29*(2), 119–126. doi:10.1016/0032-9592(94)80004-9

Molina-Grima, E., Fernández Sevilla, J. M., Sánchez Pérez, J. a., & García Camacho, F. (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, *45*(1), 59–69. doi:10.1016/0168-1656(95)00144-1

Monod, J. (1950). La technique de culture continue, théorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur*, *79*(19), 390–401.

Montero, M. F., Aristizabal, M., & Garcia Reina, G. (2011). Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga Tetraselmis suecica for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Applied Phycology*, *23*(6), 1053–1057. doi:10.1007/s10811-010-9623-6

Mooij, P. R., de Graaff, D. R., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2014). Starch productivity in cyclically operated photobioreactors with marine microalgae—effect of ammonium addition regime and volume exchange ratio. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-014-0430-3

Mooij, P. R., & Kleerebezem, R. (2013). Survival of the fattest. *Energy & Environmental Science*, *2013*, 3404–3406. doi:10.7554/eLife.01760

Mooij, P. R., Stouten, G. R., Loosdrecht, M. C. M. Van, & Kleerebezem, R. (2015). Ecology-based selective environments as solution to contamination in microalgal cultivation. *Current Opinion in Biotechnology*, *33*, 46–51. doi:10.1016/j.copbio.2014.11.001

Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals From Lipids With Boron Fluoride--Methanol. *Journal of Lipid Research*, *5*(1 3), 600–608.

Mortain-Bertrand, a., Descolas-Gros, C., & Jupin, H. (1988). Growth, photosynthesis and carbon metabolism in the temperate marine diatom Skeletonema costatum adapted to low temperature and low photon-flux density. *Marine Biology*, *100*(1), 135–141. doi:10.1007/BF00392963

Mou, S., Xu, D., Ye, N., Zhang, X., Liang, C., Liang, Q., … Miao, J. (2012). Rapid estimation of lipid content in an Antarctic ice alga (Chlamydomonas sp.) using the

lipophilic fluorescent dye BODIPY505/515. *Journal of Applied Phycology*, *24*(5), 1169–1176. doi:10.1007/s10811-011-9746-4

Murphy, J. J., Furusho, H., Paton, R. M., & Nomura, K. (2007). Precise synthesis of poly(macromonomer)s containing sugars by repetitive ROMP and their attachments to poly(ethylene glycol): synthesis, TEM analysis and their properties as amphiphilic block fragments. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, *13*(32), 8985–97. doi:10.1002/chem.200700291

Mussgnug, J. H., Thomas-Hall, S., Rupprecht, J., Foo, A., Klassen, V., McDowall, A., … Hankamer, B. (2007). Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnology Journal*, *5*(6), 802–814. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00285.x

Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., & Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, *102*(1), 57–70. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.077

Myklestad, S. M. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of the Total Environment*, *165*, 155–164. doi:10.1016/0048-9697(95)04549-G

Nakajima, Y., & Ueda, R. (1997). Improvement of photosynthesis in dense microalgal suspension by reduction of light harvesting pigments. *Journal of Applied Phycology*, *9*, 503–510. doi:10.1023/A:1007920025419

Nakajima, Y., & Ueda, R. (2000). The effect of reducing light-harvesting pigment on marine microalgal productivity. *J Appl Phycol*, *12*(3-5), 285–290.

Neidhardt, J., Benemann, J. R., Zhang, L., & Melis, A. (1998). Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: Relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in Dunaliella salina (green algae). *Photosynthesis Research*, *56*, 175–184. doi:10.1023/A:1006024827225

Nelson, G. J. (1967). Automated gradient-elution column chromatography of lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *44*(2), 86–94. doi:10.1007/BF02558160

Nielsen, M. V. (1992). Irradiance and daylength effects on growth and chemical composition of *Gyrodinium aureolum* Hulburt in culture. *Journal of Plankton Research*, *14*(6), 811–820. doi:10.1093/plankt/14.6.811

Notman, R., Noro, M., O'Malley, B., & Anwar, J. (2006). Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(43), 13982–3. doi:10.1021/ja063363t

Novick, A., & Szilard, L. (1950). Description of the Chemostat. *Science*, *112*(2920), 715–716. doi:10.1126/science.112.2920.715

O'Rourke, E. J., Soukas, A. A., Carr, C. E., & Ruvkun, G. (2009). C. elegans Major Fats Are Stored in Vesicles Distinct from Lysosome-Related Organelles. *Cell Metabolism*, *10*(5), 430–435. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.002

Olive, J., Wollman, F. a, Bennoun, P., & Recouvreur, M. (1981). Ultrastructure of thylakoid membranes in C. reinhardtii: evidence for variations in the partition coefficient of the light-harvesting complex-containing particles upon membrane fracture. *Arch Biochem Biophys*, *208*(2), 456–467. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7259199\nhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986181905324

Olsen, Y., Vadstein, O., Andersen, T., & Jensen, A. (1989). Competition between Staurastrum leutkemuellerii (chlorophyceae) and Microcystis aeruginosa (cyanaophyceae) under varying modes of phosphate supply. *Journal of Phycology*, *25*, 499–508.

