



HAL
open science

Réponses physiologiques et biochimiques à une limitation nutritive en phosphore ou en azote sur la réorientation métabolique des lipides polaires chez différentes espèces de microalgues marines

Bing Huang

► **To cite this version:**

Bing Huang. Réponses physiologiques et biochimiques à une limitation nutritive en phosphore ou en azote sur la réorientation métabolique des lipides polaires chez différentes espèces de microalgues marines. Biologie animale. Le Mans Université, 2018. Français. NNT : 2018LEMA1021 . tel-02316169

HAL Id: tel-02316169

<https://theses.hal.science/tel-02316169>

Submitted on 15 Oct 2019

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.

THESE DE DOCTORAT DE

LE MANS UNIVERSITE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du Littoral
Spécialité : *Biologie des organismes*

Par

Bing HUANG

Réponses physiologiques et biochimiques à une limitation nutritive en phosphore ou en azote sur la réorientation métabolique des lipides polaires chez différentes espèces de microalgues marines

Thèse présentée et soutenue à **Le Mans Université, le 28 novembre 2018**
Unité de recherche : **Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA2160)**
Thèse N° : **2018LEMA1021**

Rapporteurs avant soutenance :

Juliette JOUHET Chargée de recherche CNRS UMR 5168, Grenoble
Antoine SCIANDRA Directeur de recherche CNRS UMR 7093, Villefranche sur Mer

Composition du Jury :

Président :	Benoît SCHOEFS	Professeur, Le Mans Université (<i>à préciser après la soutenance</i>)
Examineurs :	Michel LINDER	Professeur, Université de Lorraine
	Sébastien LEFEBVRE	Professeur, Université de Lille
Dir. de thèse :	Annick MORANT-MANCEAU	Professeur, Le Mans Université
Co-enc. de thèse :	Virginie MIMOUNI	Maître de conférences, Le Mans Université
	Gaël BOUGARAN	Cadre de recherche, IFREMER Nantes

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire Mer, Molécules et Santé (MMS) à Le Mans Université (au Mans et à Laval) et au laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues (PBA) de l'IFREMER à Nantes. Je voudrais remercier tous les membres de ces laboratoires pour leur accueil et leur sympathie.

Je tiens à remercier Annick MORANT-MANCEAU, ma directrice de thèse. Merci pour m'avoir soutenu dans la réalisation de cette thèse et consacré beaucoup de temps avec bonne humeur et patience. Un très grand merci à Virginie MIMOUNI et Gaël BOUGARAN qui m'ont aussi encadré durant ces trois années. Merci pour leurs conseils très précieux lors des problèmes rencontrés et de m'avoir permis de mener à bien mon travail.

Je tiens à remercier particulièrement Benoît SCHOEFS pour la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée à Le Mans Université en me proposant d'effectuer des stages au laboratoire MMS. Je tiens aussi à remercier très sincèrement Juliette JOUHET et Antoine SCIANDRA d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, et Michel LINDER et Sébastien LEFEBVRE d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Merci à Gaëtane WIELGOSZ-COLLIN et Anis LIMAMI d'avoir accompagné ce travail au cadre du comité de suivi de thèse et leurs critiques constructives qui m'ont permis de progresser énormément. Je voudrais également exprimer mes sincères remerciements à Justine MARCHAND qui m'a dirigé pour l'étude biomoléculaire, Bruno SAINT-JEAN, Brigitte MOREAU, Lionel ULMANN, Vincent BLANCKAERT, Stanislas THIRIET-RUPERT, Ewa LUKOMSKA, Vony RABESAOTRA et Frédérick NIEPCERON pour leur aide précieuse au cours des expérimentations.

Je remercie les stagiaires Adrien CADOUDAL et Léa MUSTIERE pour leur contribution à ce travail. Merci à Marie ZANELLA, Valérie JASTRZEBSKI, Isabelle MARTIN et Martine COME pour leur aide dans les commandes des réactifs et du matériel. Merci aussi à Gérard TREMBLIN pour ses encouragements amicaux.

Merci à Nathalie, Jean-Luc, Aurore, Vincent, Benoît, Yann, Françoise, Gaëlle, Rose-Marie, Marie-Thérèse, Romain, Parisa, Fiddy, Hélène, Charlotte, Florence, Claire, Manon, Myriam, Adrien, Matteo, Dung, Ikha, Mathieu, Maureen, Wided... pour leur gentillesse.

A mes grands-parents et mes parents pour leur soutien constant.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....1

PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE9

I.1 Métabolisme carboné et lipidique chez les microalgues.....11

I.1.1 Métabolisme carboné : de la photosynthèse à l'orientation du carbone.....11

I.1.2 Lipides chez les microalgues : définition et classification.....17

I.1.3 Synthèse des lipides chez les microalgues.....23

I.2 L'azote et le phosphore dans l'environnement et chez les microalgues.....31

I.2.1 L'azote.....32

I.2.2 Le phosphore.....34

I.3 Réponses à une limitation nutritive chez les microalgues.....40

I.3.1 Réponses à la limitation en azote.....40

I.3.2 Réponses à la limitation en phosphore.....41

I.3.2.1 Limitation en P sur le métabolisme carboné.....42

I.3.2.2 Limitation en P et remodelage des lipides membranaires.....45

PARTIE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....53

II.1 Matériel biologique.....55

II.1.1 *Phaeodactylum tricornutum*.....55

II.1.2 *Tisochrysis lutea*.....56

II.1.3 *Diacronema lutheri*.....57

II.1.4 Traitement axénique.....58

II.2 Conditions de culture.....59

II.2.1 Milieux de culture.....59

II.2.2 Conditions expérimentales.....59

II.3 Suivi des cultures.....61

II.3.1 Détermination de la densité cellulaire et du taux de croissance.....61

II.3.2 Détermination du volume cellulaire.....61

II.3.3 Dosage des éléments résiduels dans le milieu.....62

II.3.4 Dosage des quotas en C, N et P cellulaires.....62

II.4	Activité photosynthétique.....	63
II.4.1	Extraction et estimation de la teneur en pigments.....	63
II.4.2	Mesure de l'intensité photosynthétique et de la respiration.....	64
II.4.3	Mesure de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i>	65
II.5	Analyses biochimiques.....	68
II.5.1	Extraction et dosage des protéines et glucides solubles.....	68
II.5.2	Estimation des lipides neutres avec le Nile red.....	68
II.5.3	Extraction et dosage des lipides totaux.....	69
II.6	Analyses lipidiques.....	70
II.6.1	Séparation et caractérisation des lipides.....	70
II.6.1.1	Utilisation de standards.....	70
II.6.1.2	Séparation des classes lipidiques sur colonne de silice.....	71
II.6.1.3	Séparation par chromatographie sur couche mince.....	71
II.6.1.4	Identification des lipides.....	73
II.6.1.5	Quantification des lipides.....	73
II.6.2	Détermination des profils en acide gras.....	74
II.6.2.1	Obtention des esters méthyliques d'acides gras.....	74
II.6.2.2	Analyse des esters méthyliques d'acides gras par CPG.....	75
II.7	Quantification de l'expression des gènes d'intérêt.....	75
II.7.1	Extraction des ARN totaux et transcription inverse.....	75
II.7.2	PCR quantitative.....	76
II.7.2.1	Définition des amorces.....	77
II.7.2.2	Tests d'amorces.....	81
II.7.2.3	Expression relative.....	82
II.8	Analyses statistiques.....	83
PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....		85
CHAPITRE 1. Réponses physiologiques.....		87
III.1.1	Impacts d'une limitation en P ou en N sur la croissance des microalgues.....	89
III.1.1.1	Taux de croissance.....	89
III.1.1.2	Eléments résiduels dans les milieux de culture.....	91
III.1.1.3	Quotas cellulaires en P et N.....	94
III.1.1.4	Quota cellulaire de carbone.....	98
III.1.1.5	Volumes cellulaires.....	99
III.1.2	Impacts d'une limitation en P ou en N sur la photosynthèse.....	101
III.1.2.1	Teneur en pigments.....	101
III.1.2.2	Paramètres de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i>	107

III.1.2.2.1	Rendement quantique maximum de la photochimie du PS II (Φ_{P0})	107
III.1.2.2.2	Quenching photochimique (qP)	109
III.1.2.2.3	Rendement quantique effectif du PS II (Φ_{II})	110
III.1.2.2.4	Quenching non photochimique	112
III.1.2.2.5	Relaxation du quenching non photochimique (qN)	115
III.1.2.3	Emission d'oxygène	117
III.1.3	Conclusion	119
CHAPITRE 2.	Orientation du carbone	121
III.2.1	Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en protéines solubles	123
III.2.2	Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en glucides solubles	125
III.2.3	Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en lipides neutres	128
III.2.4	Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en lipides totaux	131
III.2.5	Conclusion	132
CHAPITRE 3.	Remodelage des lipides polaires	135
III.3.1	Caractérisation des lipides polaires	137
III.3.1.1	Séparation et identification des lipides polaires par CCM bidimensionnelle	137
III.3.1.2	Séparation et identification des lipides polaires par CCM monodimensionnelle	139
III.3.1.3	Classes des lipides polaires	142
III.3.2	Impacts d'une limitation en P ou en N sur le remodelage des lipides plastidiaux	145
III.3.2.1	Remodelage des lipides plastidiaux chez <i>P. tricornutum</i>	145
III.3.2.2	Remodelage des lipides plastidiaux chez <i>T. lutea</i>	147
III.3.2.3	Remodelage des lipides plastidiaux chez <i>D. lutheri</i>	148
III.3.3	Impacts d'une limitation en P ou en N sur le remodelage des lipides non-plastidiaux	149
III.3.3.1	Remodelage des lipides non-plastidiaux chez <i>P. tricornutum</i>	149
III.3.3.2	Remodelage des lipides non-plastidiaux chez <i>T. lutea</i>	151
III.3.3.3	Remodelage des lipides non-plastidiaux chez <i>D. lutheri</i>	153
III.3.4	Conclusion	154
CHAPITRE 4.	Expression des gènes d'intérêt	157
III.4.1	Expression des gènes d'intérêt chez <i>P. tricornutum</i>	159
III.4.1.1	Choix des gènes d'intérêt	159
III.4.1.2	Variations de l'expression des gènes d'intérêt	160
III.4.2	Expression des gènes d'intérêt chez <i>T. lutea</i>	166
III.4.2.1	Choix des gènes d'intérêt	166

III.4.2.2 Variations de l'expression des gènes d'intérêt.....	167
III.4.3 Conclusion.....	171
CHAPITRE 5. Composition en acides gras (AG).....	173
III.5.1 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la composition en AG des lipides neutres.....	175
III.5.1.1 Composition en AG des lipides neutres chez <i>P. tricornutum</i>	176
III.5.1.2 Composition en AG des lipides neutres chez <i>T. lutea</i>	178
III.5.1.3 Composition en AG des lipides neutres chez <i>D. lutheri</i>	180
III.5.2 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la composition en AG des glycolipides.....	182
III.5.2.1 Composition en AG des glycolipides chez <i>P. tricornutum</i>	183
III.5.2.2 Composition en AG des glycolipides chez <i>T. lutea</i>	184
III.5.2.3 Composition en AG des glycolipides chez <i>D. lutheri</i>	184
III.5.3 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides.....	187
III.5.3.1 Composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides chez <i>P. tricornutum</i>	187
III.5.3.2 Composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides chez <i>T. lutea</i>	189
III.5.3.3 Composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides chez <i>D. lutheri</i>	191
III.5.4 Conclusion.....	192
CONCLUSION ET PERSPECTIVES ED RECHERCHE.....	195
LISTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	201
ANNEXES.....	233
Annexe 1 : Composition des milieux utilisés pour vérifier l'axénie.....	235
Annexe 2 : Composition des milieux de culture.....	236
Annexe 3 : Cinétique de la fluorescence modulée.....	238
Annexe 4 : Respiration.....	241
Annexe 5 : Teneur cellulaire en protéines, glucides et lipides.....	242
Annexe 6 : Teneur cellulaire relative en acides gras dans les lipides neutres.....	249

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Représentation schématique de l'organisation des complexes photosynthétiques impliqués dans le transport des électrons et des protons dans la membrane thylacoïdale.....	12
Figure I-2 : Schéma résumant l'orientation du carbone chez <i>P. tricornutum</i> cultivée dans deux conditions différentes.....	15
Figure I-3 : Représentation schématique de quelques acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série ω 3 et des triacylglycérols.....	19
Figure I-4 : Représentation schématique des membranes cellulaires : Modèle de la mosaïque fluide.....	20
Figure I-5 : Représentation schématique de quelques phospholipides.....	21
Figure I-6 : Représentation schématique de quelques glycolipides.....	22
Figure I-7 : Représentation schématique de quelques bêtaïne lipides.....	23
Figure I-8 : Le cycle de la synthèse des acides gras chez les microalgues	24
Figure I-9 : Les voies de la synthèse des AGPI-LC chez les microalgues via les réactions de désaturation et d'élongation.....	26
Figure I-10 : Représentation schématique de l'assemblage des lipides chez les microalgues.....	27
Figure I-11 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de DGTS chez les bactéries.....	31
Figure I-12 : Cycle du phosphore.....	35
Figure I-13 : Schéma résumant l'orientation du carbone chez <i>P. tricornutum</i> cultivée dans des conditions de limitation en P.....	44
Figure I-14 : Représentation schématique du remodelage des lipides chez les microalgues en condition de limitation en P.....	46
Figure I-15 : Représentation schématique des liaisons d'un phospholipide hydrolysées par les différentes classes de phospholipases.....	47
Figure I-16 : Représentation schématique des microalgues réparties en 3 groupes en fonction du remaniement des classes lipidiques entre bêtaïne lipides (BL) et phospholipides (PL), l'absorption du P et le quota de P cellulaire minimal ($Q_{p,0}$).....	51
Figure II-1 : Micrographies de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	55
Figure II-2 : Micrographies de <i>Tisochrysis lutea</i>	57
Figure II-3 : Micrographies de <i>Diacronema lutheri</i>	58
Figure II-4 : Schéma du bioréacteur.....	60
Figure II-5 : Mesure de l'intensité photosynthétique nette et de l'intensité respiratoire à l'obscurité....	64
Figure II-6 : Exemple de cinétique de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> chez une diatomée marine....	66
Figure II-7 : Exemple de courbe d'étalonnage du standard lipidique par densitométrie.....	73
Figure II-8 : Exemple de courbe d'amplification de qPCR.....	77
Figure III-1-1 : Evolution de la densité cellulaire (10^6 mL^{-1}) et du taux de croissance spécifique (j^{-1}) des trois microalgues cultivées en batch en condition témoin non limitante (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	90
Figure III-1-2 : Evolution des éléments résiduels PO_4^{3-} (μM) et NO_3^- (mM) dans les milieux de culture en batch en condition témoin (NP) et en condition de limitation en P ou en N.....	93

Figure III-1-3 : Evolution du quota cellulaire en P (pg cellule ⁻¹) (A) et du quota rapporté au C (mol/mol) (B) chez <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	95
Figure III-1-4 : Evolution du quota cellulaire en N (pg cellule ⁻¹) et du quota rapporté au C (mol/mol) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	96
Figure III-1-5 : Evolution du quota cellulaire de C (pg cellule ⁻¹) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	98
Figure III-1-6 : Evolution du volume cellulaire (µm ³) des microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	100
Figure III-1-7 : Evolution de la teneur en Chl <i>a</i> rapportée au C (mg/g C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	102
Figure III-1-8 : Evolution de la teneur en Chl <i>c</i> rapportée au C (mg/g C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	103
Figure III-1-9 : Evolution du rapport molaire Chl <i>c</i> /Chl <i>a</i> chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	104
Figure III-1-10 : Evolution de la teneur en fucoxanthine rapportée au C (mg/g C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	105
Figure III-1-11 : Evolution du rapport molaire fucoxanthine/Chl <i>a</i> chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	106
Figure III-1-12 : Evolution du rendement quantique maximum de la photochimie du PS II (Φ _{p0}) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) ou en condition limitante en P ou en N.....	108
Figure III-1-13 : Evolution du quenching photochimique (qP) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	110
Figure III-1-14 : Evolution du rendement quantique opérationnel du PS II (Φ _{II}) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	111
Figure III-1-15 : Evolution du quenching non photochimique (qN) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	113
Figure III-1-16 : Evolution du quenching non photochimique (NPQ) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	114
Figure III-1-17 : Proportions des composantes de qN (qN _r , qN _s et qN _i) après un stress lumineux de 1000 µmol photons m ⁻² s ⁻¹ chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	116
Figure III-1-18 : Evolution de la photosynthèse nette chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	118
Figure III-2-1 : Evolution de la teneur en protéines solubles rapportée au C (g/g) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	124
Figure III-2-2 : Evolution de la teneur en glucides solubles rapportée au C (g/g) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	126
Figure III-2-3 : Photographies de microscopie confocale montrant le stockage des lipides neutres sous forme de tâches rouges chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7 (coloration au Nile Red).....	128
Figure III-2-4 : Evolution de la teneur en lipides neutres rapportée au C (fluorescence Nile red/ µg C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N....	129

Figure III-2-5 : Teneur cellulaire en lipides totaux rapportée au C (g/g) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	131
Figure III-2-6 : Orientation du métabolisme du carbone vers les protéines solubles, les glucides solubles et les lipides neutres chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	133
Figure III-3-1 : Séparation des lipides par CCM bidimensionnelle.....	138
Figure III-3-2 : Spectre de masse ESI / MS / MS obtenu après injection de DGTS standard.....	139
Figure III-3-3 : Séparation des lipides des microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N par CCM monodimensionnelle avec une gamme étalon des standards en parallèle.....	141
Figure III-3-4 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée avec les classes lipidiques comme variables chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N	144
Figure III-3-5 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes thylacoïdales chez <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	146
Figure III-3-6 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes thylacoïdales chez <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	148
Figure III-3-7 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes thylacoïdales chez <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	149
Figure III-3-8 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes non-plastidiales chez <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	151
Figure III-3-9 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes non-plastidiales chez <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	152
Figure III-3-10 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes non-plastidiales chez <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	154
Figure III-3-11 : Proportion massique des classes lipidiques dans les membranes chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) (=100 %) et en condition limitante en P ou en N rapportée à celle de condition NP.....	155
Figure III-4-1 : Analyses phylogénétique des séquences protéiques de bêtaïne lipide synthase (phBTA) chez les eucaryotes.....	160
Figure III-4-2 : Expression des gènes d'intérêt codant pour 10 enzymes impliquées dans la synthèse des TAG et les voies de biosynthèse des lipides membranaires chez <i>P. tricornutum</i> cultivée en condition limitante en N ou en P.....	162
Figure III-4-3 : Analyses phylogénétique des séquences protéiques de bêtaïne lipide synthase (tiBTA) chez les microalgues.....	166
Figure III-4-4 : Expression des gènes d'intérêt codant pour 10 enzymes impliquées dans la synthèse des TAG et les voies de biosynthèse des lipides membranaires chez <i>T. lutea</i> cultivée en condition limitante en N ou en P.....	168
Figure III-5-1 : Composition en acides gras des lipides neutres extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....	177
Figure III-5-2 : Composition en acides gras des lipides neutres extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....	179

Figure III-5-3 : Composition en acides gras des lipides neutres extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7.....	181
Figure III-5-4 : Composition en acides gras des glycolipides extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....	183
Figure III-5-5 : Composition en acides gras des glycolipides extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4	185
Figure III-5-6 : Composition en acides gras des glycolipides extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7.....	186
Figure III-5-7 : Composition en acides gras des phospholipides et bétaïne lipides extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4..	188
Figure III-5-8 : Composition en acides gras des phospholipides et bétaïne lipides extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....	190
Figure III-5-9 : Composition en acides gras des phospholipides et bétaïne lipides extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7.....	191
Figure A-1 : Cinétique de la fluorescence modulée de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch à J4 en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N sous lumière actinique ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et cinétique de relaxation $F''v$ - contributions des trois composantes de qN (qNf , qNs , qNi) à l'obscurité.....	238
Figure A-2 : Cinétique de la fluorescence modulée de <i>T. lutea</i> cultivée en batch à J4 en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N sous lumière actinique ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et cinétique de relaxation $F''v$ - contributions des trois composantes de qN (qNf , qNs , qNi) à l'obscurité.....	239
Figure A-3 : Cinétique de la fluorescence modulée de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch à J7 en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N sous lumière actinique ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et cinétique de relaxation $F''v$ - contributions des trois composantes de qN (qNf , qNs , qNi) à l'obscurité.....	240
Figure A-4 : Evolution de la respiration rapportée au C ($\mu\text{mol O}_2/\text{h}/\text{mg C}$) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	241
Figure A-5 : Evolution de la teneur cellulaire en protéines solubles ($\text{mg}/10^9$ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	242
Figure A-6 : Evolution de la teneur cellulaire en glucides solubles ($\text{mg}/10^9$ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	243
Figure A-7 : Evolution de la teneur en lipides neutres (fluorescence Nile red/ 10^6 cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	244
Figure A-8 : Teneur cellulaire en lipides totaux ($\text{mg}/10^9$ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	245
Figure A-9 : Analyse quantitative des lipides polaires ($\text{mg}/10^9$ cellules) extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	246
Figure A-10 : Analyse quantitative des lipides polaires ($\text{mg}/10^9$ cellules) extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	247
Figure A-11 : Analyse quantitative des lipides polaires ($\text{mg}/10^9$ cellules) extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N.....	248

Figure A-12 : Teneur relative en acides gras dans les lipides neutres extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition limitante en P ou en N au J4 rapportée à celle des cellules témoins NP.....	249
Figure A-13 : Teneur relative en acides gras dans les lipides neutres extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition limitante en P ou en N au J4 rapportée à celle des cellules témoins NP.....	249
Figure A-14 : Teneur relative en acides gras dans les lipides neutres extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition limitante en P ou en N au J7 rapportée à celle des cellules témoins NP.....	250

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II-1 : Conditions de culture pour chacune des espèces étudiées.....	59
Tableau II-2 : Les paramètres de fluorescence.....	69
Tableau II-3 : Liste des standards lipidiques.....	70
Tableau II-4 : Liste des couples d'amorces chez <i>P. tricornutum</i> utilisés en qPCR.....	78
Tableau II-5 : Liste des couples d'amorces chez <i>T. lutea</i> utilisés en qPCR.....	79
Tableau II-6 : Liste des couples d'amorces des gènes de ménage chez <i>P. tricornutum</i> utilisés en qPCR...81	
Tableau II-7 : Liste des couples d'amorces des gènes de ménage chez <i>T. lutea</i> utilisés en qPCR.....81	
Tableau III-1-1 : Les quotas cellulaires en P (pg cellule ⁻¹) et en N (pg cellule ⁻¹) chez les microalgues cultivées en batch au début de la phase stationnaire.....	94
Tableau III-5-1 : Composition en acides gras (% molaire) dans les lipides neutres extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4..178	
Tableau III-5-2 : Composition en acides gras (% molaire) des lipides neutres extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....180	
Tableau III-5-3 : Composition en acides gras (% molaire) des lipides neutres extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7.....182	
Tableau III-5-4 : Composition en acides gras (% molaire) des glycolipides extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....184	
Tableau III-5-5 : Composition en acides gras (% molaire) des glycolipides extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....185	
Tableau III-5-6 : Composition en acides gras (% molaire) des glycolipides extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7.....187	
Tableau III-5-7 : Composition en acides gras (% molaire) des phospholipides et bétaïne lipides extraits de <i>P. tricornutum</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4.....189	
Tableau III-5-8 : Composition en acides gras (% molaire) des phospholipides et bétaïne lipides extraits de <i>T. lutea</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J4190	
Tableau III-5-9 Composition en acides gras (% molaire) des phospholipides et bétaïne lipides extraits de <i>D. lutheri</i> cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P ou en N au J7.....192	
Tableau C&P-1 : Tableau résumant certains résultats obtenus chez les trois microalgues cultivée en batch en condition limitante en P ou en N en comparaison avec les cellules non-limitées.....200	