Oren, A. (2005). A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005. *Saline Systems*, *1*, 2. doi:10.1186/1746-1448-1-2

Oren, A., & Dubinsky, Z. (1994). On the red coloration of saltern crystallizer ponds . II . Additional evidence for the contribution of halobacterial pigments. *International Journal of Salt Lake Research*, *3*(9 - 13), 9–13.

Orset, S., & Young, a J. (1999). LOW-TEMPERATURE-INDUCED SYNTHESIS OF a-CAROTENE IN THE MICROALGA DUNALIELLA SALINA (CHLOROPHYTA). *Journal of Phycology*, *35*(3), 520–527.

Packer, A., Li, Y., Andersen, T., Hu, Q., Kuang, Y., & Sommerfeld, M. (2011). Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: a mathematical model. *Bioresource Technology*, *102*(1), 111–7. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.029

Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C. V., … Varela, J. (2011). Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, *4*(1), 61. doi:10.1186/1754-6834-4-61

Perin, G., Bellan, A., Segalla, A., Meneghesso, A., Alboresi, A., & Morosinotto, T. (2015). Generation of random mutants to improve light-use efficiency of Nannochloropsis gaditana cultures for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 161. doi:10.1186/s13068-015-0337-5

Pick, U. (2004). Adaptation of the Halotolerant Alga Dunaliella to High Salinity. In A. Läuchli & U. Lüttge (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules* (pp. 97–112). Springer Netherlands.

Pick, U., & Rachutin-Zalogin, T. (2012). Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, *88*(2), 189–196. doi:10.1016/j.mimet.2011.10.008

Platt, T., & Gallegos, C. L. (1980). Modelling Primary Production. *Primary Productivity in*

the Sea, *19*, 339–362. doi:10.1007/978-1-4684-3890-1_19

Polle, J. E. W., Kanakagiri, S.-D., & Melis, A. (2003). tla1, a DNA insertional transformant of the green alga Chlamydomonas reinhardtii with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta*, *217*, 49–59. doi:10.1007/s00425-002-0968-1

Priscu, J. C., Priscu, L. R., Palmisano, A. C., & Sullivan, C. W. (2004). Estimation of neutral lipid levels in Antarctic sea ice microalgae by nile red fluorescence. *Antarctic Science*, *2*(02). doi:10.1017/S0954102090000190

Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with Neochloris oleoabundans in photobioreactor. *Bioresource Technology*, *100*(23), 5988–95. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.004

Pruvost, J., Vooren, G. Van, Gouic, B. Le, Couzinet-mossion, A., & Legrand, J. (2011). Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource Technology*, *102*(1), 150–158. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.153

Quarmby, L. M., Turpin, D. H., & Harrison, P. J. (1982). Physiological responses of two marine diatoms to pulsed additions of ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *63*(2), 173–181. doi:10.1016/0022-0981(82)90030-2

Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J., Hugueney, P., & Kleinig, H. (1998). Induced beta-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga dunaliella bardawil. *Plant Physiology*, *116*(4), 1239–48. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=35030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Ras, M., Steyer, J., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnologies*, 153–164. doi:10.1007/s11157-013-9310-6

Reboud, X., & Majerus, N. (2007). Chlamydomonas reinhardtii as a model system for proâ€ active herbicide resistance evolution research. *Biological Journal of the Linnean Society*, *91*(2), 257–266. doi:10.1111/j.1095-8312.2007.00787.x

Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L. Van, Kuo, C., Padovan, A., & Sammy, N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of Isochrysis sp. and Nannochloropsis oculata for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *3*(1), 43–53. doi:10.1007/BF00003918

Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, *211*(1-4), 195–214. doi:10.1016/S0044-8486(01)00875-4

Renaud, S. M., Zhou, H., & Parry, D. (1995). Efect of temperature on the growth, total lipid

content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae Isochrysis sp., Nitzschia closterium, Nitzschia paleacea, and commercial species Isochrysis sp.(clone T. *Journal of Applied …*, 595–602. Retrieved from http://link.springer.com/article/10.1007/BF00003948

Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(1), 100–112. doi:10.1002/bit.22033

Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leakey, R. J. G., Day, J. G., Bell, E. M., & Stanley, M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*, *129*, 439–49. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.043

Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2012). Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic Toxicology*, *124-125*, 227–237. doi:10.1016/j.aquatox.2012.08.001

Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., … Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, *8*, 1–16. doi:10.1186/s13068-015-0220-4

Ruvinov, S., Yang, X., Parris, K., Banik, U., Ahmed, S., Miles, E., & Sackett, D. (1995). Ligand-Mediated Changes in the Tryptophan Synthase Indole Tunnel Probed. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(11), 6357–6369.