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPT : aminoalcoolphosphotransférase
ACCCase : acétyl-CoA carboxylase
ACP : analyse en composantes principales
ACP : protéine porteuse d'acyle
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : adénosine diphosphate
AdoMet : S-adénosylméthionine
AG : acides gras
AGL : acides gras libres
AGMI : acides gras monoinsaturés
AGPI : acides gras polyinsaturés
AGPI-LC : acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AGS : acides gras saturés
AL : lumière actinique
ALA : acide α -linoléique
AMP : adénosine monophosphate
ANOSIM : analyse de similarité
ANOVA : analyse de la variance
3-APG : acide 3-phosphoglycérique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASB : albumin de serum bovin
ATP : adénosine triphosphate
BL : bétaine lipide
BTA : bétaine lipide synthase
CCM : chromatographie sur couche mince
CdKA : kinase A cycline-dépendante
CDS : CDP-DAG synthase
Chl : chlorophylle
Ci : carbone inorganique
CPG : chromatographie en phase gazeuse
CPT : cholinephosphotransférase
C_t : threshold cycle

DAG : diacylglycérol
Dd : diadinoxanthine
DGAT : diacylglycérol acyltransférase
DGCC : diacylglycéryl-carboxyhydroxyméthyl-choline
DGD : digalactosyldiacylglycérol synthase
DGDG : digalactosyldiacylglycérol
DGGA : diacylglycérylglucuronide
DGHS : diacylglycérylhomosérine
DGTA : diacylglycéryl-hydroxyméthyl-triméthyl- β -alanine
DGTS : diacylglycérol-triméthylhomoserine
DHA : acide docosaénoïque
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
Dim : dimension
DIP : phosphore inorganique dissous
DMSO : diméthyl-sulfoxyde
DO : densité optique
DON : azote organique dissous
DOP : phosphore organique dissous
Dt : diatoxanthine
E : efficacité
ECPS : polysaccharide extracellulaire
EF1 α : facteur d'élongation
EPA : acide eicosapentaénoïque
EPT: éthanolaminephosphotransférase
ER: expression relative
FAS : fatty acid synthase
F₀ : fluorescence minimale (à l'obscurité)
F₀'(t) : fluorescence minimale (pendant la relaxation)
F_m : fluorescence maximale (à l'obscurité)
F_m' : fluorescence maximale (à la lumière)
F_m'(t) : fluorescence maximale (pendant la relaxation)
F_s : fluorescence stable (à la lumière)
F_v : fluorescence variable
G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P : glucose-6-phosphate
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDPD : glycérophosphoryldiester phosphodiesterase

GL : glycolipide
GOGAT : glutamate synthase
GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase
Gro3P : glycérol-3-phosphate
GS : glutamine synthétase
HATS : système de transport à haute affinité
Hist : Histone
 K_m : constante de Michaelis
IP3 : inositol triphosphate
IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée
LA : acide linoléique
LATS : système de transport à faible affinité
LDL : lipoprotéine de basse densité
LHC : light harvesting complexe (antenne collectrice de la lumière)
LPA : acide lysophosphatidique
LPAT : LPA acyltransférase
MAG : monoacylglycérol
MFS : major facilitator superfamily
MGAT : monoacylglycérol acyltransférase
MGD : monogalactosyldiacylglycérol synthase
MGDG : monogalactosyldiacylglycérol
ML : lumière modulée
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NiR : nitrite réductase
NNP : nitrate/nitrite porteur
NPQ : extinction non photochimique
NR : nitrate réductase
NRT : transporteur de nitrate
OAA : oxaloacétate
OPP : voie oxydative des pentoses phosphates
OUC : cycle d'ornithine-urée
 Φ_{p0} : rendement quantique maximal du PS II
 Φ_{II} : rendement quantique opérationnel du PS II
PA : acide phosphatidique
PACP : phosphatase acide pourpre
PAL : phosphatase alcaline

PAP : acide phosphatidique phosphatase
PC : phosphatidylcholine
PCD : mort cellulaire programmée
PDAT : phospholipide : diacylglycérol acyltransférase
PE : phosphatidyléthanolamine
PEPC : phosphoénolpyruvate carboxylase
PG : phosphatidylglycérol
PHS : symport P-H⁺
PI : phosphatidylinositol
Pi : P inorganique
PiT : transporteur de P inorganique
PL : phospholipide
PLA : phospholipase A
PLB : phospholipase B
PLC : phospholipase C
PLD : phospholipase D
Pb : photosynthèse brute
Pn : photosynthèse nette
polyP : polyphosphates
PS : phosphatidylsérine
PSI : photosystème I
PSII : photosystème II
PTR : peptide transporteur
Q_A : accepteur quinonique d'électrons
Q_P : quota de P cellulaire
qPCR : PCR quantitative
qN : quenching non photochimique
qN_f : composante rapide du quenching non photochimique
qN_i : composante intermédiaire du quenching non photochimique
qN_s : composante lente du quenching non photochimique
qP : quenching photochimique
R5P : ribose-5-phosphate
RE : réticulum endoplasmique
RT : transcription inverse
Ro : respiration à l'obscurité
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RPS : protéine ribosomale de la petite sous unité 30S

Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

SAM : S-adénosylméthionine

S.D. : écart-type

S.E. : erreur standard

SIMPER : pourcentage de similarité

SM : spectromètre de masse

SP : pulse saturant

SQD1 : UDP-sulfoquinovose synthase

SQD2 : sulfoquinovosyldiacylglycérol synthase

SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol

TAG : triacylglycérol

TBP : TATA box binding protein

TCA : cycle des acides tricarboxyliques

Tub α : tubuline α

Tub β : tubuline β

UBI : ubiquitine

UDP-Glc : uridine diphosphate glucose

V_{max} : vitesse initiale maximale

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les microalgues sont des eucaryotes unicellulaires photosynthétiques vivant essentiellement en milieu aquatique. Avec les cyanobactéries et les bactéries photosynthétiques, elles constituent un ensemble appelé le « phytoplancton » qui est à la base de nombreuses chaînes alimentaires. Ces micro-organismes jouent un rôle important dans toute une gamme de processus biogéochimiques essentiels, allant de la fixation du carbone atmosphérique à la production d'oxygène, ainsi qu'au recyclage de nombreux éléments chimiques tels que l'azote et le phosphore (Falkowski et Raven, 2007; Litchman et Klausmeier, 2008). Ces micro-organismes sont considérés comme l'élément principal de « la pompe biologique du carbone inorganique ». Grâce à leur photosynthèse, ils sont responsables d'environ 50 % de la production primaire globale, bien qu'ils représentent moins de 1 % de la biomasse photosynthétique de la Terre (Field *et al.*, 1998; Guidi *et al.*, 2016).

Les microalgues marines ont évolué, depuis plus de 1,5 milliard d'années, dans les océans protérozoïques (Falkowski *et al.*, 2004). Elles constituent un groupe polyphylétique très diversifié subdivisé en 14 phylums, avec plus de 72 500 espèces (Guiry, 2012). Cependant, 91 % des espèces marines ne seraient pas encore décrites (Mora *et al.*, 2011). Les différents groupes de microalgues marines sont tous apparus à la suite d'endosymbioses primaires, secondaires, voire tertiaires (Falkowski *et al.*, 2004; Keeling, 2013; Kroth, 2015). Dans l'océan contemporain, la plupart des microalgues marines, y compris les Cryptophytes, les Haptophytes et les diatomées (Bacillariophyta), sont des symbiotes « rouges » secondaires, dans lesquels un eucaryote photosynthétique de la lignée rouge a été phagocyté par un eucaryote non-photosynthétique (Falkowski *et al.*, 2004). Cette évolution est à l'origine de l'existence chez ces microalgues d'un plaste entouré par quatre membranes au lieu de deux chez les plantes phanérogames, la membrane la plus externe est en relation avec le réticulum endoplasmique (RE) (Keeling, 2013). Dans ce processus, les microalgues ont acquis des gènes à partir de deux génomes eucaryotes. Par ailleurs, de plus en plus de preuves suggèrent un niveau élevé de transferts horizontaux de gènes parmi les organismes marins (Keeling et Palmer, 2008). Au cours d'une telle évolution, le génome des microalgues marines est devenu un « melting pot » de gènes (Curtis *et al.*, 2012), à l'origine d'un réseau métabolique ressemblant à une mosaïque qui est distinct et original par rapport à celui des autres organismes photosynthétiques (Bowler *et al.*, 2008).

Grâce à leur taille de l'ordre de quelques micromètres, leur temps de doublement cellulaire de l'ordre de quelques heures, leur forte diversité taxonomique et donc biochimique, les

microalgues marines sont devenues un enjeu en recherche. Elles ont été cultivées dans le monde entier au cours des dernières décennies pour la production de biomasse pour l'aquaculture (Brown *et al.*, 1997; Hemaiswarya *et al.*, 2011), pour la bioremédiation de milieux pollués (Kshirsagar, 2013), pour la fabrication de biocarburants (Schenk *et al.*, 2008; Wijffels et Barbosa, 2010), et surtout pour la synthèse de diverses molécules à haute valeur ajoutée telles que des pigments, des antioxydants, des lipides, des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC), issues de leur propre réseau métabolique. Les microalgues sont donc de plus en plus utilisées dans les domaines de la cosmétique, de l'agroalimentaire, de la pharmacie, etc. (Koller *et al.*, 2014; Mimouni *et al.*, 2012; Pulz et Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006). Les scientifiques, d'une part, utilisent des techniques de criblage à haut débit pour sélectionner des souches/espèces de microalgues prometteuses pour des applications potentielles (Mobin et Alam, 2017), et d'autre part, focalisent leur recherche sur la manipulation des microalgues à l'aide de l'ingénierie génétique et métabolique (Huang et Daboussi, 2017; Radakovits *et al.*, 2010) ou en modulant les conditions de culture afin de réorienter le métabolisme carboné, et de favoriser la synthèse des molécules d'intérêt (Sayanova *et al.*, 2017).

Diverses études montrent que la composition biochimique des microalgues, la quantité et la qualité des molécules d'intérêt qu'elles produisent, peuvent être affectées par les facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, la limitation en éléments nutritifs, le stress salin, etc. (Guschina et Harwood, 2009; Harrison *et al.*, 1990; Sayanova *et al.*, 2017; Sukenik et Wahnou, 1991; Thompson *et al.*, 1992a, 1992b; Zhu *et al.*, 2016). Les différents facteurs physicochimiques peuvent agir directement et/ou de manière indirecte sur la fixation (photosynthèse), l'orientation et le stockage du carbone dans les cellules. Néanmoins, ces mécanismes demeurent largement méconnus.

L'azote (N) et le phosphore (P) sont des éléments chimiques indispensables au bon fonctionnement des organismes. Dans la nature, N est souvent considéré comme un élément limitant principal pour une grande partie de la surface des océans aux basses latitudes. La limitation en P a été mesurée en Méditerranée, dans le golfe du Mexique et en mer Rouge (Lin *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2013). Dans d'autres régions océaniques, comme l'Atlantique subtropical nord, la co-limitation en N et P a été observée (Moore *et al.*, 2013). A cause des activités humaines, la production anthropique de N réactif a presque quintuplé au cours des 60 dernières années. En 2014, elle a atteint une valeur de 190 Tg an⁻¹, avec une fourchette plausible de 160 à 210 Tg an⁻¹ (Battye *et al.*, 2017), dont 35 % pénètrent dans les océans par dépôt atmosphérique (17 %) et par lixiviation et ruissellement (18 %). En ce qui concerne le P, les ressources

disponibles pour le phytoplancton dans le milieu marin proviennent principalement des charges nutritives drainées par les fleuves sur les bassins versants, notamment dans les eaux côtières mais relativement peu de P est redistribué dans les océans ouverts loin des côtes. Actuellement, le rapport molaire N/P des émissions humaines est d'environ 22,8 à 44,6, soit près de deux fois le rapport moyen rencontré dans le phytoplancton (~16, selon Redfield, 1934). Ce déséquilibre entre les émissions de N et de P provenant de divers intrants induits par l'homme dans les écosystèmes pourrait engendrer une situation comparable à une limitation en P à plus grande échelle dans les écosystèmes marins à l'avenir (Brembu *et al.*, 2017; Peñuelas *et al.*, 2011, 2013).

Dans les organismes vivants, N et P interviennent dans la composition des molécules essentielles. Chez le phytoplancton, N est principalement utilisé pour la synthèse des protéines (acides aminés) (30 %), des acides nucléiques (30 %) et des chlorophylles (10 %), tandis que P est principalement un constituant des acides nucléiques (40 %) et des phospholipides (10-20 %) (Geider et La Roche, 2002). Ils jouent des rôles différents dans le métabolisme cellulaire; selon leur disponibilité, les réponses physiologiques des microalgues seront différentes (Liu *et al.*, 2013; Raven, 2015), ainsi que leur composition biochimique (Ganf *et al.*, 1986; Geider et La Roche, 2002; Lai *et al.*, 2011; Rasdi et Qin, 2015), en particulier les teneurs en lipides et la composition en acides gras de ces lipides (Abida *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2013; Reitan *et al.*, 1994).

N est le nutriment le plus largement étudié en raison de son effet sur la production de lipides chez les microalgues. Il a été considéré comme l'élément nutritif majeur déclenchant l'accumulation de lipides neutres (principalement sous forme de triacylglycérol, TAG) (Hu *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012). Néanmoins, la limitation en N chez les microalgues s'accompagne souvent d'une diminution de la capacité photosynthétique due à la réduction des composantes structurales (Young et Beardall, 2003), tandis que la production lipidique diminue de par l'abaissement de l'apport énergétique (Benvenuti *et al.*, 2015; Klok *et al.*, 2013). Au niveau cellulaire, la réduction des réserves intracellulaires en N, telles que les protéines, pourrait offrir à la fois des agents réducteurs et le squelette carboné pour la synthèse *de novo* des acides gras (Ge *et al.*, 2014). D'ailleurs, de nombreuses études indiquent que la dégradation des membranes des thylacoïdes favorise la synthèse des TAG et que le remodelage de la membrane plasmique contribue substantiellement à l'accumulation de lipides neutres (Martin *et al.*, 2014; Simionato *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2013).

En revanche, l'effet du P sur le métabolisme lipidique chez les microalgues est beaucoup moins étudié. Des études ont montré une grande variabilité interspécifique en ce qui concerne la production des lipides en limitation de P (Reitan *et al.*, 1994). Contrairement à la limitation en N,

l'intégrité des membranes thylacoïdales est davantage maintenue (Iwai *et al.*, 2014). Certaines études montrent que des paramètres photosynthétiques ne sont pas modifiés en l'absence de P (Kamalanathan *et al.*, 2015). De toute évidence, les stratégies d'acclimatation des microalgues pourraient être très différentes en réponse à la disponibilité en N et en P. Des études sont toutefois encore nécessaires pour comparer les comportements cellulaires afin de rechercher une production de lipides neutres plus efficace.

Parmi les lipides polaires, les phospholipides (PL) constituent aussi une source importante de P cellulaire, certaines espèces ont la capacité de remplacer les PL par des lipides non-phosphorés quand P est limité. À cet égard, cela pourrait soutenir environ 16 % de la demande totale en P chez les microalgues marines (Martin *et al.*, 2011; Van Mooy *et al.*, 2009). Parmi les lipides polaires non-phosphorés, les bêtaïne lipides (BL) ont une structure très similaire à celle des phospholipides (Sato et Murata, 1991) et sont principalement localisés dans les membranes non-plastidiales (Künzler *et al.*, 1997). Les trois BL les plus connus sont : diacylgcérol-triméthylhomosérine (DGTS), diacylgcéryl-hydroxyméthyl-triméthyl- β -alanine (DGTA) et diacylgcéryl-carboxyhydroxyméthyl-choline (DGCC) (Dembitsky, 1996). Durant la dernière décennie, plusieurs travaux ont étendu nos connaissances sur la présence de BL dans de nouvelles espèces de microalgues (Armada *et al.*, 2013; Banskota *et al.*, 2013; Cañavate *et al.*, 2016; Dembitsky, 1996; Kato *et al.*, 1996; Khozin-Goldberg et Cohen, 2006; Leblond *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Roche et Leblond, 2010; Vieler *et al.*, 2007). Néanmoins, actuellement, très peu de recherches sont menées sur le métabolisme des BL (Riekhof *et al.*, 2005). Ces BL sont capables de se substituer aux phospholipides en condition de limitation en P (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2017; Hunter *et al.*, 2018; Maat *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2011; Mühlroth *et al.*, 2017; Shemi *et al.*, 2016). Ces études mettent en évidence un processus de remodelage des lipides polaires sous limitation en P, ainsi qu'une réponse lipidique taxonomiquement diversifiée. Cependant, une vue précise, particulièrement au niveau de la réorientation métabolique qui conduit à un tel remodelage membranaire, manque encore.

L'objectif de ce travail, proposé dans le cadre du programme collaboratif de la région Pays de la Loire « Atlantic microalgae (AMI) », était d'étudier le métabolisme de trois espèces de microalgues marines en condition de limitation nutritive en P ou en N en comparaison avec une condition nutritive non limitante. Les trois espèces microalgales retenues *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyta), *Tisochrysis lutea* (Haptophyte) et *Diacronema lutheri* (Haptophyte) ont été caractérisées : pour la première, comme ne produisant quasiment pas de BL en condition nutritive non limitante (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2016); pour la seconde, comme contenant à la fois des BL et des PL mais ces derniers en très faible quantité (Kato *et al.*, 1996), et pour la troisième, comme ne contenant que des BL dans la membrane plasmique (Eichenberger et Gribi, 1997). De plus, les trois microalgues sont connues pour leur richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série des oméga-3, molécules bioactives bien connues pour leurs actions bénéfiques sur la santé (Hamilton *et al.*, 2014; Liu et Lin, 2001; Meireles *et al.*, 2003; Ponis *et al.*, 2008).

Dans ce travail, les voies de biosynthèse des lipides des 3 microalgues retenues seront précisées grâce à l'analyse de différentes classes lipidiques et de leurs teneurs en acides gras. De plus, l'expression des gènes codant les enzymes impliqués dans ces voies sera également quantifiée. En parallèle, l'activité photosynthétique, les voies d'entrée du carbone inorganique dans les cellules et sa répartition seront suivies lors de la réorientation du métabolisme. L'impact d'une limitation en P sera étudié et comparé à celui obtenu avec une limitation en N ainsi qu'avec une condition non-limitante.

Lors de mon travail de thèse, je me donc suis attaché à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les réponses physiologiques des microalgues marines soumises à une limitation en P ou en N, particulièrement au niveau de l'activité photosynthétique ?
- Comment le métabolisme carboné se réoriente en réponse à une limitation nutritive en P ou en N chez les microalgues marines ?
- Quels sont les remodelages des lipides polaires en réponse à ces limitations nutritives chez les microalgues marines ? Comment ce remodelage est-il contrôlé au niveau de l'expression des gènes ? Ce remodelage affecte-t-il la composition en acides gras, surtout la production des acides gras AGPI de la série des oméga-3 ?

Ce manuscrit tentera de répondre à ces questions au travers des chapitres suivants :

La première partie de ce mémoire est consacrée à une synthèse bibliographique sur le métabolisme carboné, particulièrement au niveau du métabolisme lipidique. Cette partie apporte également un bilan des connaissances sur le P et le N.

Une deuxième partie présente les matériels et les méthodes utilisés au cours de la thèse.

Les résultats obtenus seront exposés dans une troisième partie divisée en 5 chapitres.

Le premier chapitre présente les réponses physiologiques des microalgues marines soumises à une limitation en P ou en N. Les résultats portent sur l'évaluation de paramètres physiologiques comme la croissance, les pigments et la photosynthèse.

Le second chapitre est consacré à l'orientation du carbone en réponse à une limitation nutritive en P ou en N chez les microalgues marines et repose sur les mesures des teneurs en protéines, glucides et lipides neutres.

Les trois chapitres suivants portent sur le remodelage des lipides polaires en réponse à une limitation nutritive en P ou en N chez les microalgues marines. Le troisième chapitre concerne les analyses qualitatives et quantitatives des lipides polaires. Le quatrième chapitre porte sur les profils d'expression des gènes candidats à travers une approche biomoléculaire. Dans le cinquième chapitre sont présentées les compositions en acides gras de chaque fraction lipidique analysée.

Enfin, une conclusion générale reprend l'ensemble des résultats obtenus à travers ces différentes approches et de nouvelles perspectives de recherche à ce travail de thèse sont également proposées.

PARTIE 1

Synthèse bibliographique

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette synthèse bibliographique concerne essentiellement le métabolisme carboné chez les microalgues, notamment le métabolisme lipidique. Elle fournit également un bilan des connaissances sur le phosphore (P) et l'azote (N), dans l'environnement et au niveau cellulaire.

I.1 Métabolisme carboné et lipidique chez les microalgues

Les êtres vivants sont constitués de molécules à squelette carboné. Grâce à leur capacité photosynthétique, les microalgues sont capables d'assimiler le C inorganique (Ci), essentiellement sous forme de CO₂ pour la synthèse de matière organique en utilisant l'énergie lumineuse. Les taux de productivité de biomasse chez les microalgues sont compris entre 15 et 30 g de masse sèche m⁻² jour⁻¹ (Batan *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2011) avec une teneur énergétique moyenne de 18 - 29 kJ/g de masse sèche (Williams et Laurens, 2010). Cependant, il y a souvent un compromis entre le taux croissance et l'accumulation de métabolites énergétiques comme les glucides et les lipides (Subramanian *et al.*, 2013). Le métabolisme carboné détermine le flux du carbone et le flux d'énergie à travers la cellule, en orientant vers la croissance cellulaire et / ou le stockage.

I.1.1 Métabolisme carboné : de la photosynthèse à l'orientation du carbone

Le métabolisme carboné est composé d'une myriade de réactions enzymatiques réparties entre les différents compartiments intracellulaires, tels que le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique (RE), et différenciellement régulées par les facteurs environnementaux. Les microalgues partagent de nombreuses similitudes avec les plantes phanérogames, mais présentent également des voies métaboliques très originales du fait de leur histoire évolutive (Kroth *et al.*, 2008; Obata *et al.*, 2013; Wilhelm *et al.*, 2006).

- **La photosynthèse et l'assimilation du carbone**

Dans les chaînes trophiques, le métabolisme carboné des producteurs primaires débute par la photosynthèse qui est cruciale pour l'efficacité d'assimilation du carbone. Ce processus se

compose de deux étapes bien distinctes : la phase « claire » et la phase « sombre ». La phase « claire » fournit l'énergie nécessaire pour la fixation du carbone. Elle se déroule dans les membranes thylacoïdales qui renferment 5 complexes macromoléculaires (Figure I-1) : les antennes collectrices (light harvesting complexes, LHCs), 2 photosystèmes (PSI et PSII), un complexe cytochrome b6/f et l'ATP-synthase (Alberts *et al.*, 1994). L'énergie apportée par les photons est captée par les LHCs, puis elle est convertie en énergie électrochimique. Les électrons provenant de l'eau sont transférés à travers la chaîne de transporteurs, réduisant finalement le NADP^+ en NADPH. Le transport des électrons génère également un gradient de protons transmembranaire qui est utilisée pour la production d'ATP.

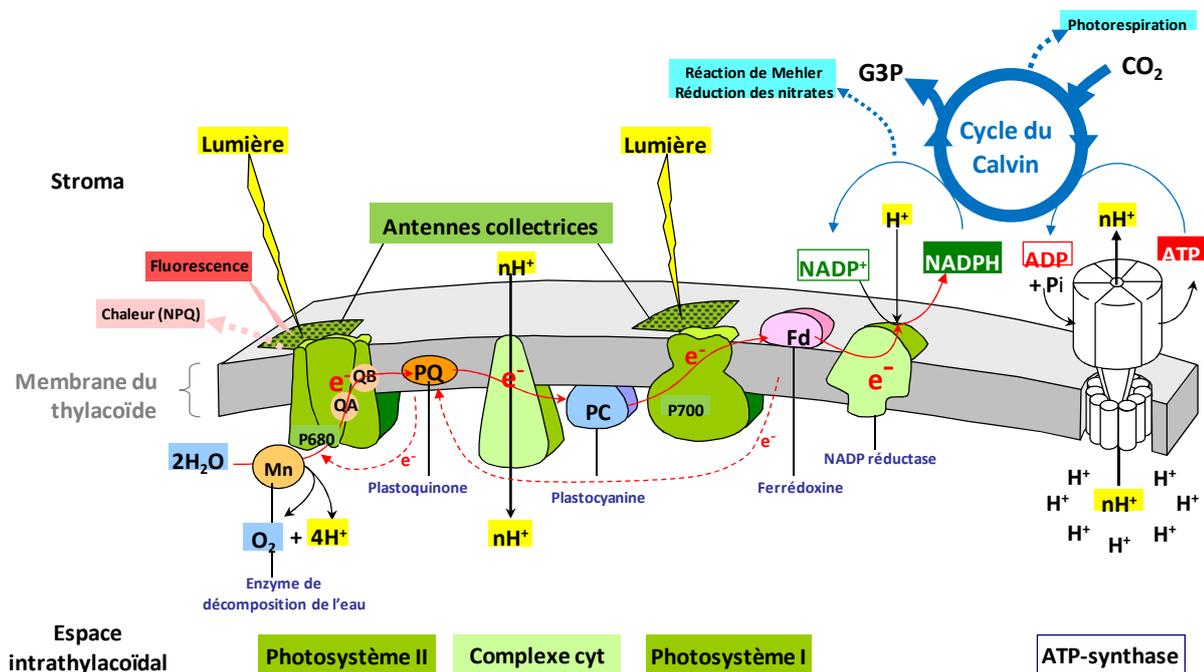


Figure I-1 : Représentation schématique de l'organisation des complexes photosynthétiques impliqués dans le transport des électrons et des protons dans la membrane thylacoïdale. Le transport des électrons, depuis l'oxydation de H_2O jusqu'à la réduction du NADP^+ , est couplé avec la formation du gradient de protons, qui est utilisé pour la synthèse d'ATP. D'après Alberts *et al.* (1994)

Divers types de LHCs se sont développés chez les microalgues pour capter l'énergie lumineuse. Pour la plupart des microalgues marines de la lignée rouge, les pigments présents dans les LHCs tels que la chlorophylle (Chl) *c* et une variété de xanthophylles (fucoxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine) ont des caractéristiques distinctes et particulières que l'on trouve rarement dans la lignée verte (Büchel, 2015; Hoffman *et al.*, 2011; Umetani *et al.*, 2018). Leur pigmentation diffère considérablement, et par conséquent le spectre d'absorption de la lumière,

l'efficacité de l'absorption des photons et le transfert d'énergie ont une influence majeure sur la performance photosynthétique (Wilhelm *et al.*, 2006).

Pour faire face aux variations de la lumière incidente, différents processus physiologiques se sont mis en place pour protéger l'appareil photosynthétique. Deux mécanismes sont considérés comme essentiels pour maintenir l'équilibre entre l'énergie photonique absorbée et utilisée (Lavaud et Lepetit, 2013) : 1) le cycle de transport d'électrons autour du PSII et / ou du PSI (Lysenko *et al.*, 2017) et 2) l'extinction non photochimique (NPQ). Le NPQ est initié par le gradient de protons transmembranaire et fortement lié au cycle des xanthophylles, par exemple, la formation de diatoxanthine par la déépoxydation de la diadinoxanthine chez les diatomées lors d'une forte illumination. Ce processus permet de dissiper l'énergie excédentaire sous forme de chaleur, mais aussi constitue un moyen de protection contre la formation des espèces réactives de l'oxygène (Bertrand *et al.*, 2001; Roháček *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'époxydation de la diatoxanthine, qui est extrêmement rapide, permet aux complexes LHCs de retourner à un état permettant la capture des photons en quelques minutes après une exposition à un fort éclaircissement (Wilhelm *et al.*, 2014).

La phase « sombre » se déroule dans le stroma des chloroplastes, où l'ATP et le NADPH issus de la phase « claire », sont ensuite utilisés pour la fixation du CO₂ au cours du cycle de Calvin-Benson. La phase sombre constitue l'étape limitante de la photosynthèse. La fixation efficace du CO₂ dans la matière organique nécessite un contrôle strict du rapport ATP / NADPH. En effet, pour fixer une molécule de CO₂ et produire de l'acide 3-phosphoglycérique (3-APG), il faut 2 molécules de NADPH et 3 d'ATP (Ott *et al.*, 1999). En outre, des études indiquent que certaines microalgues présentent des voies réductrices alternatives permettant de dissiper l'excès d'énergie photochimique afin d'équilibrer la production et la consommation de l'ATP et du NADPH et ainsi d'ajuster finement le rapport ATP / NADPH : 1) la réaction de Mehler où les électrons issus du PSI réduisent l'O₂ en eau (Roberty *et al.*, 2014), 2) la réduction des nitrates et des sulfates (Lomas et Glibert, 1999), et 3) la photorespiration (Morgan-Kiss *et al.*, 2006). La photorespiration réduit le bilan de la fixation du carbone ; le glycolate produit par l'activité oxygénase de la RubisCO peut être transaminé pour donner du glycolate ou complètement perdu par excrétion (Wilhelm *et al.*, 2006). Par ailleurs, les diatomées sont aussi capables de réguler le rapport ATP / NADPH par des échanges énergétiques entre les plastes et les mitochondries (Bailleul *et al.*, 2015).

L'efficacité de l'assimilation du carbone est donc étroitement couplée à l'allocation de l'énergie absorbée. Selon les résultats de Jakob *et al.* (2007) chez *Phaeodactylum tricorutum*, en

conditions optimales de croissance, environ 15 % de l'énergie lumineuse absorbée sont utilisés pour la fixation du CO₂, la plupart de l'énergie (61 %) est dissipée sous forme de fluorescence et de chaleur, dont 9 % sont dissipés *via* NPQ, tandis que 8 % de l'énergie sont utilisés par les voies réductrices alternatives. En condition de limitation en N, au-delà de la réduction de l'énergie lumineuse absorbée, les rendements deviennent plus faibles. Environ 7 % de l'énergie absorbée sont utilisés pour la fixation du CO₂, tandis que 78 % de l'énergie sont dissipés sous forme de fluorescence et de chaleur, dont 31 % sont dissipés *via* NPQ, ainsi que 9 % de l'énergie sont utilisés par les voies réductrices alternatives (Wagner *et al.*, 2017).

- **L'orientation du carbone**

Le CO₂ fixé par la photosynthèse entre dans le métabolisme central du carbone par le cycle de Calvin-Benson. Puis le C est pris en charge par différentes voies telles que la glycolyse, la gluconéogenèse, la voie oxydative des pentoses phosphates (OPP), le cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs), etc. Une série de réactions enzymatiques conduit le carbone vers les différentes voies de biosynthèse telles que celles des protéines, des glucides et des lipides. Quel que soit le taux de croissance des microalgues, environ 30 % du carbone fixé se retrouvent sous forme d'une accumulation nette de carbone et la majorité est utilisée pour la biosynthèse et la production d'ATP (Halsey *et al.*, 2013).

Dans des conditions de croissance standards, le taux élevé de photosynthèse conduit à une forte assimilation du CO₂ par le cycle de Calvin-Benson. Le carbone fixé est initialement retrouvé dans les hydrates de carbone pendant la phase lumineuse (Wagner *et al.*, 2017). Le cycle de Calvin-Benson alimente aussi en triose-phosphates (glycéraldéhyde-3-phosphate, G3P) la glycolyse. Chez *P. tricornutum*, le pyruvate produit par la glycolyse chloroplastique (ou importé du cytosol) peut être décarboxylé en acétyl-CoA, qui entre dans la voie de biosynthèse des acides gras (Kroth *et al.*, 2008). La synthèse d'acides gras *de novo* est souvent active pour produire des quantités considérables de phospholipides pour générer des membranes cellulaires. Le pyruvate est également transporté vers les mitochondries où il est converti en acétyl-CoA ; ce dernier intègre le cycle de TCA après condensation avec l'oxaloacétate. Le TCA produit de l'ATP et des squelettes carbonés servant à la biosynthèse d'acides aminés qui favorisent la croissance cellulaire (Brembu *et al.*, 2017). Dans ce cas, en général, les principaux puits de carbone sont les protéines, les parois cellulaires polysaccharidiques, et les lipides membranaires (Figure 1-2). Ce modèle oriente le flux de carbone et d'énergie vers une production élevée de biomasse.

Les études d'Halsey *et al.* (2013) nous donnent un point de vue plus précis concernant l'orientation du carbone au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Pendant la phase de croissance (G1), le carbone fixé est rapidement mobilisé pour la production d'ATP et la biosynthèse « des blocs de construction », alors que pendant la phase de division (S, G2 et M) une part significative du flux du carbone est d'abord convertie en polysaccharides de stockage temporaire. La synthèse des polysaccharides (chrysolaminarine ou amidon) consomme de l'énergie lumineuse et du NADPH, contribue au stockage de carbone (Kramer et Evans, 2011) et protège contre les dommages oxydatifs (Krishnan *et al.*, 2015). Les polysaccharides sont une source pour la gluconéogenèse.

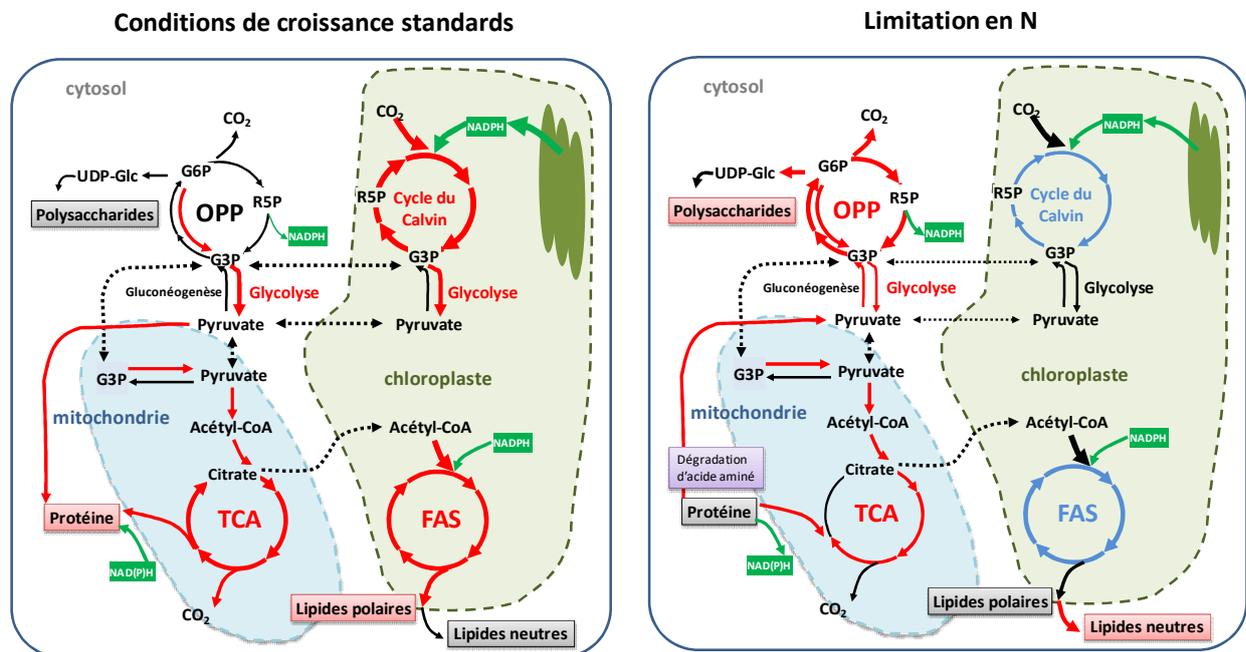


Figure I-2 : Schéma résumant l'orientation du carbone chez *P. tricornutum* cultivée dans deux conditions différentes. Les principaux puits de carbone fixé sont indiqués par un cadre rouge. L'épaisseur de la flèche est corrélée avec l'intensité du flux de carbone. Les flèches rouges, bleues et noires indiquent respectivement une régulation à la hausse, à la baisse et nulle des voies métaboliques. Les lignes en pointillés indiquent le transport entre les différents compartiments. D'après Alipanah *et al.* (2015); Brembu *et al.* (2017); Hockin *et al.* (2012); Longworth *et al.* (2016)

Dans des conditions défavorables telles que la limitation par un élément nutritif, le taux de croissance est réduit. Le métabolisme carboné des microalgues est alors réorienté afin de trouver une nouvelle homéostasie. Prenons la limitation en N comme exemple (Figure I-2), la dégradation des composés azotés (protéines et chlorophylles) est un moyen efficace pour le recyclage de N. Par conséquent, ce processus s'accompagne d'une production de squelettes carbonés en excès. En ce qui concerne la photosynthèse, même si de nombreux constituants de la

membrane thylacoïdale ont une teneur diminuée, les photosystèmes et la chaîne de transfert d'électrons restent pleinement fonctionnels. Bien que l'activité des enzymes du cycle de Calvin-Benson soit généralement réduite, plus de carbone est fixé que consommé. La régulation à la hausse de la glycolyse, du métabolisme du pyruvate ainsi que de certaines enzymes du cycle TCA (fonctionnant alors dans le sens inverse) conduit le carbone en excès vers le pool de réserve, principalement sous forme de polysaccharides et de lipides neutres. En plus, l'activation de la voie des pentoses phosphates (OPP) fournit suffisamment de NADPH comme pouvoir réducteur (Alipanah *et al.*, 2015; Gargouri *et al.*, 2015; Hockin *et al.*, 2012; Longworth *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016; Valledor *et al.*, 2014).

L'accumulation de polysaccharides et de lipides neutres peut être interprétée comme un moyen de canaliser l'excès de carbone, d'énergie et de pouvoir réducteur (NADPH) lors d'un déséquilibre métabolique (Lacour *et al.*, 2012). En outre, l'excès de carbone semble également pouvoir être excrété hors de la cellule sous la forme de polysaccharide extracellulaire (ECPS). Il a été démontré que la limitation en N induit la production et l'accumulation d'ECPS chez un certain nombre d'espèces de microalgues (Rossi et Philippis, 2016).

Sous les mêmes conditions de limitation, La biosynthèse des acides gras (AG) est en revanche fortement réprimée au niveau de la transcription (Alipanah *et al.*, 2015; Levitan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013). Alors qu'aucune modification des teneurs en protéines associées à la voie de biosynthèse des lipides n'a été observée (Hockin *et al.*, 2012; Mock *et al.*, 2008), Longworth *et al.* (2016) ont reporté des niveaux accrus en enzymes de biosynthèse des acides gras après 24 h de limitation en N chez *P. tricornutum*. De plus en plus de preuves suggèrent que l'augmentation de la teneur en lipides neutres pourrait être influencée par des facteurs extérieurs à la voie de synthèse des AG. Fan *et al.* (2012) ont indiqué que chez *Chlamydomonas reinhardtii* l'accumulation de triacylglycérols (TAG) est dans une large mesure indépendante des enzymes de biosynthèse, mais est plutôt contrôlée par la disponibilité en carbone. Des études chez *P. tricornutum* ont montré que l'accumulation de précurseurs tels que l'acétyl-CoA et le NADPH pouvait contribuer plus significativement à l'accumulation de TAG que l'activité de l'ACCase (Tan et Lee, 2016; Yang *et al.*, 2013). Valenzuela *et al.* (2012) suggèrent que l'acétyl-CoA pourrait jouer un rôle important dans l'orientation du carbone vers l'accumulation de lipides neutres dans la cellule. Cette accumulation de lipides neutres pourrait être due aux phénomènes de « poussée » (la synthèse des AG) et de « tirage » (l'assemblage des TAG) (Vanhercke *et al.*, 2014).

Thermodynamiquement, les polysaccharides sont les produits terminaux les moins consommateurs en énergie comparativement aux lipides qui nécessitent le plus d'énergie et de NADPH issus de la photosynthèse et de la voie OPP. La polymérisation en amidon nécessite 4,2 ATP / C et 2 NADPH / C, alors que l'exigence énergétique pour la biosynthèse des triacylglycérols (TAG) est environ 5,84 – 6,3 ATP / C et 2,84 – 2,9 NADPH / C (Subramanian *et al.*, 2013). L'exigence énergétique de chacun des puits de carbone est l'un des facteurs clés qui régit la quantité d'énergie partagée entre les puits de stockage. Si la biosynthèse des polysaccharides est considérée comme étant en première ligne pour consommer l'énergie en excès, l'accumulation des lipides neutres tels que les TAG est un piège plus efficace. La synthèse des acides gras nécessite des niveaux élevés d'ATP et de NADPH qui seraient générés par un passage d'un métabolisme gluconéogénique à un métabolisme glycolytique (Longworth *et al.*, 2016). Lors de la privation en N, la dégradation tardive de la chrysolaminarine a été observée chez les diatomées (Alipanah *et al.*, 2015). La réorientation du C des polysaccharides vers des lipides neutres consomme plus d'électrons (Palmucci *et al.*, 2011), et atténue le stress photo-oxydant (Maeda *et al.*, 2017).

I.1.2 Lipides chez les microalgues : définition et classification

Les lipides des microalgues sont des composés d'intérêt pour les biotechnologies, l'aquaculture et l'écologie car ils présentent une grande diversité moléculaire (Kumari *et al.*, 2013). Ils constituent un ensemble très hétérogène de molécules caractérisées par leur solubilité faible voire absente dans l'eau mais élevée dans des solvants organiques non polaires. Ce sont des molécules organiques soit complètement apolaires (lipides neutres), soit amphiphiles (lipides polaires) avec une constitution globalement hydrophobe présentant un domaine hydrophile. Les lipides jouent un rôle très important chez tous les êtres vivants : ils constituent des éléments de réserve énergétique, ils participent à la structure et à la fonction des membranes cellulaires et ils interviennent dans de nombreuses autres fonctions biologiques, notamment de signalisation cellulaire.

Il existe plusieurs classifications des lipides. Selon les définitions de l'IUPAC, les lipides sont répartis en 8 classes selon leur structure ou composition chimique (Fahy *et al.*, 2009). Généralement, on distingue les lipides neutres et les lipides polaires.

- **Lipides neutres**

Les lipides neutres comprennent principalement les triacylglycérols (TAG) qui sont des lipides de réserve.

Les TAG sont des glycérolipides dans lesquels les trois groupements hydroxyles du glycérol sont estérifiés par des acides gras linéaires (Figure 1-3). Ils peuvent être homogènes ou hétérogènes lorsqu'ils possèdent deux à trois acides gras différents. C'est une réserve de carbone et d'énergie cellulaire. Beaucoup de microalgues ont la capacité de produire des quantités importantes (jusqu'à 20 à 50 % de la masse sèche des cellules) de TAG en tant que lipides de stockage, sous stress photo-oxydatif ou d'autres conditions environnementales défavorables (Hu *et al.*, 2008). Les TAG sont quant à eux considérés comme une source importante pour la production de biodiesel (Klok *et al.*, 2014; Liu et Benning, 2013).

Les TAG sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois AG. Ces derniers sont des acides carboxyliques composés d'une chaîne aliphatique de type hydrocarbure. Ils sont caractérisés par la longueur de leur chaîne ainsi que leur degré d'insaturation avec des doubles liaisons majoritairement en configuration cis et en position non conjuguées (position malonique). Les AGL (acides gras libres) sont généralement considérés comme des marqueurs d'une dégradation ou hydrolyse des lipides au cours des étapes de transformation ou de stockage (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2011). La composition en AG varie selon les espèces de microalgues et les conditions environnementales (Upchurch, 2008). Les microalgues sont riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3 ou ω 3 (Figure 1-3), tels que les acides α -linoléniq (ALA ; 18 :3n-3), eicosapentaénoïque (EPA ; 20:5n-3) et docosahexaénoïque (DHA ; 22:6n-3) (Khozin-Goldberg *et al.*, 2011). De par leur richesse en AGPI-LC de la série ω 3, les microalgues représentent ainsi une source indispensable d'AGPI-LC dans la chaîne trophique marine. Elles peuvent également être utilisées en tant que compléments alimentaires et présentent des avantages pour la santé humaine notamment dans le cadre de la prévention de certaines maladies (Doughman *et al.*, 2007; Mimouni *et al.*, 2012). Par exemple, l'EPA contribue à la protection des artères et du cœur (Din *et al.*, 2008). Le DHA joue un rôle fondamental dans le développement du cerveau et de la rétine (Guesnet *et al.*, 2005).

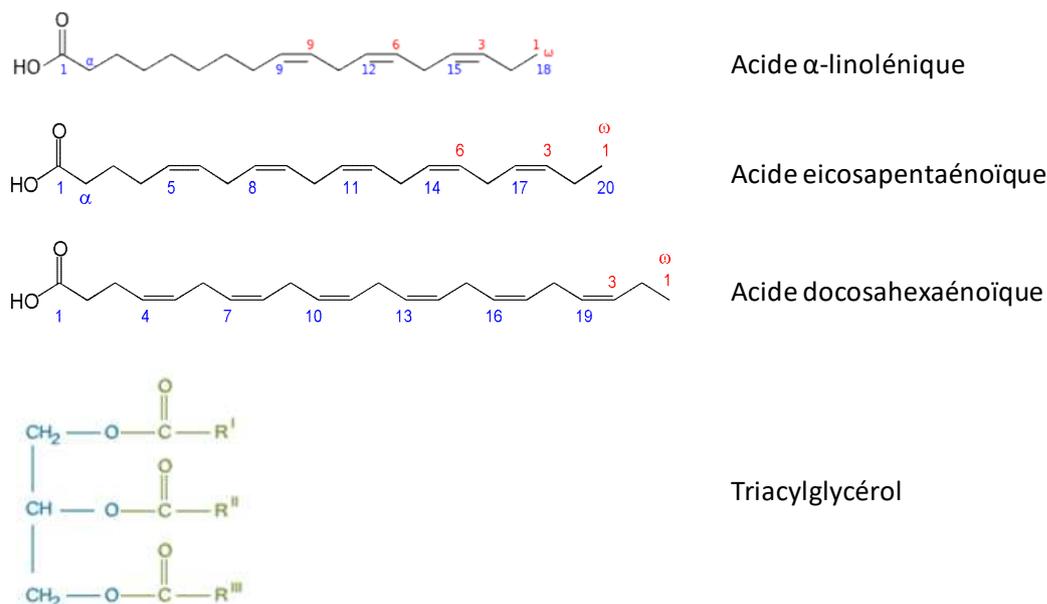


Figure I-3 : Représentation schématique de quelques acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série ω 3 et des triacylglycérols. D'après Colette et Monnier (2011)

Les lipides neutres contiennent également des stérols, ce sont les lipides possédant un noyau stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. La plupart des organismes eucaryotes contiennent des stérols comme composants architecturaux des membranes cellulaires. Les diatomées contiennent une diversité de stérols avec plus de 40 stérols identifiés. Les Haptophytes en revanche ont généralement des stérols dominés par le 24-méthylcholesta-5, 22E-diène-3 β -ol, qui est également présent dans les diatomées (Volkman, 2016). Grâce à leur structure similaire à celle du cholestérol, les stérols végétaux jouent un rôle important dans la réduction du LDL-cholestérol (Katan *et al.*, 2003).

De plus, certaines espèces de la classe Prymnesiophyceae, y compris *Emiliana*, *Gephyrocapsa*, *Isochrysis*, *Tisochrysis* et *Chrysolita*, ont la capacité de synthétiser les alcénones comme « lipides » de réserve (Conte *et al.*, 1995; Marlowe *et al.*, 1984; Rontani *et al.*, 2004, 2006; Volkman *et al.*, 1995). Ce sont principalement des méthyl et éthyl cétones insaturées à longue chaîne C37 - C39, stockées dans des corps lipidiques cytoplasmiques (Marlowe *et al.*, 1984). Les alcénones sont considérées comme une alternative prometteuse pour les cires dans les cosmétiques et produits de soins et de bien-être (McIntosh *et al.*, 2018).

- **Lipides polaires**

Les lipides polaires sont des molécules amphiphiles qui ont tendance à s'organiser naturellement en bicouche lipidique. Ils sont généralement composés de têtes hydrophiles orientées vers les milieux extra ou intra-cellulaires et de queues hydrophobes orientées au centre de la bicouche lipidique (Figure I-4).

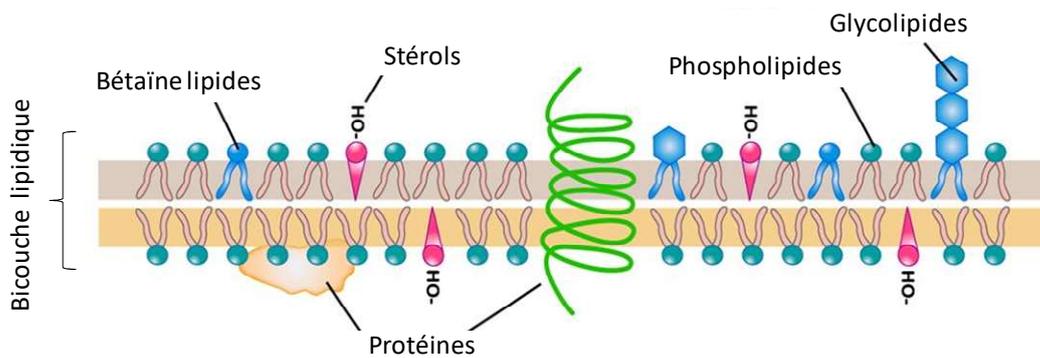


Figure I-4 : Représentation schématique des membranes cellulaires : Modèle de la mosaïque fluide. D'après Singer et Nicolson (1972)

Parmi les lipides polaires, les microalgues contiennent principalement des phospholipides (PL) et des glycolipides (GL). Leur composition dans les membranes varie selon les espèces de microalgues, mais également à l'intérieur de la cellule, dans les différents organites. En général, les PL sont les principaux composants lipidiques des membranes plasmiques. En revanche, les GL sont plus abondants dans les membranes des thylacoïdes (Mizusawa et Wada, 2012). En outre, d'autres composés moins connus tels que les bêtaïnes lipides (BL), chloro-sulfolipides ou divers autres sulfolipides peuvent être des éléments constitutifs des membranes de certaines espèces (Harwood, 1998).