Sackett, D. L., & Wolff, J. (1987). Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Analytical Biochemistry*, *167*(2), 228–234. doi:10.1016/0003-2697(87)90157-6

Santos, a. M., Janssen, M., Lamers, P. P., Evers, W. a C., & Wijffels, R. H. (2012). Growth of oil accumulating microalga Neochloris oleoabundans under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology*, *104*, 593–599. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.084

Saoudi-helis, L., Dubacq, J., Marty, Y., Samain, J., & Gudin, C. (1994). Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga Isochrysis aff . galbana clone T . iso. *Changes*, *6*(3), 315–322.

Savitzky, A., & Golay, M. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, *36*(8), 1627–1639. Retrieved from http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60214a047

Schmidt, M., Gessner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., … Kreimer, G. (2006). Proteomic analysis of the eyespot of Chlamydomonas reinhardtii provides novel insights into its components and tactic movements. *The Plant Cell*, *18*(8), 1908–1930. doi:10.1105/tpc.106.041749

Sciandra, A. (1991). Coupling and Uncoupling Between Nitrate Uptake and Growth Rate in Prorocentrum minimum(Dinophyceae) under Different Freqencies of Pulsed Nitrate. *Marine Ecology Progress Series MESEDT,*. Retrieved from http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Coupling+and+uncoupling+between+nitrate+uptake+and+growth+rate+in+prorocentrum+minimum+(dinophyceae)+under+different+frequencies+of+pulsed+nitrate+supply#0

Sciandra, A., Harlay, J., Lefèvre, D., Lemée, R., Rimmelin, P., Denis, M., & Gattuso, J.-P. (2003). Response of coccolithophorid Emiliania huxleyi to elevated partial pressure of CO2 under nitrogen limitation. *Marine Ecology Progress Series*, *261*, 111–122. doi:10.3354/meps261111

Sciandra, A., Lazzara, L., Claustre, H., & Babin, M. (2000). Responses of growth rate, pigment composition and optical properties of Cryptomonas sp. to light and nitrogen stresses. *Marine Ecology Progress Series*, *201*(1), 107–120. doi:10.3354/meps201107

Sciandra, A., & Ramani, P. (1994). The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *178*, 1–15.

Semple, K. T., Cain, R. B., & Schmidt, S. (1999). Biodegradation of Aromatic Compounds by Halophilic Archaea, *170*(May 2006), 57477.

Shaish, A., Avron, M., Pick, U., & Ben-Amotz, A. (1993). Are active oxygen species involved in induction of béta-carotene in dunaliella bardawil. *Cell*, 363–368.

Shifrin, N. S., & Chisholm, S. W. (1981). Phytoplankton Lipids: Interspecific Differences and Effects of Nitrate, Silicate and Light-Dark Cycles. *Journal of Phycology*, *17*(4), 374–384. doi:10.1111/1529-8817.ep10996238

Shin, H. Y., Ryu, J. H., Bae, S. Y., Crofcheck, C., & Crocker, M. (2014). Lipid extraction from Scenedesmus sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. *Fuel*, *130*, 66–69. doi:10.1016/j.fuel.2014.04.023

Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., … Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga Chlamydomonas reinhardtii: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, *11*(1), 7. doi:10.1186/1472-6750-11-7

Simionato, D., Sforza, E., Corteggiani Carpinelli, E., Bertucco, A., Giacometti, G. M., & Morosinotto, T. (2011). Acclimation of Nannochloropsis gaditana to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technology*, *102*(10), 6026–6032. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.100

Sitepu, I. R., Ignatia, L., Franz, A. K., Wong, D. M., Faulina, S. A., Tsui, M., … Boundy-Mills, K. (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of Microbiological Methods*, *91*(2), 321–328. doi:10.1016/j.mimet.2012.09.001

Skrzecz, A., Shaw, D. G., & Maczynski, A. (1999). IUPAC-NIST Solubility Data Series 69. Ternary Alcohol–Hydrocarbon–Water Systems. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *28*(4), 983. doi:10.1063/1.556052

Smith, B. M., Morrissey, P. J., Guenther, J. E., Nemson, J. a, Harrison, M. a, Allen, J. F., & Melis, a. (1990). Response of the Photosynthetic Apparatus in Dunaliella salina (Green Algae) to Irradiance Stress. *Plant Physiology*, *93*(4), 1433–1440. doi:10.1104/pp.93.4.1433

Smith, J. L. (1908). On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acid by oxazine dyes. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *12*(1), 1–4. doi:10.1002/path.1700120103

Soares, A. T., Silva, B. F., Fialho, L. L., Pequeno, M. A. G., Vieira, A. A. H., Souza, A. G., & Antoniosi Filho, N. R. (2013). Chromatographic characterization of triacylglycerides and fatty acid methyl esters in microalgae oils for biodiesel production. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, *5*(5). doi:10.1063/1.4821289

Sommer, U. (1985). Comparison between steady state and non-steady state competition: Experiments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, *30*(2), 335–346. doi:10.4319/lo.1985.30.2.0335

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96. doi:10.1263/jbb.101.87

Spudich, J., & Sager, R. (1980). Regulation of the Chlamydomonas cell cycle by light and dark. *The Journal of Cell Biology*, *85*(April). Retrieved from http://jcb.rupress.org/content/85/1/136.abstract

Sriharan, S., Bagga, D., & Nawaz, M. (1991). The effects of nutrients and temperature on biomass, growth, lipid production, and fatty acid composition of Cyclotella cryptica Reimann, Lewin, and Guillard. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *28-29*(1), 317–326. doi:10.1007/BF02922611

Staats, N., Stal, L. J., & Mur, L. R. (2000). Exopolysaccharide production by the epipelic diatom, *249*, 13–27.

Steele, D. J., Franklin, D. J., & Underwood, G. J. C. (2014). Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling*, *30*(8), 987–998. doi:10.1080/08927014.2014.960859

Su, L.-C., Hsu, Y.-H., & Wang, H.-Y. (2012). Enhanced labeling of microalgae cellular lipids by application of an electric field generated by alternating current. *Bioresource Technology*, *111*, 323–327. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.180

Sukenik, A., & Carmeli, Y. (1990). Lipids synthesis and fatty acid composition in Nannochloropsis sp. (EUSTIGMATOPHYCEAE) grown in a light dark cycle. *Journal of Phycology*, *26*, 463–469.

Suman, K., Kiran, T., Devi, U. K., & Sarma, N. S. (2012). Culture medium optimization and lipid profiling of Cylindrotheca, a lipid- and polyunsaturated fatty acid-rich pennate diatom and potential source of eicosapentaenoic acid. *Botanica Marina*, *55*(3). doi:10.1515/bot-2011-0076

Takache, H., Christophe, G., Cornet, J.-F., & Pruvost, J. (2010). Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae Chlamydomonas reinhardtii in two different geometries of photobioreactors. *Biotechnology Progress*, *26*(2), 431–40. doi:10.1002/btpr.356

Takagi, M., Karseno, & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(3), 223–6. doi:10.1263/jbb.101.223

Thakur, a, Kumar, H. D., & Cowsik, S. M. (2000). Effect of pH and inorganic carbon concentration on growth, glycerol production, photosynthesis and dark respiration of Dunaliella salina. *Cytobios*, *2000*(400), 69–74. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033642542&partnerID=40&md5=e46e911be38f15e8de4be088b4227715

Thompson, P. A., Guo, M., & Harrison, P. J. (1992). Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, *28*, 481–488.

Thompson, P. A., Guo, M., Harrison, P. J., & Whyte, J. N. C. (1992). Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, *28*(4), 488–497. doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00488.x

Traller, J. C., & Hildebrand, M. (2013). High throughput imaging to the diatom Cyclotella cryptica demonstrates substantial cell-to-cell variability in the rate and extent of triacylglycerol accumulation. *Algal Research*, *2*(3), 244–252. doi:10.1016/j.algal.2013.03.003

Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., & Huesemann, M. (2012). Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in Nannochloropsis Salina. *Energies*, *5*(3), 731–740. doi:10.3390/en5030731

Vanormelingen, P., Vanelslander, B., Sato, S., Gillard, J., Sabbe, K., & Vyverman, W. (2015). Heterothallic sexual reproduction in the model diatom Cylindrotheca Heterothallic sexual reproduction in the model diatom Cylindrotheca, *0262*(October). doi:10.1080/09670262.2013.772242