Phospholipides (PL)

Les PL constituent la composante principale des membranes plasmiques. La plupart des PL sont des phosphoglycérides, constitués d'une molécule de glycérol dont les fonctions hydroxyles en position 1 et 2 sont estérifiées par deux molécules d'AG. Le troisième groupement hydroxyle du glycérol est lié à un groupement phosphate. De petites molécules polaires ou chargées peuvent se lier à ce groupement phosphate et ainsi former différents phosphoglycérides (Berg *et al.*, 2002).

Les PL (Figure I-5) les plus courants sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS) (Berg *et al.*, 2002). Le phosphatidylglycérol (PG) est le principal phospholipide dans les chloroplastes et constitue un composant essentiel au centre du photosystème II (PSII) (Boudière *et al.*, 2014; Li-Beisson *et al.*, 2016).

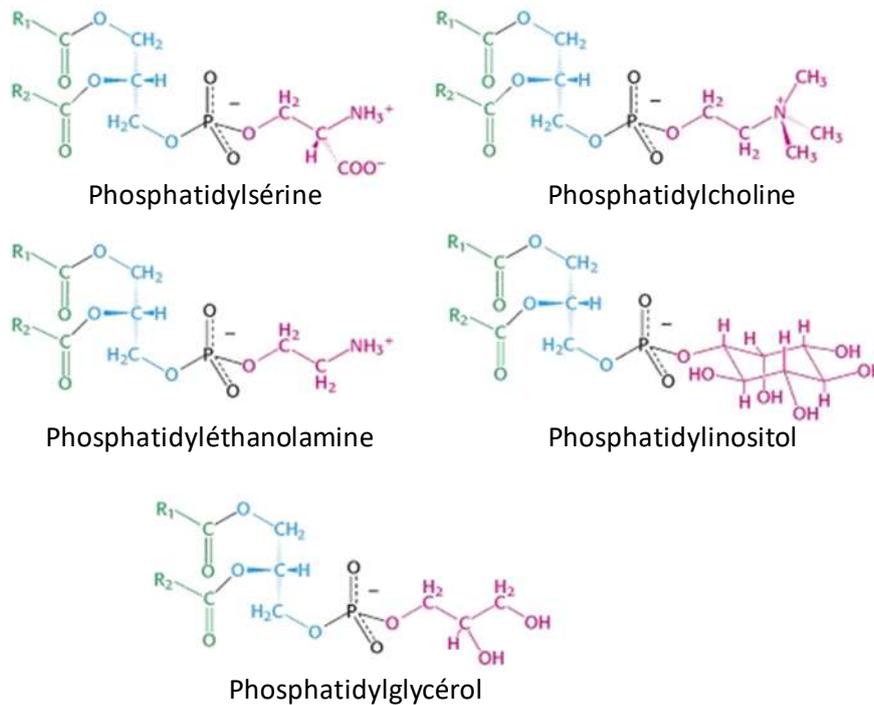


Figure I-5 : Représentation schématique de quelques phospholipides. D'après Berg *et al.* (2002)

Glycolipides (GL)

La composition en GL des membranes photosynthétiques (lipidome des thylacoïdes) a été remarquablement conservée au cours de l'évolution, des cyanobactéries aux eucaryotes contenant des chloroplastes (Boudière *et al.*, 2014). Ce sont des glyco-glycérides constitués de deux AG estérifiés à un glycérol ainsi qu'une tête polaire d'un ou plusieurs oses. Ces GL (Figure I-6) sont le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) qui représentent jusqu'à 80 % des lipides des thylacoïdes (Block *et al.*, 1983).

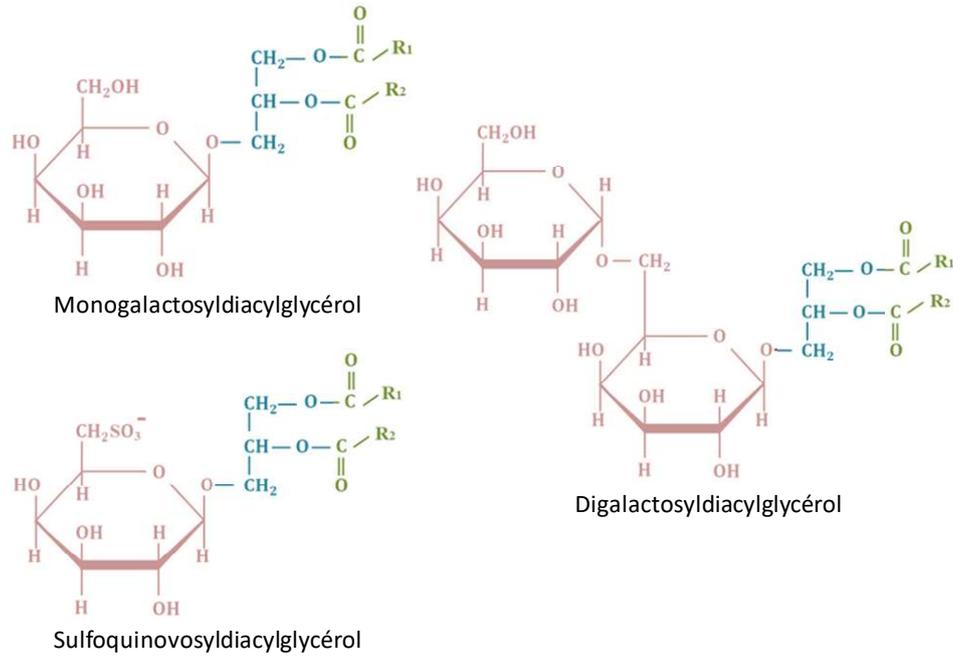


Figure I-6 : Représentation schématique de quelques glycolipides. D'après Hazahari *et al.* (2018)

Les propriétés de ces GL sont importantes pour l'activité photosynthétique. MGDG et DGDG sont des GL neutres, constituant l'essentiel de la bicouche lipidique thylacoïdale. Le rapport MGDG / DGDG peut être important pour la structure et la stabilité de la membrane thylacoïdale (Demé *et al.*, 2014). D'ailleurs, des études chez *Arabidopsis* indiquent que MGDG joue probablement un rôle essentiel dans le mécanisme photoprotecteur de la photosynthèse en favorisant le cycle de la xanthophylle (Aronsson *et al.*, 2008), tandis que SQDG peut être lié au maintien d'une charge anionique à la surface de la membrane thylacoïdale (Kobayashi *et al.*, 2016).

Bétaïne lipides (BL)

Les bétaïne lipides (BL) sont des glycérides non phosphorés qui ont un groupement triméthylammonium chargé positivement et un groupe carboxyle chargé négativement, ces lipides forment des zwitterions à pH neutre (Dembitsky, 1996). Les trois BL (Figure I-7) les plus connus sont la diacylgcéroltriméthylhomosérine (DGTS), la diacylglycérylhydroxyméthyl-triméthyl- β -alanine (DGTA) et la diacylglycérylcarboxyhydroxyméthylcholine (DGCC).

Les BL sont présents chez un nombre limité d'espèces telles que certaines algues, bryophytes, champignons, protozoaires et bactéries photosynthétiques (Dembitsky, 1996). Ils n'ont pas été mis en évidence chez les plantes à fleurs, mais ont été détectés chez certaines

plantes produisant des spores, comme les fougères avec des espèces appartenant aux Equisetophyta et Polypodiophyta (Rozentsvet *et al.*, 2000). La DGTS est la plus répandue dans le monde vivant (Cañavate *et al.*, 2016). Des études taxonomiques suggèrent qu'elle pourrait avoir été le premier lipide de ce type apparu au cours de l'évolution (Künzler et Eichenberger, 1997). Selon la littérature, la DGTA se trouve principalement chez les microalgues qui contiennent les Chl *a* et *c*, comme les espèces appartenant aux Chrysophyceae et Cryptophyceae (Dembitsky, 1996). Les résultats indiquent que la DGTA est également le principal BL chez la diatomée Bacillariophyceae *P. tricornutum* (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2016). Quant à la DGCC, qui a été initialement isolée chez *Diacronema lutheri*, elle est principalement associée aux Haptophyceae (Kato *et al.*, 1996). Elle a aussi été détectée chez les diatomées Mediophyceae telles que *Thalassiosira pseudonana* et *Chaetoceros gracilis* (Martin *et al.*, 2011; Van Mooy *et al.*, 2009), ainsi que chez les Dinophyceae (Cañavate *et al.*, 2016; Kato *et al.*, 1996).

Les études sur la localisation cellulaire des BL suggèrent fortement que ces lipides sont principalement associés à des structures non-plastidiales (Künzler *et al.*, 1997).

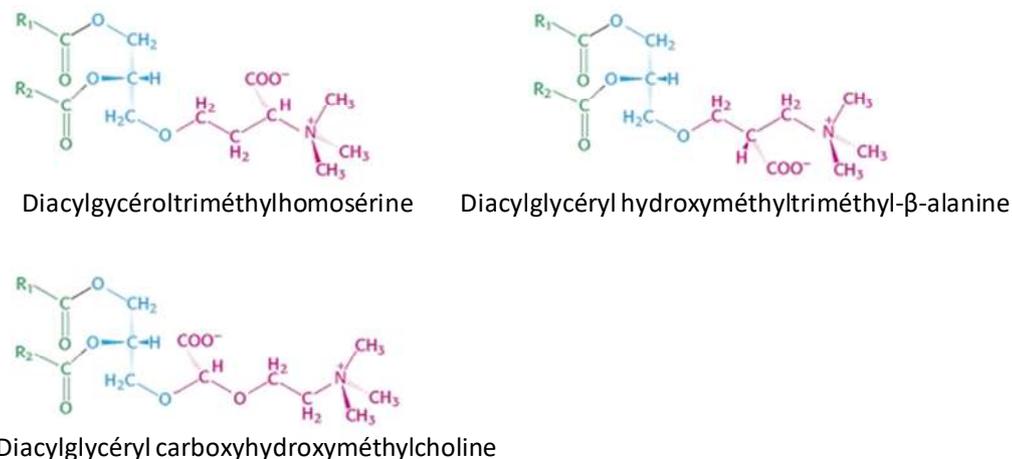


Figure I-7 : Représentation schématique de quelques bêtaïne lipides.
(<http://www.lipidhome.co.uk/lipids/complex/betaine/>)

I.1.3 Synthèse des lipides chez les microalgues

Quel que soit l'organisme eucaryote, la biosynthèse des lipides comprend une voie commune constituée de : (1) la synthèse de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase), (2) l'allongement de la chaîne acyle et (3) la formation des lipides

complexes ainsi que les TAG. Néanmoins, la localisation des différentes étapes varie selon les organismes.

Comme les plantes, les microalgues possèdent des ACCases localisées dans des compartiments subcellulaires différents; l'isoforme située dans le chloroplaste est utilisée pour la synthèse *de novo* d'AG tandis que l'isoforme extra-plastidiale fournit du malonyl-CoA pour l'élongation des AG ainsi que pour d'autres réactions (Harwood, 1996).

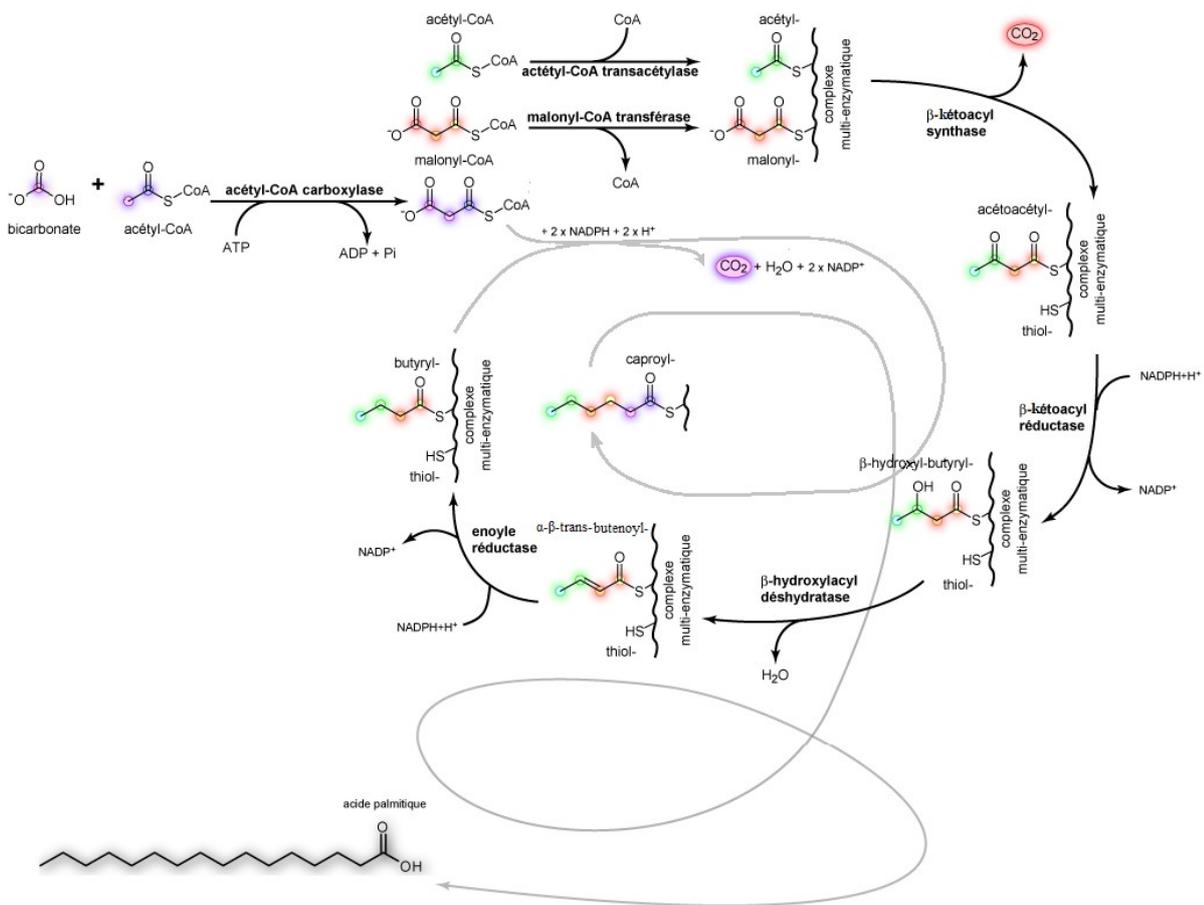


Figure I-8 : Le cycle de la synthèse des acides gras chez les microalgues comprenant les deux premières étapes : (1) L'initiation de la synthèse de malonyl-CoA et (2) L'élongation de la chaîne acyle par FAS II. Les enzymes de FAS II catalysent une série de réactions de la condensation de l'acétyl-CoA avec le malonyl-CoA jusqu'à la formation du squelette des acides gras, le butyryl-ACP (C4). Les molécules de malonyl-CoA sont successivement additionnées au butyryl-ACP jusqu'à jusqu'au palmityl-ACP (C16) ou stéaryl-ACP (C18) (+2 C à chaque cycle).

(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lipogénèse>).

Les microalgues possèdent le système FAS (Fatty Acid Synthase) « procaryote » de type II dans le chloroplaste. C'est un complexe enzymatique dissociable constitué de sept activités distinctes, y compris la protéine porteuse d'acyle (ACP) utilisée comme support acyle pour les

diverses réactions intermédiaires, la malonyl-CoA-ACP transacylase transférant le malonyl-CoA en malonyl-ACP, quatre enzymes séquentielles impliquées dans le cycle d'addition de 2 carbones (β -kétacyl-ACP synthétase, β -kétacyl-ACP réductase, β -hydroxyacyl-ACP déshydratase, enoyl-ACP réductase), ainsi que la thioestérase pour libérer les AGs (Figure I-8). Cependant, jusqu'à présent, la seule thioestérase identifiée chez *P. tricornutum* ne présente aucune similitude avec les thioestérases présentes chez les plantes ou les bactéries (Gong *et al.*, 2011). Aucune thioestérase acyl-ACP n'a été caractérisée chez d'autres diatomées séquencées (Zulu *et al.*, 2018).

D'ailleurs, des études génomiques ont indiqué la présence probable du FAS « eucaryote » de type I (une enzyme hétéro-domaine multifonctionnelle cytosolique) chez certaines microalgues (Vieler *et al.*, 2012). L'apparition du système FAS de type eucaryote peut être liée de manière évolutive à l'organisme récepteur ancestral, et pourrait avoir évolué indépendamment chez différents taxons (Khozin-Goldberg *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2010).

Les produits finaux du système FAS sont généralement l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0). Ces AG précurseurs peuvent ensuite migrer vers les différents compartiments et subir des réactions alternées de désaturation et d'élongation, aboutissant à la synthèse des AGPI-LC, entrant dans la constitution des lipides polaires membranaires et des TAG (Heydarizadeh *et al.*, 2013; Khozin-Goldberg et Cohen, 2011; Radakovits *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les mitochondries sont aussi capables de synthétiser des AG à chaîne courte en tant que précurseurs de la biosynthèse des lipides (Li-Beisson *et al.*, 2010; Wada *et al.*, 1997)

- **Synthèse des AGPI-LC**

La synthèse des AGPI-LC suit une séquence alternée de réactions de désaturation et d'élongation (Figure I-9) (Khozin-Goldberg *et al.*, 2016).

La désaturation des AG se fait en milieu aqueux pour les AG estérifiés à un ACP (ou un CoA), ou au niveau des membranes par des désaturases membranaires (Shanklin et Cahoon, 1998). Les désaturases permettent d'introduire des doubles liaisons généralement de conformation *cis* à des positions spécifiques de la chaîne carbonée : ΔX . Le X indique la position à laquelle la double liaison est introduite sur l'acyle en partant du groupement carboxyle. Chaque réaction de désaturation consomme une molécule d'O₂ et utilise un NADH.

L'élongation à partir de C18 se déroule au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les AG sont d'abord convertis en acyl-CoA et ensuite condensés avec une molécule de malonyl-CoA. Les complexes élongases comprennent quatre activités : la β -cétocoacyl-CoA synthase, la cétocoacyl-CoA réductase, l'hydroxyacyl-CoA déshydratase et l'énoyl-CoA réductase. Similaire à celles de FAS, chaque élongation ajoute 2 carbones issus du malonyl-CoA et utilise 2 NADPH.

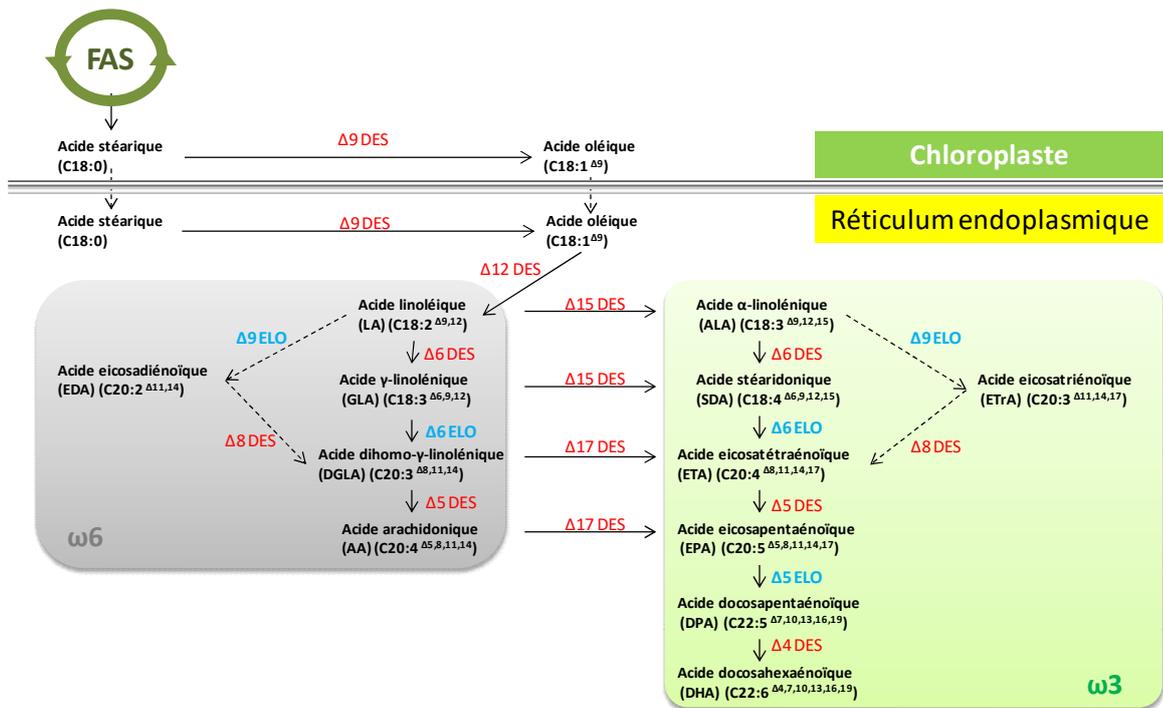


Figure I-9 : Les voies de la synthèse des AGPI-LC chez les microalgues *via* les réactions de désaturation et d'élongation. Les voies respectives commençant par l'acide linoléique (LA) ou l'acide α -linoléique (ALA) comprennent les intermédiaires AGPI-LC des séries $\omega 6$ ou $\omega 3$. Les flèches en pointillés indiquent des voies « alternatives » chez certaines microalgues marines. D'après Martins *et al.* (2013).

Les études de marquage radioactif chez *Lobosphaera incisa*, *Nannochloropsis* sp. et *Monodus subterraneus* ont révélé que trois lipides extraplastidiaux sont impliqués dans les différentes étapes de la biosynthèse des AGPI-LC : PC et DGTS sont impliqués dans les désaturations $\Delta 12$ et $\Delta 6$ subséquentes, alors que PE est le substrat principal pour la $\Delta 5$ désaturation (Bigogno *et al.*, 2002; Khozin-Goldberg *et al.*, 2002). Les AGPI-LC extraplastidiaux peuvent ensuite migrer vers les différents compartiments pour l'assemblage des lipides complexes, autrement dit *via* « la voie oméga » (Domergue *et al.*, 2003; Khozin-Goldberg *et al.*, 2002; Vieler *et al.*, 2012). Le mécanisme de migration des AG entre les différents compartiments dans les algues est encore inconnu. Il repose très probablement sur le contact

physique direct de l'enveloppe plastidiale externe et des membranes du RE dans ces organismes (Kroth, 2002; Zulu *et al.*, 2018).

- **Assemblage des glycérolipides**

Les recherches ont montré que les voies métaboliques des principaux glycérolipides sont apparemment conservées au cours de l'évolution (Li-Beisson *et al.*, 2015). La voie majeure de la synthèse des glycérolipides (Figure I-10) commence par la réduction de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un intermédiaire de la glycolyse, en glycérol-3-phosphate (Gro3P). En outre, DHAP et donc Gro3P peuvent également être synthétisés à partir des acides aminés et des intermédiaires du cycle de l'acide citrique (gluconéogenèse). Une chaîne acyle est transférée au Gro3P en position 1 par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) pour produire l'acide lysophosphatidique (LPA) qui est estérifié une deuxième fois en position 2 par LPA acyltransférase (LPAT), donnant l'acide phosphatidique (PA). Puis la déphosphorylation par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP) produit le diacylglycérol (DAG) (Klok *et al.*, 2014; Zienkiewicz *et al.*, 2016).

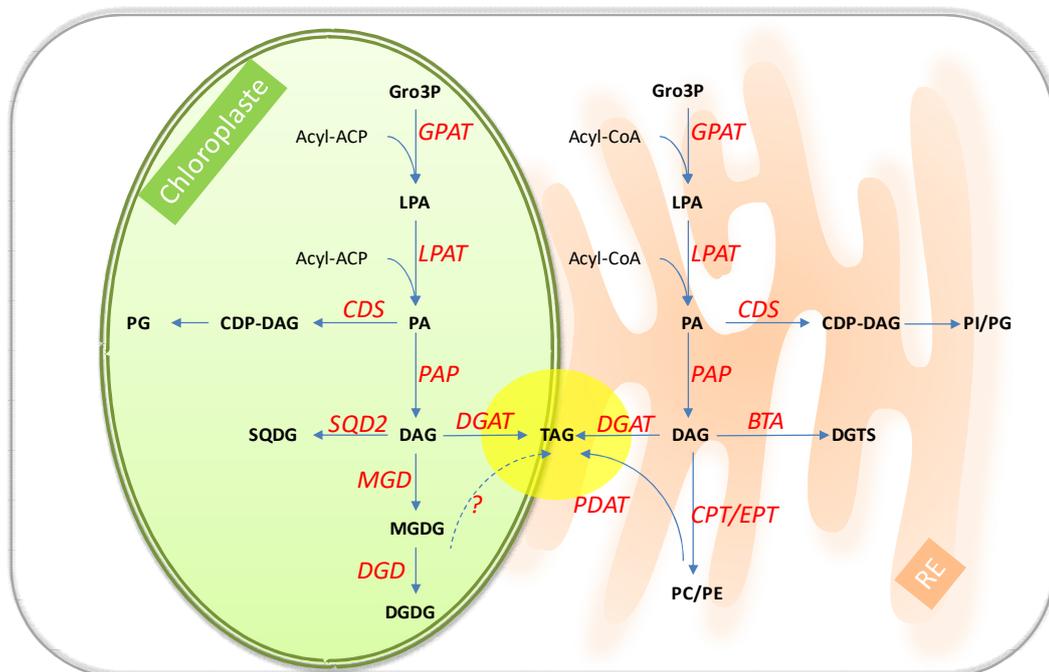


Figure I-10 : Représentation schématique de l'assemblage des lipides chez les microalgues. D'après Li-Beisson *et al.* (2015)

En raison de la spécificité de la LPAT, la distribution des acides gras est différente suivant les lieux de synthèse du PA. Selon les compartiments, on distingue deux voies différentes pour l'assemblage des glycérolipides : (1) la voie procaryotique, se produisant dans les plastes, utilisant les acyl-ACP comme substrats et contenant des acides gras à 16 carbones en position 2; et (2) la voie eucaryotique, se produisant à l'extérieur du plaste (principalement dans le RE), utilisant les acyl-CoA comme substrats et ayant des acides gras à 18 carbones en position 2 (Ohlrogge et Browse, 1995). Chez *Chlorella kessleri*, les deux voies fournissent des lipides pour toutes les membranes plastidiales et extraplastidiales (Norihiro Sato *et al.*, 2003), suggérant un trafic des squelettes de diacylglycérol entre les différents compartiments. Au contraire, les études chez *C. reinhardtii* montrent que les lipides des membranes plastidiales sont exclusivement d'origine plastidiale, alors que les lipides extraplastidiaux sont quasiment tous synthétisés dans le RE (Giroud *et al.*, 1988; Li-Beisson *et al.*, 2015). Cependant, il convient de noter que cette enzyme LPAT n'a pas encore été étudiée en détail chez les microalgues et il est possible que cette répartition ne s'applique pas à toutes les autres microalgues (Liu et Benning, 2013).

Le DAG peut être aussi formé par la voie du monoacylglycérol (MAG), dans laquelle 2 MAG sont utilisés. Ces MAG peuvent directement provenir du Gro3P après l'action de certaines GPAT (Yang *et al.*, 2010), ou du LPA après action de phosphatases spécifiques (Reddy *et al.*, 2010), ou même des produits de TAG hydrolysés. Ils sont convertis à nouveau en DAG par la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT). Le DAG ainsi que le PA constituent des molécules « carrefours » importantes entre les voies de biosynthèse des lipides membranaires et celles des lipides neutres (TAG) (Sayanova *et al.*, 2017).

Synthèse des triacylglycérols (TAG)

La formation de TAG se fait soit par ajout d'un autre groupe acyl gras par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) à partir du DAG (synthèse *de novo*) (Lung et Weselake, 2006), soit par recyclage, en utilisant directement des phospholipides grâce à la phospholipide - diacylglycérol acyltransférase (PDAT) (Yoon *et al.*, 2012), ou à une lipase spécifique agissant sur les lipides membranaires et libérant des groupements acyles pour la synthèse des TAG (Li *et al.*, 2012).

Par analogie avec les cellules végétales, il a été proposé à l'origine que l'assemblage des TAG se produisait principalement dans le RE. Cependant, des études de plus en plus nombreuses

suggèrent que chez certaines microalgues, une voie plastidiale de biosynthèse des TAG a lieu *de novo* (Zienkiewicz *et al.*, 2016). Le chloroplaste pourrait même jouer un rôle plus important que le RE (Maeda *et al.*, 2017). Il est estimé qu'environ 90 % des TAG produits chez *C. reinhardtii* sont issus des chloroplastes (Fan *et al.*, 2011). Les TAG formés sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques (Goold *et al.*, 2015). Certains AG stockés dans les TAG peuvent être réutilisés pour fabriquer de nouvelles membranes lorsque les cellules reprennent leur croissance (Khozin-Goldberg *et al.*, 2005).

Synthèse des glycolycérides (GL)

Dans les plastes, la monogalactosyldiacylglycérol synthase (MGD) transfère le galactose de l'UDP-galactose au DAG, générant ainsi le MGDG. Une partie du MGDG subit une seconde glycosylation grâce à la digalactosyldiacylglycérol synthase (DGD), ce qui donne du DGDG. En ce qui concerne le SQDG, l'UDP-sulfoquinovose synthase (SQD1) condense l'UDP-glucose avec du sulfite afin de générer l'UDP 6-sulfoquinovosyl qui est ensuite transféré par la sulfoquinovosyldiacylglycérol synthase (SQD2) au DAG pour la formation de SQDG (Li-Beisson *et al.*, 2015; Petroutsos *et al.*, 2014).

Synthèse des phosphoglycérines (PL)

La biosynthèse de PC et PE est réalisée à partir du DAG par un transfert de la choline et de l'éthanolamine du CDP-choline et du CDP-éthanolamine, respectivement. Cette voie est nommée la voie de Kennedy (1956). Chez la levure et les mammifères, ce transfert est catalysé par des enzymes distinctes : cholinephosphotransférase (CPT) et éthanolaminephosphotransférase (EPT), respectivement. En revanche, chez les plantes, les aminoalcoolphosphotransférases (AAPT) jouent le double rôle de CPT et EPT (Dewey *et al.*, 1994). D'autre part, PC peut être produite par méthylation à partir de PE, *via* des étapes S-adénosylméthionine (AdoMet)-dépendantes. PE peut aussi être produite *via* la décarboxylation de PS.

La formation de PS, PI et PG est réalisée à partir de PA, *via* l'intermédiaire de CDP-DAG, grâce à la CDP-DAG synthase (CDS). Le CDP-DAG est ensuite le substrat de la phosphatidylsérine synthase (PSS), phosphatidylinositol synthase (PIS), ou phosphatidylglycérol phosphate (PGP) synthase (PGPS) et PGP phosphatase (PGPP), respectivement pour la biosynthèse de PS, PI et PG (Li-Beisson *et al.*, 2010).

La synthèse *de novo* des phosphoglycérides a lieu principalement dans le RE, seule la synthèse du PG peut se faire au niveau du RE, du chloroplaste ou des mitochondries (Li-Beisson *et al.*, 2010; Müller et Frentzen, 2001; Schlame et Greenberg, 2017).

Synthèse des bétaine lipides (BL)

Actuellement, très peu de recherches sont menées sur la synthèse des BL. Des études à l'aide d'isotopes radioactifs ont montré que la méthionine est la source à la fois de la chaîne carbonée C4 et des groupes N-méthyles de la DGTS, suggérant que la S-adenosylméthionine (AdoMet) est le donneur actif (Sato, 1988). Chez les bactéries *Rhodobacter sphaeroïdes* ainsi que *Sinorhizobium meliloti*, deux enzymes nommées BtaA et BtaB ont été identifiées comme essentielles et suffisantes pour ce processus (Figure 1-11). BtaA joue un rôle d'AdoMet : DAG 3-amino-3-carboxypropyltransférase en transférant d'abord la chaîne C4 de la méthionine au DAG. Ce transfert forme la diacylglycérilhomosérine intermédiaire (DGHS). Puis, la BtaB fonctionne comme AdoMet-dépendante N-méthyltransférase, et ajoute trois unités méthyles sur la fonction amine de la DGHS afin de former la DGTS finale (Hofmann et Eichenberger, 1996; Klug et Benning, 2001; López-Lara *et al.*, 2005; Riekhof *et al.*, 2005).

Les études menées chez la Chlorophyceae *C. reinhardtii* ont mis en évidence un seul polypeptide, BTA1_{Cr}, contenant les domaines BtaA-like et BtaB-like qui effectuent toutes les étapes nécessaires à la biosynthèse des DGTS au niveau du RE (Riekhof *et al.*, 2005). Les séquençages de génomes ont révélé qu'un grand nombre de mycètes, par exemple, *Neurospora crassa*, *Kluyveromyces lactis* et *Flammulina velutipes*, codent apparemment des homologues de la protéine BTA1_{Cr} de *C. reinhardtii* (Riekhof *et al.*, 2014; Senik *et al.*, 2015).

Des travaux utilisant différents marquages radioactifs de la DGTS : [³H] (glycérol) / [¹⁴C] (tête polaire) montrent que la partie glycéril-triméthylhomosérine des DGTS est nécessaire pour former la tête polaire des DGTA. Ainsi, ce processus implique une décarboxylation et recarboxylation de la tête polaire des DGTS et une désacylation et réacylation simultanées du groupement glycérol (Vogel et Eichenberger, 1992). Cependant, ce processus n'a pas été mis en évidence entre DGTS ou DGTA et DGCC.

Des études ont montré que les BL sont impliqués dans le transfert des AG à partir du cytoplasme vers le chloroplaste et qu'ils peuvent jouer le rôle d'accepteur primaire des AG exogènes avant qu'ils ne soient utilisés pour synthétiser de nouveaux lipides (Eichenberger et Gribo, 1997; Vogel et Eichenberger, 1992). Murakami *et al.* (2018) indiquent que les DGTS sont

impliquées dans l'adaptation aux basses températures grâce à leur forte teneur en EPA chez *Nannochloropsis oceanica*. D'ailleurs, en raison de leur ressemblance structurale, les BL sont capables de se substituer aux PL en cas de carence en P (Cañavate *et al.*, 2017b).

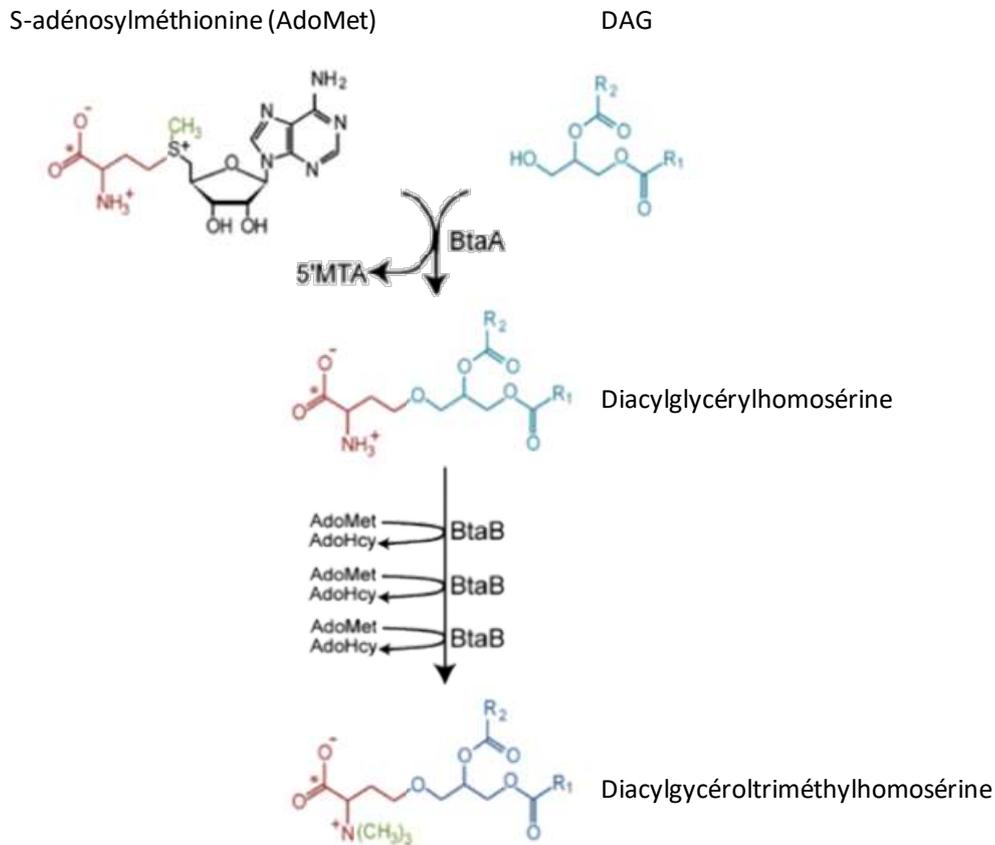


Figure I-11 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de DGTS chez les bactéries. D'après Riekhof *et al.* (2005)

I.2 L'azote et le phosphore dans l'environnement et chez les microalgues

L'azote (N) et le phosphore (P) sont, tout autant que le carbone, les éléments les plus importants de la biomasse phytoplanctonique naturelle. Ce sont des ressources indispensables à tous les organismes, ils interviennent dans la composition de molécules essentielles dans le vivant.

Redfield (1934) a déterminé une composition moyenne du phytoplancton en éléments C, N et P ; celle-ci correspond au rapport atomique de 106 : 16 : 1. Ce rapport pourrait refléter les besoins relatifs du phytoplancton en nutriments. Des études sur la mono-limitation nutritive ont montré l'existence d'un rapport critique qui connaît un maximum pour des taux de croissance intermédiaires (Ågren, 2004; Leonardos et Geider, 2004; Terry *et al.*, 1985). Le rapport N : P

critique, qui marque la transition entre la limitation en N et celle en P dans les cellules phytoplanctoniques, semble être dans la gamme 20-50 (Geider et La Roche, 2002). En cas de limitation extrême en N ou en P, le N: P originellement présent dans le milieu pourrait être dans une gamme de rapports < 5 ou > 50 , respectivement (Elrifi et Turpin, 1985; Geider et La Roche, 2002; Goldman, 1986; Rhee, 1974).

I.2.1 L'azote

L'atmosphère contient un pool de N extraordinairement abondant (78 %), cependant peu d'organismes sont capables de fixer N gazeux, ces organismes diazotrophes sont des procaryotes. La grande majorité des organismes symbiotiques ou non symbiotiques fixent N sous forme minérale : nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) et ammonium (NH_4^+). Néanmoins, les puits d'azote dans l'eau de mer restent peu importants (Vitousek et Howarth, 1991). Dans la nature, N est souvent considéré comme le principal élément limitant sur une grande partie de la surface des océans aux basses latitudes. La productivité dans la majeure partie des océans ($\sim 75\%$) est limitée par la disponibilité de N inorganique (Bristow *et al.*, 2017).

Le N intracellulaire se répartit dans une diversité de molécules essentielles. N est principalement présent dans les acides aminés (30 %) et dans les acides nucléiques (30 %). De plus, environ 10 % de N cellulaire sont présents dans les chlorophylles chez la plupart des microalgues. La chitine peut aussi être un pool azoté important chez les diatomées (Durkin *et al.*, 2009; Geider et La Roche, 2002).

- **Assimilation de l'azote chez les microalgues**

L'assimilation de N chez les microalgues eucaryotes nécessite l'absorption de N inorganique, la réduction intracellulaire éventuelle en ammonium (NH_4^+), et l'incorporation de NH_4^+ dans les molécules organiques (acides aminés) (Charpin et Devaux, 1998).

Les microalgues absorbent le N sous forme de NO_3^- et/ou NO_2^- et/ou NH_4^+ . Les nitrates sont considérés comme la source de N majoritaire avec des concentrations 10 à 1000 fois plus élevées que celles de NH_4^+ . Cependant, lorsque les deux éléments sont apportés aux mêmes concentrations, NH_4^+ semble être la source préférentielle avec une absorption plus rapide que celle de NO_3^- (Morot-Gaudry *et al.*, 2006). Bien que de nombreux aspects restent à discuter, il existe un certain consensus sur le fait que le transport de nitrate représente une étape essentielle dans le contrôle de l'assimilation de N (Galvan et Fernández, 2001).

Les NO_3^- ou les NO_2^- sont absorbés grâce à un transport actif de type secondaire, c'est-à-dire lié à l'activité d'une H^+ -ATPase (ou Na^+ -ATPase). Ils utilisent un gradient de protons pour alimenter le transport. Une à deux moles d'ATP sont nécessaires pour transporter 1 mole de NO_3^- (Gniazdowska *et al.*, 1998; Tischner, 2000). Dans les plantes supérieures, deux types de transporteurs de nitrate, NRT1 et NRT2, ont été identifiés. Les NRT1 sont affiliés à la famille Peptide Transporteur (PTR), et les NRT2 à la famille Nitrate / Nitrite Porteur (NNP) (Forde, 2000; Tsay *et al.*, 2007). Les deux familles appartiennent à la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily). Les transporteurs sont constitués typiquement de 12 hélices transmembranaires, reliés par des boucles cytosoliques (Forde, 2000; Galvan et Fernández, 2001). Crawford et Glass (1998) ont montré que quatre types de systèmes de transport existent en fonction de la concentration de NO_3^- dans l'environnement. Deux systèmes de transport à haute affinité (HATS) interviennent pour des concentrations en N très faibles ($< 250 \mu\text{M}$). Le premier système (iHATS) est inductible par le NO_3^- et se caractérise par des valeurs de K_m et V_{max} élevées; le second système (cHATS) est exprimé de manière constitutive et ne dépend pas de la concentration en N, les valeurs de K_m et de V_{max} étant faibles. Deux autres systèmes de transport à faible affinité (iLATS et cLATS), interviennent lorsque la concentration en N atteint des valeurs proches de $500 \mu\text{M}$ (Crawford et Glass, 1998; Galvan et Fernández, 2001).

Des homologues de transporteurs de nitrate ont été identifiés chez diverses espèces d'algues. *C. reinhardtii* possède au moins quatre systèmes de transport de type NRT2, chacun ayant des propriétés cinétiques et régulatrices distinctes (Galvan et Fernández, 2001). Ces dernières années, plusieurs gènes codant des transporteurs de nitrate ont été identifiés et caractérisés chez certaines microalgues, telles que *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand et Dahlin, 2000), *Dunaliella salina* (He *et al.*, 2004), *Dunaliella tertiolecta* (Song et Ward, 2007), *Chlorella sorokiniana* (Koltermann *et al.*, 2003), *Thalassiosira weissflogii*, *Skeletonema costatum*, *Ditylum brightwellii*, *Chaetoceros muelleri*, *Emiliana huxleyi* (Song et Ward, 2007). Plus récemment, chez l'Haptophyte *Tisochrysis lutea*, quatre gènes de transport de nitrate ont été rapportés (Charrier *et al.*, 2015).

Le NO_3^- est réduit en NO_2^- dans le cytoplasme par la nitrate réductase (NR). Puis le NO_2^- est transporté dans les chloroplastes par un transporteur de nitrite pour être réduit en NH_4^+ par la nitrite réductase (NiR). Ces réactions de réduction nécessitent du pouvoir réducteur (NAD(P)H) pour la NR et de la ferrédoxine réduite pour la NiR, respectivement. Deux enzymes, la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) catalysent le transfert de NH_4^+ sur un acide cétonique pour former des acides aminés. La GS nécessite pour son fonctionnement de l'ATP, la

GOGAT utilise le pouvoir réducteur de la ferrédoxine réduite (Morot-Gaudry *et al.*, 2006). Une compétition entre la fixation du C et l'assimilation de N est souvent observée chez les algues puisque le flux d'électrons photosynthétiques est partagé entre l'assimilation du CO₂ et celle des nitrates (Morot-Gaudry, 1997).

Les diatomées possèdent de plus des NAD(P)H-GOGAT et GS mitochondriales. Le couple GS/GOGAT mitochondrial peut catalyser la formation de la glutamine à partir de NH₄⁺ dérivé de réactions cataboliques cytosoliques (Alipanah *et al.*, 2015; Hockin *et al.*, 2012). Par ailleurs, les diatomées possèdent un cycle complet d'ornithine-urée (OUC) qui est intimement lié au cycle des TCA et GS/GOGAT (Allen *et al.*, 2011). Il a donc été proposé que l'OUC relie le métabolisme du C et la fixation / remobilisation de N. Ce cycle sert de centre de distribution et de reconditionnement du C inorganique et de N selon la disponibilité de N qui fluctue dans les milieux aquatiques (Allen *et al.*, 2011; Obata *et al.*, 2013). Allen *et al.* (2011) ont suggéré que l'OUC pourrait aussi être présent chez les Haptophytes.

L'azote peut aussi être stocké sous forme inorganique. *T. weissflogii* et *S. costatum* peuvent former de très grands pools de NO₃⁻ intracellulaires, allant de 41 à 45 mmol N L⁻¹ (basés sur le volume cellulaire) et la teneur en NH₄⁺ atteint 47 mmol N L⁻¹ chez *D. lutheri* (Lomas et Glibert, 2000). Lourenço *et al.* (2002) rapportent que N inorganique peut représenter entre 6 et 42 % du N intracellulaire total.

1.2.2 Le phosphore

La concentration en P dans la croûte terrestre atteint environ 1050 ppm, le classant au 10^{ème} rang des éléments les plus abondants sur Terre (Taylor, 1964). Malgré un pool important de P, 95 % sont sous forme de roche présentant une faible biodisponibilité (Solovchenko *et al.*, 2016). Dans les roches phosphatées, le P se trouve sous forme de phosphate de calcium Ca₅(PO₄)₃ pouvant être associé à un autre anion X, pouvant être OH⁻, F⁻ ou Cl⁻ dans l'hydroxyapatite, la fluoroapatite et la chloroapatite, respectivement (Boitt, 2017). Pour rendre le P disponible pour les producteurs primaires, le P doit être sous la forme d'ion soluble, provenant naturellement de l'érosion éolienne et hydrique des roches. La solubilité des ions tels que le phosphate PO₄³⁻ et les différentes formes conjuguées comme l'ion hydrogénophosphate HPO₄²⁻ et l'ion dihydrogénophosphate H₂PO₄, est souvent limitée par des adsorptions rapides dans des complexes contenant de l'aluminium (pH faible) ou du calcium (pH élevé) dans les sols (Boitt, 2017). Lorsque le P terrigène est dissous, il s'écoule vers les rivières, les lacs et les océans.

Dans l'eau de mer, la teneur en P est d'environ 0,07 ppm, le situant au 19^{ème} rang des éléments les plus représentés (Fairbridge, 1972; Solovchenko *et al.*, 2016). Dans la zone euphotique marine (eaux de surface océaniques), les concentrations en P inorganique dissous (DIP) mesurées varient, passant de 0,2 nM dans certaines zones de la mer des Sargasses à 1 - 3 μ M dans les eaux le long des côtes orientales de l'Atlantique et du Pacifique (Redfield *et al.*, 1963; Wu *et al.*, 2000). Les sources d'approvisionnement en P comprennent principalement les apports terrigènes et sédimentaires (eaux côtières), ainsi que le réapprovisionnement par les eaux plus profondes contenant des concentrations en P plus élevées grâce au phénomène de « upwelling » (ou remontée d'eau) (Karl, 2014). Le P est soustrait des eaux euphotiques par l'absorption phytoplanctonique et bactérienne, puis les détritiques biogènes transfèrent le P vers les eaux plus profondes et les sédiments, où il se fossilise finalement pour redevenir de l'apatite.