Velmurugan, N., Sung, M., Yim, S. S., Park, M. S., Yang, J. W., & Jeong, K. J. (2013). Evaluation of intracellular lipid bodies in Chlamydomonas reinhardtii strains by flow cytometry. *Bioresource Technology*, *138*, 30–37. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.078

Vergara, J. (1978). Nile blue fluorescence signals from cut single muscle fibers under voltage or current clamp conditions. *The Journal of General Physiology*, *72*(6), 775–800.

doi:10.1085/jgp.72.6.775

Vigeolas, H., Duby, F., Kaymak, E., Niessen, G., Motte, P., Franck, F., & Remacle, C. (2012). Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in Chlorella sorokiniana and Scenedesmus obliquus. *Journal of Biotechnology*, *162*(1), 3–12. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.03.017

Vines, A., McBean, G. J., & Blanco-Fernández, A. (2010). A flow-cytometric method for continuous measurement of intracellular Ca2+ concentration. *Cytometry Part A*, *77A*(11), 1091–1097. doi:10.1002/cyto.a.20974

Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.012

Vorst, P., Baard, R., & Mur, L. (1994). Effect of growth arrest on carotene accumulation and photosynthesis in Dunaliella. *Microbiology*. Retrieved from http://mic.sgmjournals.org/content/140/6/1411.short

Walter, J., & Biggin, M. D. (1997). Measurement of in vivo DNA binding by sequence-specific transcription factors using UV cross-linking. *Methods (San Diego, Calif.)*, *11*(2), 215–224. doi:10.1006/meth.1996.0408

Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of Dunaliella cultures. *Archives of Microbiology*, *367*, 360–367. Retrieved from http://www.springerlink.com/index/RJ938L256118J576.pdf

Wolfrum, E., & Laurens, L. (2012). Rapid compositional analysis of microalgae by NIR spectroscopy. *NIR News*, *23*(2), 9. doi:10.1255/nirn.1292

Wong, D. M., & Franz, A. K. (2013). A comparison of lipid storage in Phaeodactylum tricornutum and Tetraselmis suecica using laser scanning confocal microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(2), 122–128. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.026

Xu, D., Gao, Z., Li, F., Fan, X., Zhang, X., Ye, N., … Li, D. (2013). Detection and quantitation of lipid in the microalga Tetraselmis subcordiformis (Wille) Butcher with BODIPY 505/515 staining. *Bioresource Technology*, *127*, 386–390. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.068

Yang, J., Rasa, E., Tantayotai, P., Scow, K. M., Yuan, H., & Hristova, K. R. (2011). Mathematical model of Chlorella minutissima UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. *Bioresource Technology*, *102*(3), 3077–82. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.049

Young, E., & Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in Dunaliella tertiolecta (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of Phycology*, *905*, 897–905. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.2003.03042.x/full

Zeb, A., & Murkovic, M. (2010). Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plant and animal samples. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, *23*(2), 94–103. doi:10.1556/JPC.23.2010.2.1

Le monde fait face à une crise environnementale sans précédent, induite par l'action toujours plus marquée de l'homme sur son milieu. Depuis le début de l'ère industrielle, l'utilisation massive des énergies fossiles, a provoqué un dérèglement climatique planétaire. Les microalgues offrent la possibilité de produire des biocarburants avec une empreinte carbone réduite mais nécessitent encore de nombreuses améliorations pour être économiquement viables. Une de ces améliorations, à l'instar de l'agriculture moderne, réside dans la sélection de souches plus productives. Dans ce travail de thèse, nous avons développé la sélection par pression continue, consistant à utiliser les processus de l'évolution pour faire émerger des populations d'intérêt.

Une première voie explorée a consisté à utiliser la température, paramètre crucial de la croissance des microalgues, comme moteur de sélection. En soumettant une culture à des variations diurnes de température durant une année, nous sommes parvenus à adapter une souche de *Tisochrysis lutea* à une gamme de températures plus large, la rendant donc plus tolérante aux variations de ce paramètre.

La seconde voie a cherché à accroitre la capacité de *Cylindrotheca closterium* à emmagasiner ou au contraire à mobiliser son azote intracellulaire, propriété physiologiquement liée à sa capacité à produire des lipides. En forçant une population de microalgues à s'adapter à des apports discontinus d'azote (succession d'états de satiété et de carence), il a été possible de sélectionner les individus les plus riches en lipides.

Enfin, nous avons modifié l'appareil pigmentaire de *Tisochrisis lutea* pour la rendre plus transparente à la lumière. En soumettant cette espèce à une succession de chocs lumineux, il a été possible de sélectionner les individus possédant les antennes photosynthétiques les plus petites, permettant une productivité accrue.