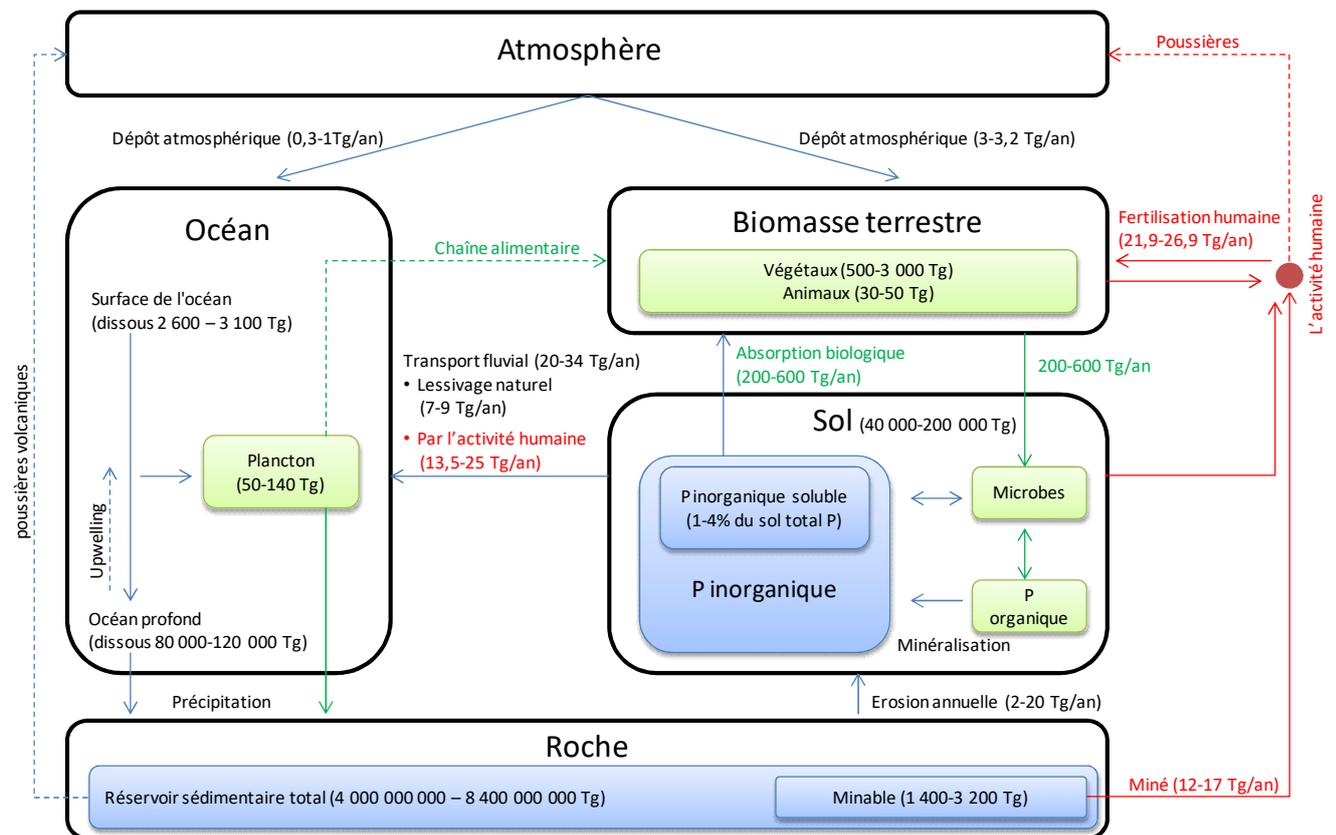


Figure I-12 : Cycle du phosphore : quantité de phosphore (Tg = 10¹² g P) dans les différents compartiments terrestres et flux annuels naturels et anthropiques (Tg P par an) entre ces différents compartiments. D'après Peñuelas *et al.* (2013)

Le cycle du P naturel dépend de l'élévation tectonique des gisements et de l'exposition aux intempéries, sur une échelle de temps de 10⁷-10⁸ ans. En raison de ces dynamiques

extrêmement lentes, le P est considéré comme une ressource épuisable (Solovchenko *et al.*, 2016). A cause de l'augmentation des activités humaines, notamment de l'exploitation massive de P pour la production d'engrais agricoles, les estimations indiquent que les ressources connues en P pourraient se tarir d'ici 30 à 300 ans (Cordell *et al.*, 2009; Cordell et White, 2011).

Par ailleurs, malgré une exploitation massive du P, sa teneur reste faible par rapport à l'augmentation de la disponibilité en C et en N. Au cours des dernières décennies, le N anthropique provenant des engrais azotés, des déchets et des NO_x produits lors de la combustion des combustibles fossiles, entraîne un apport non équilibré de N et de P dans l'environnement. Le rapport N : P moyen global des apports d'engrais a augmenté de 51 % depuis 1975. En plus, les dépôts atmosphériques augmentent de 10 à 20 fois le rapport défini par Redfield puisque la stoechiométrie présente actuellement un rapport molaire N : P entre 44 et 47 sur terre, et entre 114 et 370 dans les océans (Peñuelas *et al.*, 2013). Selon Peñuelas *et al.* (2011), les intrants anthropiques intégrés à la biosphère ont globalement un rapport molaire N : P d'environ 22,8-44,6, et celui-ci continue à augmenter. L'augmentation du rapport N : P particulièrement au niveau fluvial pourrait conduire à des situations d'eutrophisation dans les milieux côtiers et estuariens, provoquant une consommation importante de P dans ces zones. Au fil du temps, une limitation en P se met en place à plus grande échelle à la surface des eaux qui deviendront probablement plus oligotrophes qu'actuellement, malgré l'apport accru des nutriments essentiels (Karl et Church, 2017; Kim *et al.*, 2014). La limitation en P a été mesurée dans les eaux côtières de la mer du Nord, en Méditerranée, dans le golfe du Mexique, en mer Rouge et diverses régions côtières chinoises (la mer de Chine orientale et la mer Jaune) (Burson *et al.*, 2016; Mingzhu Fu *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 1990; Laurent *et al.*, 2012; S. Lin *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2013; Turner et Rabalais, 2013). Dans d'autres régions, comme l'Atlantique subtropical nord, la co-limitation en N et P a été observée (Moore *et al.*, 2013).

Les concentrations en P cellulaire sont généralement proches de 5-10 mM (Solovchenko *et al.*, 2016). Il fait notamment partie intégrante des acides nucléiques (ADN et ARN), et joue ainsi un rôle essentiel dans le stockage, la réplication et la transcription de l'information génétique. En effet, les ARN ribosomiaux représentent 80 à 85 % des acides nucléiques chez les eucaryotes et ils sont essentiels à la biosynthèse des protéines, la plupart des atomes de P constitutifs des acides nucléiques est associée aux ribosomes (Blank, 2012; Elser, 2012). Le P est aussi présent dans les phospholipides (PL) qui sont des constituants clés des membranes cellulaires, et contribue ainsi à 5-10 % de la biomasse cellulaire chez la plupart des microalgues (Elser, 2012). Les études chez *Prochlorococcus* ont estimé que la synthèse de l'ARN

consommait environ la moitié de l'absorption totale de P, alors que la synthèse des PL utilisait environ 20 % (Van Mooy et Devol, 2008). Bien que ces contributions ne soient pas identiques pour tous les taxons, elles soulignent l'importance du P dans ces deux pools cellulaires.

En outre, les pools adénosine phosphate (ATP, ADP et AMP), les agents réducteurs (NADPH), ainsi que les polyphosphates jouent également un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire (Falkowski et Raven, 2007). D'ailleurs, le P régule l'activité et la fonction de nombreuses protéines (*via* la phosphorylation et la déphosphorylation) ; il intervient dans les voies de signalisation dans les cellules par le biais de l'inositol triphosphate (IP₃). En résumé, le P est au cœur de la régulation de nombreux processus métaboliques (Cooper, 2000).

Galbraith et Martiny (2015) ont révélé que le rapport P : C particulaire dans le phytoplancton varie de façon linéaire et positive en fonction de la concentration externe en P dissous. Le lien étroit entre P et C souligne l'importance de l'effet du P sur le métabolisme carboné dans le phytoplancton, notamment dans des conditions de faible concentration en P.

- **Absorption du phosphore chez les microalgues**

Face aux concentrations en P très variables dans le temps et l'espace dans la zone euphotique de l'océan (Turpin et Harrison, 1979), les microalgues possèdent des stratégies particulièrement efficaces pour absorber cet élément chimique en conditions oligotrophes auxquelles elles sont parfois soumises.

Les microalgues couvrent leur besoin en P en absorbant cet élément sous forme de phosphates inorganiques dissous (DIP). En raison du potentiel électrochimique négatif de la membrane plasmique et des concentrations intra-cellulaires, le transport passif du P anionique est généralement réfuté. L'absorption du P est un processus actif de type secondaire, nécessitant la consommation d'ATP et impliquant un co-transport avec des cations (les plus probables : H⁺ ou Na⁺) pour faciliter le transport de P contre le gradient électrochimique (Dick *et al.*, 2014). Deux familles de transporteurs du P ont été mises en évidence chez les eucaryotes unicellulaires : (1) la famille des transporteurs de P inorganique (PiT) et (2) la famille des symports P-H⁺ (PHS). Les membres de la famille PiT ont de 354 à 681 résidus d'acides aminés et de 10 à 12 domaines transmembranaires, qui transportent le P sous forme d'anions par co-transport avec H⁺ ou Na⁺. La famille PHS fait partie de la superfamille MFS et comprend des symports P / H⁺ de 400 à 600 résidus d'acides aminés et de 12 à 14 domaines transmembranaires (Dick *et al.*, 2014; Saier, 2000).

Lin *et al.* (2016) ont montré que les systèmes de transport du P présentent des affinités différentes. Les transporteurs à faible affinité se lient relativement faiblement aux nutriments, par conséquent, ils ont des taux d'absorption maximale plus élevés et fonctionnent plus efficacement à des concentrations élevées de substrat. Au contraire, les transporteurs à haute affinité se lient plus étroitement au substrat et le libèrent plus lentement dans la cellule, ils sont intrinsèquement moins efficaces à des concentrations élevées de substrat, mais sont nécessaires quand les concentrations en nutriments sont faibles. Des homologues de transporteurs du P ont déjà été identifiés chez des algues diverses, telles que *Tetraselmis chui* (Chung *et al.*, 2003), *C. reinhardtii* (Moseley *et al.*, 2006), *Micromonas* et *Ostreococcus* (Worden *et al.*, 2009), *Aureococcus anophagefferens* (Wurch *et al.*, 2011), *E. huxleyi* (Dyhrman *et al.*, 2006), *Prymnesium parvum* (Beszteri *et al.*, 2012), *T. pseudonana* (Fu *et al.*, 2013), *P. tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008), *N. oceanica* (Mühlroth *et al.*, 2017), *Alexandrium catenella*, *Amphidinium caterae*, *Karlodinium veneficum* et *Prorocentrum donghaiense* (Lin *et al.*, 2016). La diversité des transporteurs du P varie significativement selon les espèces d'algues. *N. oceanica* renferme 6 types de P-transporteurs putatifs annotés (Mühlroth *et al.*, 2017), tandis que Cruz de Carvalho *et al.* (2016) en ont identifié 24 putatifs chez *P. tricornutum* parmi lesquels 5 co-transporteurs Na⁺ / P qui partagent une homologie de séquence avec les transporteurs rénaux des mammifères, suggérant un éventuel échange horizontal de gènes. Les analyses de Monier *et al.* (2012) soulignent que plusieurs événements indépendants de transfert de gènes des P- transporteurs se sont produits entre des virus marins et des hôtes eucaryotes et bactériens.

Des stratégies utilisées par les microorganismes pour optimiser le piégeage du P en réponse à la limitation en P comprennent une augmentation du nombre de P- transporteurs et / ou le remplacement des transporteurs à faible affinité par des transporteurs à plus forte affinité. Une régulation à la hausse des transporteurs à haute affinité donne aux cellules la capacité d'absorber le P plus efficacement lorsque les concentrations externes sont faibles, au prix d'une diminution du taux d'absorption maximal (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; S. Lin *et al.*, 2016; Riegman *et al.*, 2000).

Par ailleurs, certaines espèces phytoplanctoniques sont aussi capables d'utiliser le P organique dissous (DOP) (Herbes *et al.*, 1975; Lin *et al.*, 2016). C'est une autre ressource disponible quand la concentration de DIP est faible. McLaughlin *et al.* (2013) estiment que 17-82 % du P absorbé par le phytoplancton dans la mer des Sargasses sont fournis par le DOP quand les rapports DOP : DIP dans les eaux de surface sont très élevés. Cependant l'utilisation de DOP est plus coûteuse énergétiquement, et exige généralement la conversion en PO₄ par des

enzymes sécrétées avant son assimilation métabolique (Falkowski et Raven, 2007). La plus répandue et la plus étudiée des enzymes dégradant le DOP est la phosphatase alcaline (PAL) extracellulaire qui hydrolyse les esters monophosphates organiques à la surface des cellules (Dyhrman, 2016). L'activité enzymatique de la PAL a été largement utilisée comme indicateur d'insuffisance en DIP (Lin *et al.*, 2016; Lomas *et al.*, 2010). Des études chez certaines microalgues d'eau douce montrent que l'activité PAL est contrôlée plutôt par les pools de P intracellulaires (Elgavish *et al.*, 1982; Litchman et Nguyen, 2008), tandis que d'autres études chez les microalgues marines soulignent que l'induction de PAL pourrait être principalement attribuée à l'effet de la concentration externe en P (Cañavate *et al.*, 2017a). Néanmoins, une grande variabilité interspécifique de l'activité enzymatique de PAL en réponse à une limitation en P a été observée dans plusieurs études (Cañavate *et al.*, 2017a; Dyhrman et Ruttenberg, 2006; González-Gil *et al.*, 1998; Ivančić *et al.*, 2016). Chez *Nannochloropsis*, qui ne renferme aucune PAL, les phosphatases acides pourpres (PACP) extracellulaires jouent probablement un rôle alternatif dans l'eau de mer à faible DIP (Mühlroth *et al.*, 2017).

De plus, certaines microalgues peuvent aussi acquérir le P par la consommation phagotrophique d'autres micro-organismes (Dyhrman, 2016).

- **Stockage du phosphore chez les microalgues**

L'absorption de P par les microalgues peut répondre de façon dynamique selon la disponibilité des nutriments. Les cellules d'algues exposées à un milieu riche en P à long terme tendent à accumuler des quantités substantielles de P intracellulaire, il s'agit de l'absorption de luxe (Cembella *et al.*, 1984). Ceci est souvent considéré comme une adaptation des microalgues vis-à-vis des variations de disponibilité de P (Watanabe *et al.*, 1988) ou une stratégie de compétition vis-à-vis des espèces concurrentes (De Mazancourt et Schwartz, 2012).

Le mécanisme majeur connu pour le stockage de P en excès dans le phytoplancton est la formation de polyphosphates (polyP) qui se compose de chaînes linéaires de plusieurs centaines de résidus phosphates liés par des liaisons phosphoanhydrides (Kornberg *et al.*, 1999). L'analyse chimique a montré que chez *D. lutheri* et *T. pseudonana*, les polyP constituent la forme majoritaire des réserves phosphatées, approchant 70 % et 40 % respectivement, du P total cellulaire dans des conditions riches en P ou limitées en N (Perry, 1976; Sakshaug et Holm-Hansen, 1977). Les polyP sont utilisés par les cellules non seulement pour le stockage de P, mais aussi pour le stockage d'énergie (Cembella *et al.*, 1984; Kornberg *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2016).

Le P ainsi stocké peut permettre à la cellule de survivre dans des conditions de carence en P à court terme, sans perturbation métabolique majeure.

I.3 Réponses à une limitation nutritive chez les microalgues

I.3.1 Réponses à la limitation en azote

Au cours de la dernière décennie, la limitation en N a été particulièrement étudiée chez les microalgues, surtout dans le but de stimuler l'accumulation de lipides neutres (voir section I.1.1). Ces accumulations ont souvent été présentées comme le résultat d'un déséquilibre entre les métabolismes de N et C (Shifrin et Chisholm, 1981). Récemment, cette capacité est considérée comme une stratégie afin de canaliser des photoassimilats en excès lors d'un déséquilibre métabolique, en réduisant également les risques de photo-oxydation (Solovchenko, 2012).

Une étude chez *P. tricornutum* montre que environ 60 % des lipides sont synthétisés de *novo* pendant 3 jours de privation de NO_3^- , et que ces lipides produits sont principalement des TAG (Burrows *et al.*, 2012). Allen *et al.* (2015) soulignent que la production accrue de TAG en carence de N, au moins en partie, provient du recyclage des lipides membranaires. Les GL dans les membranes des thylakoïdes, notamment MGDG, diminuent de façon concomitante avec l'augmentation de la concentration en TAG. Les GL semblent être redistribués et ensuite recyclés pour la synthèse de TAG. Néanmoins, le changement au niveau des PL varie selon les espèces (Allen *et al.*, 2015; Juergens *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2014). Des études menées chez *Chlorella* sp. et *Nannochloropsis* sp. montrent que les teneur en PG ont été fortement augmentés (par rapport aux niveaux initiaux très bas), compensant la perte de SQDG, ce qui maintient la fonction chloroplastique et l'intégrité structurale (Martin *et al.*, 2014). Popko *et al.* (2016) ont souligné que la DGTS pourrait être la source majeure d'AG pour la formation de TAG au cours de la privation en N chez *P. tricornutum*.

Cependant, la limitation en N provoque souvent une réduction importante de la fixation de C (Turpin, 1991) qui nuit finalement à la productivité lipidique.

I.3.2 Réponses à la limitation en phosphore

La limitation en P induit une réponse adaptative progressive chez les microalgues (Abida *et al.*, 2015). Cette réponse peut être divisée en une réponse spécifique au stress et une réponse secondaire générale. Les réponses spécifiques sont fortes et directement liées à la disponibilité en P, telles que la régulation à la hausse des transporteurs à haute affinité et des enzymes impliquées dans l'absorption du DOP et le recyclage du P intracellulaire. Les études chez *E. huxleyi* ont élucidé une séquence d'événements cellulaires quand le P est limitant, débutant par la formation et l'acidification des vésicules membranaires (induction initiale du recyclage cellulaire), suivie par l'activation de PAL et le remodelage profond de la composition du plasmalemme (Shemi *et al.*, 2016). Certaines espèces sont aussi capables d'ajuster leur voie glycolytique en utilisant d'autres enzymes qui nécessitent moins de P afin de soutenir le métabolisme cellulaire (Lei et Lu, 2011; Wurch *et al.*, 2011; Duff *et al.*, 1989). Theodorou *et al.* (1991) ont souligné une augmentation de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) chez l'algue verte *Selenastrum minutum* en condition de limitation en P. Non seulement la PEPC évite l'utilisation de l'ADP qui pourrait être nécessaire pour d'autres processus essentiels (photophosphorylation), mais elle libère également le Pi requis pour continuer à exporter les triose-phosphates du chloroplaste *via* le translocateur. Des travaux antérieurs ont montré que les microalgues peuvent abaisser leur demande physiologique en P d'environ 50 % pendant la carence en phosphore (Van Mooy *et al.*, 2009). La réduction de la demande totale en P confère un avantage considérable en permettant de hiérarchiser les fonctions non substituables (Hunter *et al.*, 2018) de telle sorte que les algues puissent se développer au moins pendant deux générations (Feng *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014).

Le P est étroitement lié au métabolisme énergétique cellulaire (Falkowski et Raven, 2007). La limitation en P engendre une teneur en ATP et une charge énergétique plus faibles (Bougaran *et al.*, 2010; Duff *et al.*, 1989; Theodorou *et al.*, 1991), ainsi que certains dysfonctionnements cellulaires dus au blocage de la phosphorylation des enzymes clés. Par conséquent, la division cellulaire finit par s'arrêter. Les processus d'assimilation tels que la fixation de N (Bougaran *et al.*, 2010; Rhee, 1974) sont également diminués en raison de la concurrence pour l'utilisation de l'énergie. C'est pourquoi les réponses à la limitation en P présentent souvent une grande similitude à celles de la limitation en N, notamment en ce qui concerne le métabolisme carboné.

Contrairement aux autres limitations nutritives (N, Fe), une carence en P conduit souvent à une augmentation de la taille cellulaire (Li *et al.*, 2016; Mühlroth *et al.*, 2017; Shemi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014). L'efficacité de l'absorption du P peut être modifiée en diminuant le rapport entre la surface et le volume. Une plus grande taille de cellule peut aussi être liée à la perturbation du cycle cellulaire (Ginzberg *et al.*, 2015). Des études ont montré que la privation en P entraîne souvent un arrêt de la progression G1 à S ou de G2 à M (Li *et al.*, 2015; Parpais *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2014). Avec cet arrêt du cycle cellulaire, les cellules continuent à croître. Dans l'étude chez *T. pseudonana*, aucune activation *in vivo* de l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de la mort cellulaire programmée (PCD) n'a été déclenchée dans les cellules P-limitées au cours du temps de l'expérience. Cela suggère des mécanismes fondamentalement différents de la régulation métabolique dans des conditions limitantes en N et en P (Lin *et al.*, 2017).

I.3.2.1 Limitation en phosphore sur le métabolisme carboné

Les effets du P sur le métabolisme carboné sont souvent considérés comme secondaires (Brembu *et al.*, 2017). Bien qu'en faible proportion, le P joue cependant un rôle important sur le métabolisme carboné.

- **Limitation en phosphore sur la photosynthèse**

La photosynthèse est peu affectée en condition de limitation en P. Zhang *et al.* (2016) et Yang *et al.* (2014) ont observé respectivement une régulation à la hausse des transcrits de protéines ayant un rôle clé pour la photosynthèse chez *S. costatum* et *P. tricornutum* dans les cellules limitées en P. Au contraire, Alipanah *et al.* (2018) ont observé une diminution des niveaux de transcription de la majorité des gènes impliqués dans le transport d'électrons photosynthétiques et la photophosphorylation chez *P. tricornutum*. Feng *et al.* (2015) ont aussi remarqué une réduction des protéines pour la machinerie photosynthétique dans les mêmes échantillons que ceux étudiés par Yang *et al.* La contradiction entre les résultats de Yang *et al.* (2014) (transcriptome) et de Feng *et al.* (2015) (protéome) peut être due à la régulation négative des protéines ribosomiques et à une répression de la traduction sous carence en P (Dyhrman *et al.*, 2012). Cruz de Carvalho *et al.* (2016) ont aussi mis en évidence une surexpression des gènes impliqués dans la photosynthèse au début de la limitation en P chez *P. tricornutum* puis une régulation à la baisse au cours de l'épuisement tardif en P.

Pendant la phase « claire », les cellules qui ont davantage de membranes thylacoïdales et de pigments présentent une haute efficacité de captation de la lumière (Iwai *et al.*, 2014). Même si le transfert d'électrons peut être ralenti à cause de la limitation de production d'ATP et NADPH, les paramètres photosynthétiques en l'absence de P sont peu modifiés (Abida *et al.*, 2015; Kamalanathan *et al.*, 2015). Ceci signifie que les photosystèmes ne sont endommagés que dans une moindre mesure au cours des premiers stades de déplétion en P (Yang *et al.*, 2014). Certains de ces points seront abordés plus en détail dans le chapitre suivant.

Par ailleurs, le cycle de Calvin-Benson peut être fortement réduit en raison de l'épuisement des intermédiaires phosphorylés (Brooks, 1986; Jacob et Lawlor, 1993). Cependant, Feng *et al.* (2015) ont observé une augmentation des transcrits de la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) chez *P. tricornutum*, laissant supposer une hausse de l'assimilation du carbone ou de la photorespiration.

- **Limitation en phosphore sur l'orientation du carbone**

La synthèse des protéines est fortement inhibée lorsqu'il y a une contrainte globale sur la synthèse de l'ARN et de l'ATP (Berdalet *et al.*, 1994; Dyhrman, 2016; Wang *et al.*, 2014). En raison d'une demande réduite en chaînes carbonées dans le métabolisme primaire, davantage de C est fixé que consommé. Comme dans le cas de la limitation en N, le flux de C est plutôt orienté vers le stockage sous forme de polysaccharides et de lipides neutres (Figure I-13) ou l'excrétion par la cellule de polysaccharides appelés ECPS. Cependant, les modes de régulation ne sont pas tout à fait les mêmes selon les espèces de microalgues.

Le principal flux de C chez *N. oceanica* est en accord avec les études de limitation en N, il est observé une orientation nette depuis le cycle de Calvin via la glycolyse vers l'accumulation de AG et de TAG (Mühlroth *et al.*, 2017). En revanche, chez les diatomées, la limitation en P semble déplacer le métabolisme du C vers la gluconéogenèse (du moins cytosolique) puisque des niveaux accrus en citrate conduisent à l'inhibition de la phosphofructokinase (enzyme clé non réversible de la voie de la glycolyse) (Brembu *et al.*, 2017).

Le glucose-6-phosphate (G6P) peut être converti en UDP-glucose (UDP-Glc) par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (Daboussi *et al.*, 2014) qui augmente à la fois les transcrits et les protéines pendant la limitation en P (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Dyhrman *et al.*, 2012). L'UDP-Glc est un substrat pour la biosynthèse des polysaccharides (chrysolaminarine ou amidon), des glycolipides, ainsi que de plusieurs glucides rencontrés dans les ECPS. Chez les

diatomées, les gènes associés à la dégradation de la chrysolaminarine sont plus induits que les gènes associés à la biosynthèse de la chrysolaminarine lors de la limitation en P (Brembu *et al.*, 2017), ce qui indique un déplacement du puits de stockage. D'ailleurs, la limitation en P favorise généralement davantage la production d'ECPS que la limitation en N, bien qu'il existe des exemples contraires (Abdullahi *et al.*, 2006; Ai *et al.*, 2015; Urbani *et al.*, 2005). La production d'ECPS peut être partiellement dépendante de la dégradation de la chrysolaminarine (Underwood *et al.*, 2004).

Le G6P peut aussi entrer dans la voie oxydative des pentoses phosphates (OPP) qui est également alimentée par le ribose-5-phosphate (R5P) provenant de la dégradation des ARN notamment pendant une carence en P. La régulation à la hausse de l'OPP fournit du NADPH qui compense la faible production de NADPH au cours de la photosynthèse pendant la limitation en P.

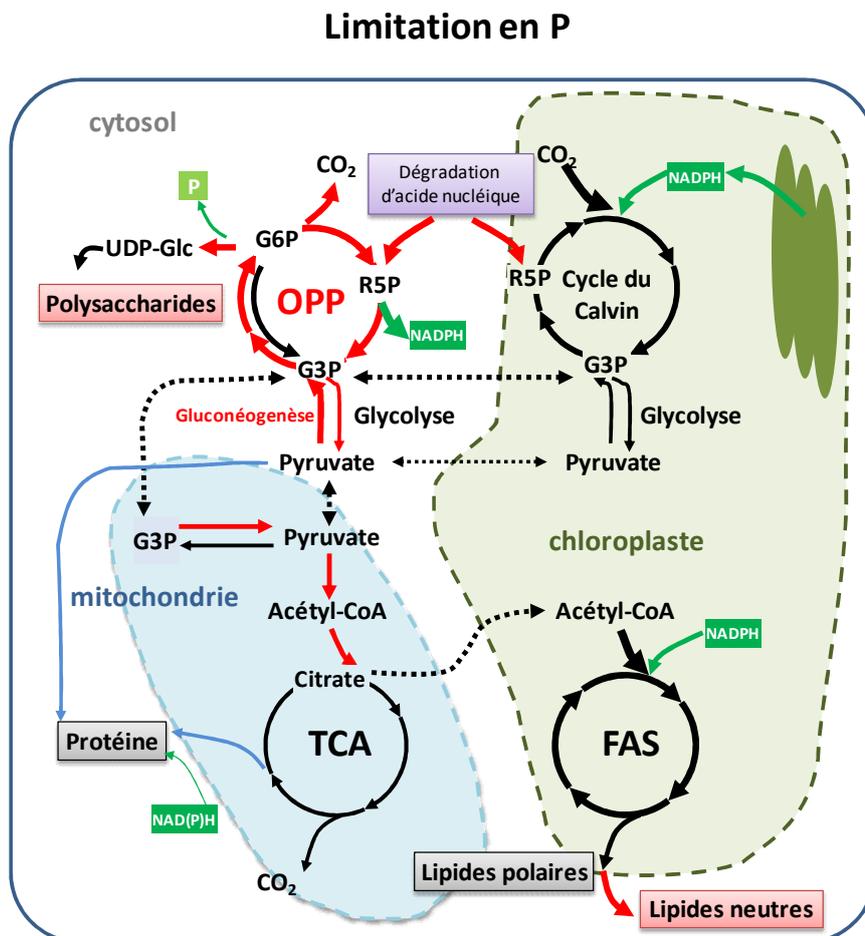


Figure I-13 : Schéma résumant l'orientation du carbone chez *P. tricornutum* cultivée dans des conditions de limitation en P. Les principaux puits de carbone fixé sont indiqués par un cadre rouge. L'épaisseur de la flèche est corrélée avec l'intensité du flux de carbone. Les flèches rouges, bleues et noires indiquent respectivement une régulation à la hausse, à la baisse et nulle des voies métaboliques. Les lignes en pointillés indiquent le transport entre les différents compartiments. D'après Brembu *et al.* (2017)

La limitation en P a été signalée comme induisant l'accumulation de lipides neutres chez quelques espèces de microalgues, toutefois, la biosynthèse des acides gras n'est pas suractivée (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Dyhrman *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2015). Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'accumulation de lipides neutres peut partiellement être stimulée par l'excès de pouvoir réducteur (NADPH) et l'acétyl-CoA. La dégradation des PL peut aussi contribuer de manière significative à l'accumulation de TAG au cours de la limitation en P (Brembu *et al.*, 2017).

Des études ont montré une grande variabilité inter-spécifique pour le bilan de la production des lipides totaux en condition de limitation en P : une augmentation de la teneur en lipides chez *C. kessleri*, *Isochrysis galbana*, *T. lutea*, *Diacronema vlkianum*, *D. lutheri*, *Pavlova viridis*, *M. subterraneus*, *Nannochloropsis gaditana*, *N. oceanica*, *P. tricornutum*, certains *Chaetoceros* sp., etc. mais une teneur réduite en lipides chez *C. gracilis*, *Picochlorum atomus* et *Tetraselmis suecica* ; tandis que les résultats pour les espèces de Cryptophyceae indiquent une stabilité de la teneur totale en lipides dans les cultures de *Rhodomonas baltica*, *Rhodomonas salina*, *Chroomonas placoides* et *Cryptomonas ovata* (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2017b; El-Sheek et Rady, 1995; Gong *et al.*, 2013; Khozin-Goldberg et Cohen, 2006; Malzahn *et al.*, 2010; Mühlroth *et al.*, 2017; Piepho *et al.*, 2010; Rasdi et Qin, 2015; Reitan *et al.*, 1994; Roopnarain *et al.*, 2014).

1.3.2.2 Limitation en phosphore et remodelage des lipides membranaires

La composition lipidique membranaire est très dynamique en réponse à l'environnement qui est variable, le remplacement de phospholipides par des lipides non phosphorés est considéré comme un phénomène omniprésent en cas de limitation en P (Sebastián *et al.*, 2016).

Ce phénomène a tout d'abord été décrit chez la bactérie non-photosynthétique *Pseudomonas diminuta* (Minnikin *et al.*, 1974), puis chez la bactérie pourpre photosynthétique *Rhodobacter sphaeroides* (Benning *et al.*, 1993). L'échelle de temps de la substitution des PL est rapide (≤ 24 h) (Martin *et al.*, 2011; Shemi *et al.*, 2016). Jouhet *et al.* (2003) ont observé une augmentation transitoire de PL dans une culture de cellules végétales lors de la limitation en P. Compte tenu de la similarité dans la composition en AG entre PL et DAG, ces auteurs ont suggéré que lors de la privation en P, le DAG pouvait provenir de PL d'une manière directe (Figure 1-14). Les produits de dégradation des PL (DAG, AG, Gro3P) sont ensuite utilisés pour synthétiser principalement les lipides membranaires non phosphorés tels que les BL et GL

pendant la croissance exponentielle puis pour la synthèse de TAG pendant la phase stationnaire (Mühlroth *et al.*, 2017).

De plus en plus de travaux montrent que la synthèse des PL n'est pas inhibée au niveau du transcriptome au cours de la limitation en P. Chez *N. oceanica*, la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des PL reste active pendant la phase stationnaire en condition de P limitant (Mühlroth *et al.*, 2017). Apparemment, le remplacement de PL par des lipides non phosphorés n'est pas un simple changement au niveau de la synthèse des lipides, mais plutôt un remaniement dans les classes de lipides. La formation de PL sous P limitant ne sera pas utilisée dans la construction des lipides membranaires mais contribuera directement aux mécanismes de remaniement des lipides par une dégradation active des PL et un remplacement par des lipides non phosphorés.

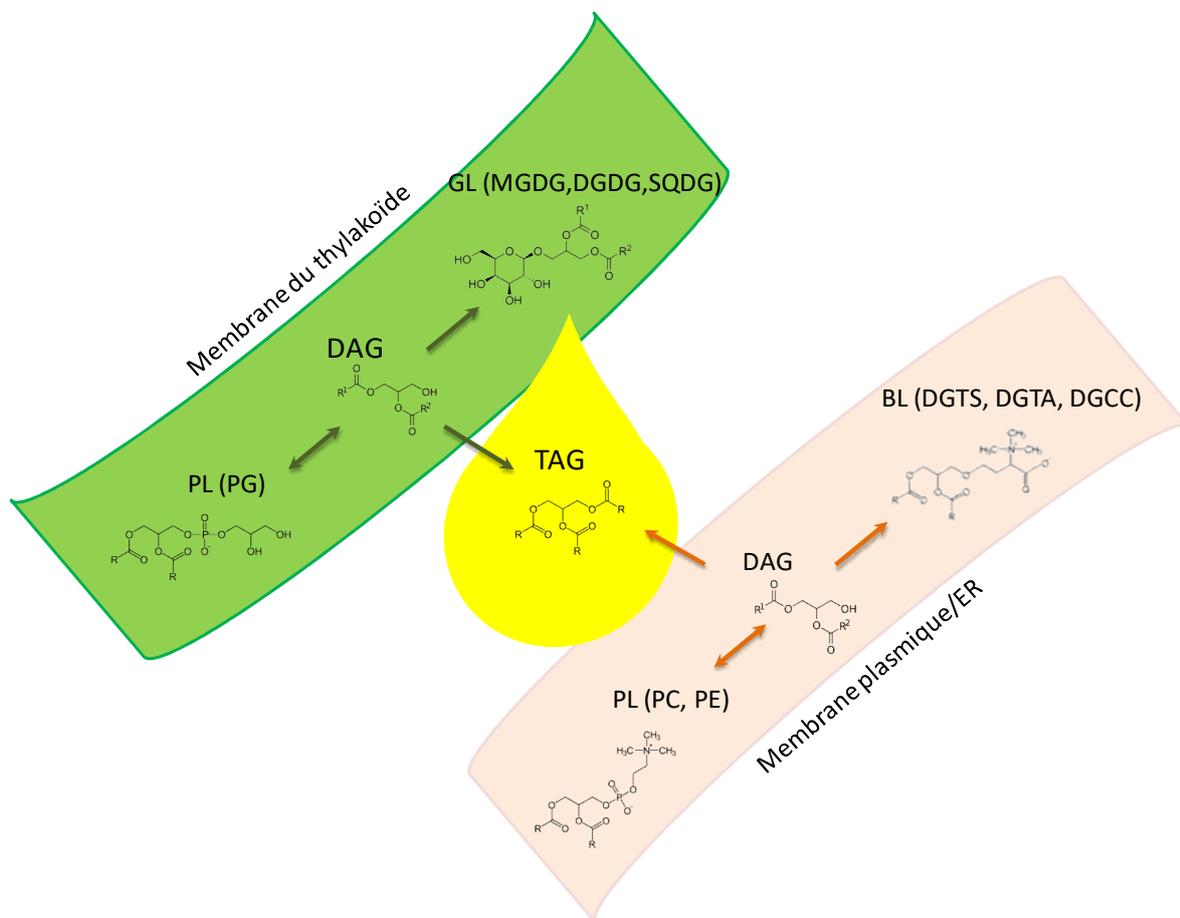


Figure I-14 : Représentation schématique du remodelage des lipides chez les microalgues en condition de limitation en P. D'après Li-Beisson *et al.* (2015)

• Dégradation des phospholipides

Les PL constituent une source importante de P intracellulaire. Le P libéré suite à la dégradation des PL peut couvrir les besoins de biosynthèse de l'ADN et maintenir la croissance au cours des premiers stades de carence en P (Hunter *et al.*, 2018).

Les phospholipases sont essentielles au remodelage continu des membranes cellulaires. Elles constituent un groupe très diversifié d'enzymes dont l'activité commune consiste en l'hydrolyse catalytique des phospholipides (Figure I-15). On distingue selon le site d'action de l'enzyme :

- les phospholipases A (PLA) qui hydrolysent les acides gras en position sn-1 (PLA1) ou sn-2 (PLA2) du glycérol. Elles libèrent un AG et un lysophospholipide.
- les phospholipases B (PLB) qui hydrolysent les 2 acides gras en position sn-1 et sn-2 du glycérol.
- la phospholipase C (PLC), phosphodiesterase responsable de l'hydrolyse de la liaison glycérophosphate qui relie la tête polaire au troisième C du glycérol. Les produits obtenus sont le diacylglycérol (DAG) et un groupement phosphorylé hydrosoluble.
- la phospholipase D (PLD), phosphodiesterase qui catalyse l'hydrolyse du groupement polaire, produisant le PA (Haas et Stanley, 2007; Pelley, 2012).

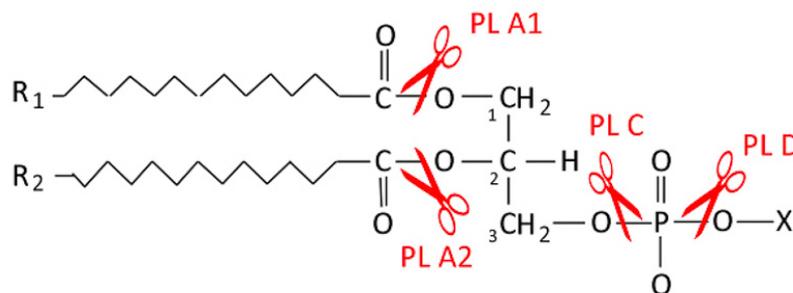


Figure I-15 : Représentation schématique des liaisons d'un phospholipide hydrolysées par les différentes classes de phospholipases. D'après Haas et Stanley (2007)

Chez les microalgues, plusieurs gènes putatifs de PLC et PLD montrent une régulation à la hausse au niveau du transcriptome pendant la limitation en P (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Dyrman *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016), indiquant leur contribution à la dégradation des PL. Parallèlement, la voie PLA et glycérophosphoryldiester phosphodiesterase (GDPD), entraînant la libération d'acyl-CoA et de Gro3P, joue aussi un rôle important (Mühlroth *et al.*, 2017). Les acyl-

CoA, Gro3P, AG et DAG libérés lors de la dégradation des PL servent de précurseurs pour la synthèse de lipides non phosphorés. La régulation de ces gènes semble être une réponse spécifique à la carence en P (Mühlroth *et al.*, 2017).

Ainsi, Hunter *et al.* (2018) ont observé une dégradation préférentielle des PL saturés et / ou une synthèse continue de PL fortement insaturés chez *N. oceanica* au début d'une limitation en P. Ce processus pourrait réguler la fluidité membranaire dans le contexte d'un changement majeur de la composition membranaire. Néanmoins, cette augmentation de l'insaturation est régulée à la baisse lorsque le P est épuisé.

Pendant la phase stationnaire, les enzymes permettant de libération des acyles et d'échange de tête polaire ont montré une activité accrue, ce qui renforce l'hypothèse concernant les mécanismes de remaniement des lipides dans les cellules limitées en P. Les gènes codant PDAT sont spécifiquement régulés à la hausse (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Mühlroth *et al.*, 2017), soutenant davantage le rôle du recyclage des PL membranaires dans la voie de synthèse des TAG pendant l'épuisement du P.

- **Substitution par les glycolipides**

La substitution de lipides a été étudiée plus précisément chez les plantes et les algues vertes, où le remplacement de PG par SQDG est observé dans les chloroplastes, ce qui permet le maintien d'un environnement en lipides anioniques au niveau des photosystèmes dans les thylacoïdes (Lu *et al.*, 2013; Maat *et al.*, 2016; Nakamura, 2013).

Les gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de SQDG sont induits sous la limitation en P chez *P. tricornutum*, *S. costatum*, *T. weissflogii*, *T. pseudonana*, *N. oceanica*, etc. (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Dyrman *et al.*, 2012; Mühlroth *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Le promoteur SQD2 de *C. reinhardtii* a également été utilisé pour améliorer la synthèse de TAG dans la souche *Nannochloropsis* NIES-2145 transformée pour résister au P limitant (Iwai *et al.*, 2015). Cependant, la limitation en P n'a pas d'effet sur l'expression du gène SQD2 chez *Chaetoceros affinis* (Shih *et al.*, 2015).

Le rapport SQDG : PG est souvent précisément régulé en réponse à la disponibilité en P, et en relation avec l'homéostasie du P cellulaire (Boudière *et al.*, 2014). Dans l'étude de Cañavate *et al.* (2017a), ce rapport est significativement augmenté chez la plupart des microalgues marines étudiées : *C. placoidea*, *C. gracilis*, *N. gaditana*, *T. suecica* et *P. atomus* en réponse à la limitation en P. En revanche, ce rapport est inchangé chez *I. galbana*, et varie très

peu chez *D. vlkianum*, *R. baltica* et *P. tricornutum*, ce qui est dû chez ces espèces à l'abaissement simultané des SQDG et PG au cours de la privation en P. Cette augmentation du rapport SQDG : PG était cependant principalement attribuable à la stabilité du contenu en SQDG (rapporté à la biomasse sèche) et à une diminution des PG en condition de carence en P chez les espèces étudiées. Toutefois, une augmentation nette de SQDG chez *P. atomus*, qui est l'espèce la plus proche des plantes terrestres, a été mesurée. Des résultats similaires ont également été obtenus dans d'autres études et chez d'autres espèces de microalgues (Hunter *et al.*, 2018), suggérant que le remplacement de PG par SQDG ne devrait pas être considéré comme un processus important de remodelage des lipides impliqué dans la réponse à la pénurie de P chez les microalgues (Cañavate *et al.*, 2017b).

Par ailleurs, une augmentation du DGDG suite à une privation en P est une réponse lipidique commune chez les plantes terrestres. Le DGDG peut aussi quitter les chloroplastes pour compenser la perte de PL dans différents compartiments subcellulaires, tels que la membrane plasmique, le tonoplaste et les mitochondries (Boudière *et al.*, 2014; Li-Beisson *et al.*, 2010). Le DGDG peut remplacer jusqu'à 70 % des PC de la membrane plasmique dans l'avoine (*Avena sativa* L.) cultivée sous limitation sévère en P (Andersson *et al.*, 2003). Néanmoins, pour la plupart des microalgues issues d'endosymbioses secondaires, il n'y a pas de preuve d'une exportation de DGDG vers des membranes extraplastidiales dans les cellules exposées à une limitation en P. L'augmentation du DGDG a été décrite dans les espèces de la lignée verte (Puja Kumari *et al.*, 2014; Maat *et al.*, 2016). Dans l'étude de Cañavate *et al.* (2017a), parmi les 9 espèces étudiées, *P. atomus* était la seule espèce dans laquelle la teneur en DGDG (rapporté à la biomasse sèche) ne diminuait pas en cas de privation de P. Mühlroth *et al.* (2017) ont observé qu'une augmentation nette des teneurs en SQDG et DGDG (par cellule) s'accompagnait d'une augmentation de la taille des cellules pendant la phase stationnaire chez *N. oceanica* ; le fait que le volume cellulaire augmente nécessiterait par conséquent une synthèse accrue de lipides membranaires plastidiaux.

- **Substitution par les bêtaïne lipides**

Les PL et les BL sont essentiellement des lipides polaires structuraux. En raison de leur similarité structurale, les BL sont capables de se substituer aux PL en cas de carence en P. Ce phénomène a déjà été démontré chez les bactéries (Benning *et al.*, 1995; Sebastián *et al.*, 2016; Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010), les champignons (Riekhof *et al.*, 2014; Senik *et al.*, 2015), ainsi que des microalgues (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2017a; Hunter *et al.*, 2018; Khozin-

Goldberg et Cohen, 2006; Lu *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2011; Mühlroth *et al.*, 2017; Shemi *et al.*, 2016; Van Mooy *et al.*, 2009).

Les gènes codant pour les enzymes de biosynthèse des BL sont induits sous limitation en P. Chez *N. oceanica*, le gène BTA putatif a montré une augmentation constante et significative de son taux d'expression dans les cellules limitées en P (Mühlroth *et al.*, 2017). Un gène codant pour une enzyme de synthèse du DGTA putative a été identifié chez *P. tricornutum*; son expression est fortement induite par la limitation en P (Cruz de Carvalho *et al.*, 2016). La synthèse de DGCC n'a pas encore été caractérisée, tandis que les transcrits de SAM méthyltransférases, qui sont considérés comme étant importants dans la biosynthèse des bêtaine lipides, sont tous régulés positivement par la déficience en P chez *T. pseudonana* (Dyhrman *et al.*, 2012).

Le rapport BL : PL augmente significativement en condition de carence en P puis revient à des valeurs équivalentes à celles obtenues dans des conditions d'excès de P. Dans l'étude de Cañavate *et al.* (2017a), l'augmentation relative de BL attribuable à la privation de P a été observée chez *P. atomus*, *T. suecica*, *N. gaditana* et *P. tricornutum*. La DGTA compensait la diminution des PL chez *P. tricornutum* et *T. suecica*, alors que les PL étaient substitués par la DGTS chez *P. atomus*. Une situation similaire a aussi été observée avec la DGCC chez *E. huxleyi* (Shemi *et al.*, 2016; Van Mooy *et al.*, 2009). Cependant, les autres espèces dans cette étude présentaient une diminution relative des BL lorsqu'elles étaient en condition de carence en P, indiquant que les pools de BL respectifs étaient réduits (Cañavate *et al.*, 2017b). Le remplacement des PL par des BL dans des environnements appauvris en P ne devrait pas être considéré comme un phénomène général chez les microalgues marines (Cañavate *et al.*, 2017b).

En comparant les classes lipidiques et les profils d'absorption du P, les espèces de microalgues peuvent être réparties en trois groupes différents (Cañavate *et al.*, 2017a) (Figure 1-16) :

A) Les espèces *I. galbana* et *D. vlkianum* possèdent des PL constitutifs extrêmement bas et la teneur en BL est élevée. Les cellules nécessitent moins de P et sont plus adaptées à des environnements pauvres en P. Elles possèdent le quota minimum (rapporté à la masse sèche) en P ($Q_{P,0}$) le plus faible lors d'une carence en P, tandis que leur teneur en BL n'augmente pas. Etant donné leur niveau en PL extrêmement bas, les PL ne participent pas au stockage du P, et les processus d'absorption ne sont pas directement liés au métabolisme des lipides. La

stimulation de l'absorption de P due à la privation est donc plus compatible avec leurs demandes physiologiques. La plupart des Haptophytes font partie de ce groupe.

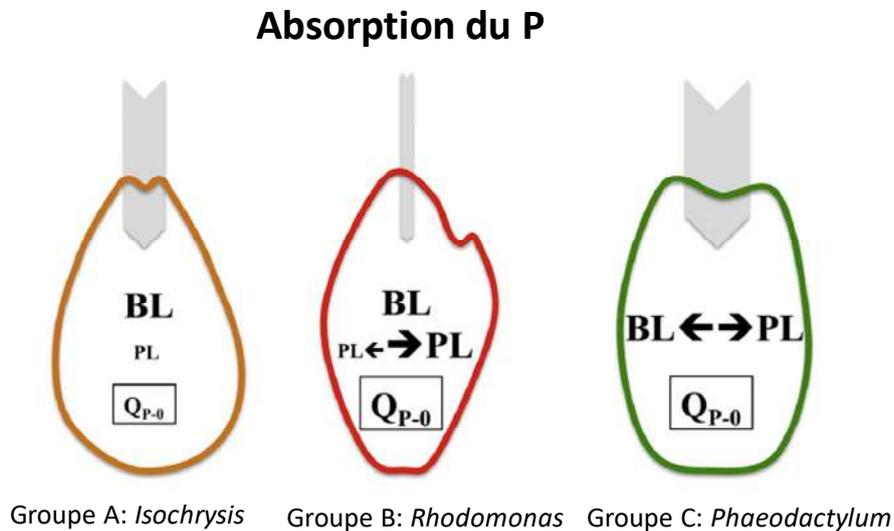


Figure I-16 : Représentation schématique des microalgues réparties en 3 groupes en fonction du remaniement des classes lipidiques entre bétaine lipides (BL) et phospholipides (PL), l'absorption du P et le quota de P cellulaire minimal (Q_{P-0}). L'amplitude de l'absorption du P est indiquée par la largeur de la flèche et les valeurs pour BL, PL et Q_{P-0} sont indiquées par des symboles agrandis. Les flèches horizontales représentent le changement dynamique des lipides. D'après Cañavate *et al.* (2017a)

B) Les espèces *R. baltica*, *C. placoides* et *C. gracilis* contiennent à la fois des PL et des BL, la privation de P peut diminuer leur teneur en PL mais n'augmente pas la teneur en BL. Elles présentent une faible absorption de P et un Q_{P-0} élevé en cas de privation en P. Le maintien d'un Q_P basal élevé combiné à une teneur significative en BL constitutifs pourrait représenter une stratégie alternative pour faire face à la limitation du P.

C) Les espèces *P. tricornutum*, *N. gaditana*, *T. suecica* et *P. atomus* renferment à la fois des PL et des BL, la privation de P diminue leur teneur en PL et augmente de façon concomitante les BL. Elles disposent en outre d'une forte absorption de P. Une dynamique plus élevée entre BL et PL pourrait être liée à la compétitivité accrue de ces microalgues vis à vis du P. Ces caractéristiques de forte absorption et de capacité élevée de substitution PL-BL suggèrent des performances physiologiques plus élevées de ce groupe en présence de PL, plutôt que de BL.



Ces différentes études indiquent une variabilité interspécifique élevée chez les microalgues en réponse à une limitation nutritive en P ou en N. Nous pouvons notamment remarquer que les réponses physiologiques (par exemple, la photosynthèse) des microalgues marines, la réorientation métabolique, et surtout le remodelage des lipides polaires peuvent constituer des mécanismes d'acclimatation face à une limitation en P ou en N.

PARTIE 2

Matériels et Méthodes

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1 Matériel biologique

Les 3 microalgues choisies pour l'étude sont *Phaeodactylum tricornutum* souche Pt4 (UTEX 646), *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) et *Diacronema lutheri* (CCAP 931/6).

II.1.1 *Phaeodactylum tricornutum*

Taxonomie :

Règne : Chromistes
 Phylum : Heterokontophytes
 Classe : Bacillariophyceae
 Ordre : Naviculales
 Famille : Phaeodactylaceae

P. tricornutum est une diatomée pennée marine. Elle est ubiquiste et se trouve notamment dans les zones côtières. Contrairement à d'autres diatomées, *P. tricornutum* est la seule à présenter trois morphotypes différents : fusiforme, ovale et triradié (Lewin *et al.*, 1958), avec une ultrastructure cellulaire similaire (Borowitzka et Volcani, 1978). Depuis plusieurs décennies, *P. tricornutum* a été isolée de différentes zones géographiques, et 10 souches axéniques (Pt1-Pt10) ont été caractérisées génétiquement par De Martino *et al.* (2007) qui ont déterminé quatre génotypes A, B, C et D.

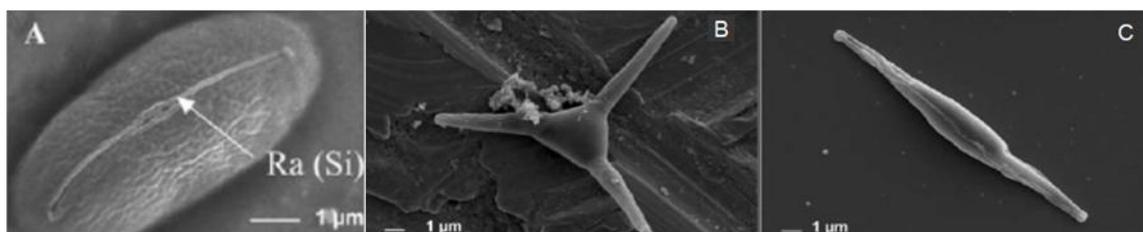


Figure II-1 : Micrographies de *Phaeodactylum tricornutum*.

Micrographies électroniques à balayage de morphotypes : (A) cellule ovale; (B) cellule triradiée (souche atlantique); (C) cellule fusiforme (souche Blackpool Pt1 8,6). Ra = raphé, Si = structures siliceuses. D'après Tesson *et al.* (2009)

La souche Pt4 (UTEX 646) est la seule souche avec le génotype B, originaire de l'île de Segelskäer (Finlande) dans la mer Baltique. Elle est de couleur brun-dorée ou verte, avec une

forme majoritairement fusiforme (95-100 % des individus), mesurant $2.5-3.6 \times 19-24 \mu\text{m}$ (De Martino *et al.*, 2007).

P. tricornutum est utilisée depuis longtemps en laboratoire et est devenue un modèle de diatomée de choix tant au niveau physiologique, biochimique, que moléculaire. Les avantages de cette espèce, présentés ci-dessous, sont particulièrement intéressants :

- Le génome de *P. tricornutum* a été séquencé et mis en ligne (Bowler *et al.*, 2008).
- *P. tricornutum* peut croître en absence de silice puisque la formation du frustule est facultative (Brzezinski *et al.*, 1990).
- *P. tricornutum* se multiplie rapidement, et seulement de façon végétative dans les cultures clonales au laboratoire.
- *P. tricornutum* est une microalgue économiquement intéressante puisque la quantité de TAG qu'elle peut produire est très élevée lorsque les conditions sont particulièrement défavorables (Breuer *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2008).
- *P. tricornutum* produit des fortes teneurs en AGPI de la série des oméga-3, notamment en EPA (Hamilton *et al.*, 2014).
- *P. tricornutum* possède des PL mais une très faible quantité de BL (DGTA, DGTS) dans sa membrane plasmique en condition habituelle de culture (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2016).

II.1.2 *Tisochrysis lutea*

Taxonomie :

Règne : Chromistes
Phylum : Haptophytes
Classe : Prymnesiophyceae
Ordre : Isochrysidales
Famille : Isochrysidaceae

T. lutea, anciennement dénommée *Isochrysis affinis galbana*, est une microalgue flagellée, de couleur brun doré avec une forme ovoïde, mesurant $4.5-7.5 \times 3-6 \mu\text{m}$ et munie d'un plaste unique. Elle est dotée de deux flagelles apicaux d'environ $7 \mu\text{m}$ de longueur grâce auxquels elle se déplace selon un mouvement hélicoïdal (Bendif *et al.*, 2013).

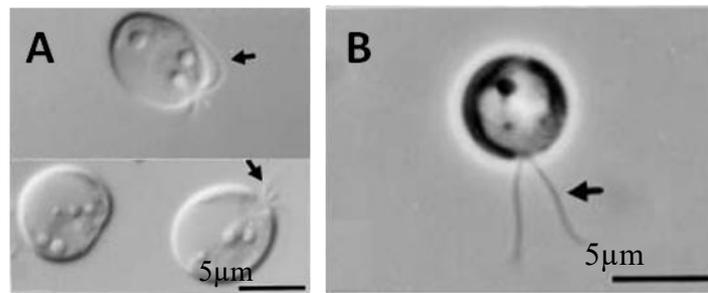


Figure II-2 : Micrographies de *Tisochrysis lutea*.

(A) Photographie au microscope à contraste interférentiel ; (B) photographie au microscope à contraste de phase. Les flèches montrent deux flagelles à l'extrémité d'une cellule. D'après Liu et Lin (2001)

T. lutea est devenue un nouveau modèle dans les études sur les Haptophytes, notamment après l'obtention d'une souche hyperproductrice de lipides neutres (Bougaran *et al.*, 2012). *T. lutea* (CCAP 927/14) est une souche sauvage, originaire de Tahiti (Polynésie française), obtenue auprès du Centre de Culture des Algues et des Protozoaires (Oban, Ecosse).

Les nombreux avantages de cette espèce sont présentés ci-dessous :

- Le génome séquencé de *T. lutea* est disponible (Carrier *et al.*, 2018).
- *T. lutea* se multiplie rapidement et est facile à cultiver au laboratoire (J. Marchetti *et al.*, 2012).
- *T. lutea* est l'une des espèces les plus utilisées en aquaculture pour nourrir les larves de poissons, mollusques bivalves et crustacés (Brown *et al.*, 1997; Coutteau et Sorgeloos, 1992).
- *T. lutea* présente une forte teneur en AGPI de la série des oméga-3, notamment en DHA (Liu et Lin, 2001).
- *T. lutea* a la particularité de contenir des BL mais une très faible quantité de PL dans la membrane plasmique (Kato *et al.*, 1996).

II.1.3 *Diacronema lutheri*

Taxonomie :

Règne :	Chromistes
Phylum :	Haptophytes
Classe :	Pavlovophyceae
Ordre :	Pavloales
Famille :	Pavlovaceae

D. lutheri, anciennement connue sous le nom de *Pavlova lutheri*, est une microalgue mobile flagellée, vert-jaunâtre, de forme ovoïde, mesurant 4 à 6 µm de diamètre et munie d'un plaste unique. Elle est dotée de deux flagelles apicaux de longueurs différentes (Bendif *et al.*, 2011).

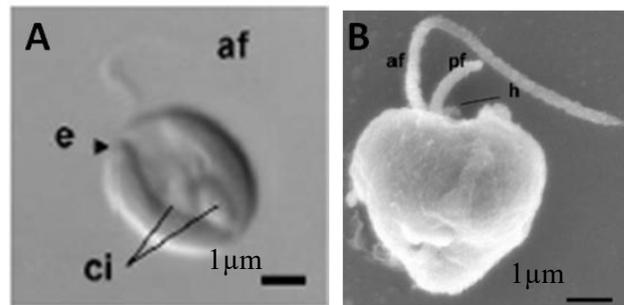


Figure II-3 : Micrographies de *Diacronema lutheri*.

(A) Photographie au microscope à contraste interférentiel ; (B) micrographie électronique à balayage. Les flèches montrent deux flagelles à une extrémité d'une cellule. af = flagelle antérieur, pf = flagelle postérieur, ci = inclusion cristalline, e = œil, h = haptomena. D'après Bendif *et al.* (2011)

D. lutheri (CCAP 931/6), originaire du Firth of Clyde (Ecosse) et obtenue auprès du Centre de Culture des Algues et des Protozoaires (Oban, Ecosse), a été utilisée dans cette étude. *D. lutheri* est capable de produire une quantité importante d'AGPI de la série des oméga-3, notamment de DHA et d'EPA, elle est de ce fait largement utilisée comme matière première en aquaculture (Meireles *et al.*, 2003; Ponis *et al.*, 2008). *D. lutheri* ne contient que des BL (DGCC et DGTA) dans sa membrane plasmique (Eichenberger et Gribi, 1997).

II.1.4 Traitement axénique

Avant de commencer les expérimentations, les cultures de microalgues ont été traitées par un mélange antibiotique et antifongique (pénicilline G à 10000 U mL⁻¹, streptomycine à 10 mg mL⁻¹ et amphotéricine B à 25 µg mL⁻¹) à raison de 0,5 à 1 % (v : v) pendant 4-5 jours, ce traitement a été appliqué au moins 3 fois consécutives. L'axénie des cultures a été vérifiée par l'absence de bactéries et de champignons 4-5 jours après l'inoculation des cellules en culture sur boîtes de Pétri contenant des milieux qui sont favorables à leur croissance : LB, FAG et FG (Annexe 1).

II.2 Conditions de culture

II.2.1 Milieux de culture

Selon l'objectif assigné à chaque expérience, trois milieux de culture ont été mis en place en modifiant les concentrations relatives en N (NO_3^-) et P (PO_4^{3-}) contenues dans la solution de Walne (Walne, 1966) ajoutée à l'eau de mer naturelle. L'eau de mer naturelle récoltée au large de Saint-Malo (France) a été filtrée et autoclavée (20 min à 121 °C) avant d'être utilisée. La solution de Walne modifiée ou non a été ajoutée stérilement.

Les trois milieux de culture utilisés sont les suivants (Annexe 2) :

- La condition témoin (notée «NP») correspondant à une culture dans de l'eau de mer enrichie avec la solution de Walne dont les concentrations en NO_3^- et PO_4^{3-} sont $1176 \mu\text{mol N L}^{-1}$ et $128 \mu\text{mol P L}^{-1}$, respectivement (rapport N : P = 9,18).
- La condition limitante en P (notée «P-») a pour rapport N : P = 125, concentrations en NO_3^- et PO_4^{3-} de $500 \mu\text{mol N L}^{-1}$ et $4 \mu\text{mol P L}^{-1}$, respectivement.
- La condition limitante en N (notée «N-»), a pour rapport N : P = 1 correspondant aux concentrations en NO_3^- et PO_4^{3-} de $125 \mu\text{mol N L}^{-1}$ et $125 \mu\text{mol P L}^{-1}$, respectivement.

II.2.2 Conditions expérimentales

Lors des expérimentations, les microalgues ont été cultivées en « batch ». La température et l'éclairage ont été ajustés selon des études antérieures sur les espèces retenues (Bougaran, 2014; Guinéneuf, 2008; Heydarizadeh, 2015; Marchetti *et al.*, 2013) (Tableau II-1):

Tableau II-1 : Conditions de culture pour chacune des espèces étudiées.

Espèce	Température (°C)	Eclairage continu ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>P. tricornutum</i>	22 ± 2	300
<i>T. lutea</i>	27 ± 2	300
<i>D. lutheri</i>	16 ± 2	120

L'éclairage continu est fourni par des tubes fluorescents Osram 54W de type lumière du jour. L'éclairage est mesuré à l'aide d'un quantum-mètre (LI-COR LI-250A) équipé d'une sonde Walz US-SQS 4 π . Le mélange continu de la culture est assuré par un bullage d'air

humide purifié par passage au travers d'un filtre stérile de 0,20 µm de vide de maille (Sartorius PTFE) positionné au fond du bioréacteur (Figure II-4), ainsi que par un agitateur magnétique.

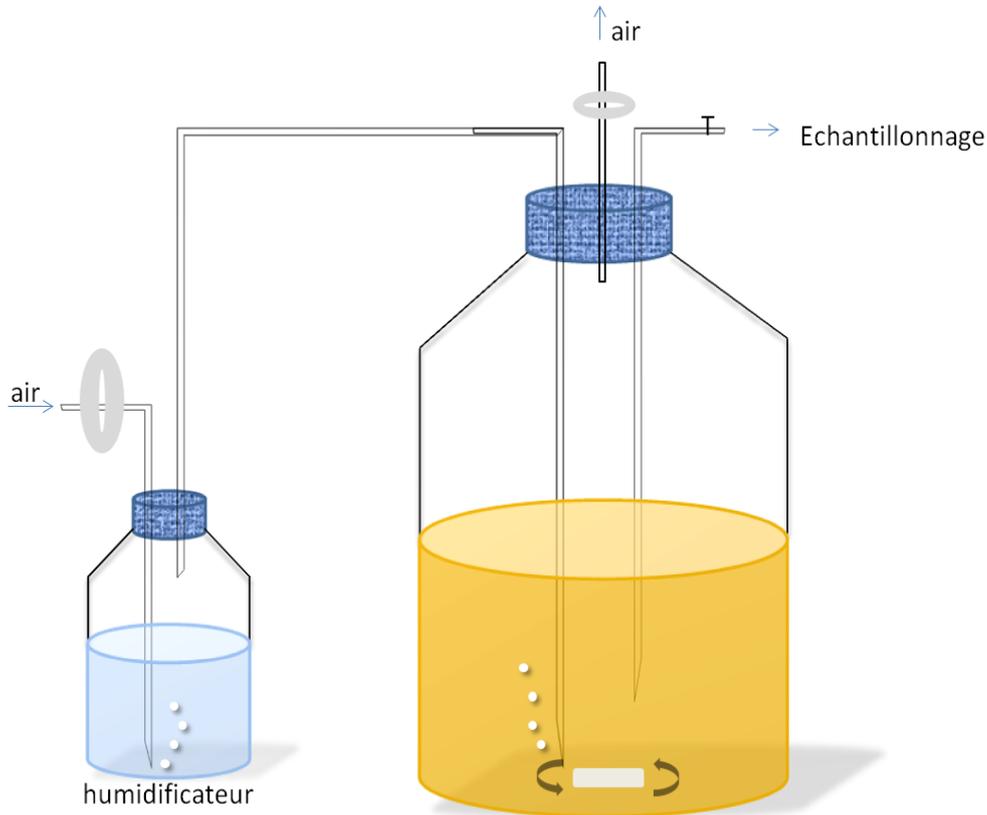


Figure II-4 : Schéma du bioréacteur

Plusieurs précautions sont prises lors de la préparation des inocula. Les microalgues ont été pré-cultivées dans l'eau de mer enrichie en Walne, avec une densité cellulaire initiale d'environ 10^5 cellules mL^{-1} jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Puis les cellules ont été transférées dans de l'eau de mer naturelle et acclimatées pendant 2 jours (pour *P. tricornutum* et *T. lutea*) ou 3 jours (pour *D. lutheri*) jusqu'au début de la phase stationnaire, afin de baisser les quotas cellulaires en P et N, et de minimiser l'apport de l'élément limitant aux cultures ultérieures.

Ensuite, les microalgues ont été inoculées en condition axénique dans un bioréacteur de 2 L avec un volume initial de 1,5 L de milieu de culture, à une densité cellulaire initiale d'environ 10^5 cellules mL^{-1} . Chacune des conditions de culture a été réalisée au moins trois fois de façon indépendante.

II.3 Suivi des cultures

Des prélèvements réguliers des microalgues en culture ont été réalisés pendant une durée totale de 9 jours pour *P. tricornutum* et *T. lutea* et 15 jours pour *D. lutheri* afin de mesurer l'évolution de la densité cellulaire et la concentration des éléments P et N dans les milieux de culture.

II.3.1 Détermination de la densité cellulaire et du taux de croissance

Le dénombrement cellulaire a été réalisé au microscope optique (ZEISS, objectif 40) grâce à un hénatimètre de type «Neubauer ». En ce qui concerne *T. lutea* et *D. lutheri* qui sont mobiles, le dénombrement a nécessité l'ajout d'une goutte de lugol pour les immobiliser.

Le taux de croissance spécifique (μ) a été calculé selon l'équation :

$$\mu(j^{-1}) = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1}$$

Où N_2 et N_1 sont les densités cellulaires aux temps t_2 et t_1 , respectivement.

La densité cellulaire maximale a été estimée selon les modèles de croissance : Gompertz et Richards (Zwietering *et al.*, 1990) à l'aide du logiciel OriginPro (OriginLab).

II.3.2 Détermination du volume cellulaire

Le volume cellulaire a été évalué à l'aide du logiciel ZEN avec des images prises sous microscope optique (ZEISS, objectif 100).

Le volume cellulaire de *P. tricornutum* a été estimé selon le modèle géométrique « semi-parallépipède » à l'aide de l'équation (Olenina *et al.*, 2006) :

$$V(\mu\text{m}^3) = \frac{ab^2}{2}$$

Où a =longueur, b = largeur.

Le volume cellulaire de *T. lutea* et *D. lutheri*, a été estimé d'après la forme sphérique utilisant l'équation suivante (Sun et Liu, 2003) :

$$V(\mu\text{m}^3) = \frac{\pi d^3}{6}$$

Où d =diamètre.

II.3.3 Dosage des éléments résiduels dans le milieu

Un volume de 15 mL de milieu de culture a été passé sur filtre de 1,2 µm de vide de maille (Whatman, GF/C). Le filtrat a été traité par l'ajout de 300 µL HCl 1N et ensuite conservé à -20 °C jusqu'à analyse.

Le dosage spectrophotométrique de N sous forme d'ions NO_3^- a été effectué par mesure de l'absorbance à 220 nm (Ultrospec 2100 pro) avec une correction à 275 nm pour minimiser l'influence de la matière organique. La valeur de $(\text{DO}_{220\text{nm}} - 2\text{DO}_{275\text{nm}})$ est proportionnelle à la quantité de NO_3^- . L'eau ultra-pure a été utilisée comme référence (American Public Health Association, 1992).

Le dosage de P a été effectué par mesure de l'absorbance à 827 nm (xMark Bio-Rad) suite à la formation d'un complexe bleu résultant de la réaction entre le P et du molybdate d'ammonium en présence d'acide ascorbique. Le mélange réactionnel comprend : 60 µL de molybdate d'ammonium 0,42 % dans H_2SO_4 1N, 10 µL d'acide ascorbique 10 % et 100 µL du milieu de culture filtré. Pour obtenir une coloration stable, une incubation pendant 1 nuit à température ambiante est nécessaire. L'eau ultra-pure a été utilisée comme référence (Murphy et Riley, 1958).

II.3.4 Dosage des quotas en C, N et P cellulaires

Les microalgues (environ 30×10^6 cellules) ont été récoltées par filtration (Whatman GF/C). Le filtre a été rincé 2 fois avec 10 mL de NaCl 1032 mOsm et séché à l'étuve à 70 °C pendant 1 nuit, enveloppé dans une feuille d'aluminium et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse, il a été à nouveau séché après la décongélation. L'ensemble du matériel en contact avec le filtre a été prétraité par HCl à 10 % et abondamment rincé par l'eau désionisée (18,2 mΩ) avant utilisation.

Les dosages de C et N intracellulaires ont été réalisés à l'aide d'un analyseur élémentaire Flash 2000 NC Soil (Thermo Fisher Scientific), géré par le logiciel Eager 300 (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons ont été oxydés et réduits en produits sous forme de CO_2 et N_2 par différents catalyseurs sous courant d'hélium et séparés par chromatographie en phase gazeuse, puis détectés par un détecteur de conductivité thermique qui donne un signal proportionnel à la concentration de chacun des éléments (C et N).

Le P intracellulaire a été dosé par la méthode d'oxydation humide (Pujo-Pay et Raimbault, 1994). Le réactif a été préparé en dissolvant 6 g de peroxodisulfate de potassium et 3 g d'acide borique dans 28 mL de solution de soude (1,5 M) à 45 °C, puis ce mélange a été complété à 100 mL avec de l'eau désionisée (18,2 mΩ), et stocké à l'obscurité. Le filtre portant les cellules a été émis dans un flacon en Teflon, rempli avec 40 mL d'eau désionisée (18,2 mΩ) et 5 mL de réactif. L'oxydation humide a été réalisée par autoclavage (30 min à 121 °C), pendant laquelle le P particulaire a été minéralisé sous forme d'ions PO_4^{3-} . Le dosage de PO_4^{3-} a été réalisé à l'aide de l'autoanalyseur AA3 (SEAL Analytical) associé au logiciel AACE 6.07, reposant sur la réaction avec le molybdate, la DO du complexe phosphomolybdique a été mesurée à 820 nm.

II.4 Activité photosynthétique

II.4.1 Extraction et estimation de la teneur en pigments

Un échantillon de culture de volume précis, renfermant environ 30×10^6 cellules, a été collecté tous les jours puis centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Le surnageant a été éliminé et le culot contenant la biomasse a été immergé dans de l'acétone 100 % (LABOSI analyse pur) pré-refroidie et bien homogénéisée par broyage dans la glace. L'ensemble a été placé à l'obscurité à 4 °C pendant au moins 4 h, puis centrifugé à 16100 g (Eppendorf Centrifuge 5415 R) pour éliminer les débris cellulaires. L'acétone pure a été utilisée comme référence dans les mesures spectrophotométriques (Perkin Elmer Lambda-25). Les spectres d'absorbance du surnageant ont été enregistrés entre 400 nm et 800 nm. Les absorbances aux longueurs d'onde 473, 630, 663 et 750 nm ont été mesurées sur le spectre et utilisées dans les équations ci-dessous afin de calculer la concentration en Chl *a* et Chl *c* (Jeffrey *et al.*, 1997).

$$\text{Chl } a \text{ (mg/L)} = \frac{[11,77(\text{DO}_{663\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}}) - 0,32(\text{DO}_{630\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}})] v}{l \times V}$$

$$\text{Chl } c \text{ (mg/L)} = \frac{[26,27(\text{DO}_{630\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}}) - 3,52(\text{DO}_{663\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}})] v}{l \times V}$$

Avec v = volume d'extrait acétonique

V = volume de culture initial

l = trajet optique de la cuve (1 cm).

La concentration en fucoxanthine a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Fucoxanthine (mg/L)} = \frac{[1000(\text{DO}_{473\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}}) - 8,08 \times \text{Chla} \times l - 48,64 \times \text{Chlc} \times l]v}{183,4 \times l \times V}$$

Tous les résultats ont été rapportés à l'unité de masse en C.

II.4.2 Mesure de l'intensité photosynthétique et de la respiration

L'émission ou la consommation de dioxygène (O_2) a été mesurée à l'aide d'un oxymètre à fibre-optique (Pyroscience FireSting O_2), celui-ci étant inséré dans une cellule de mesure munie d'un agitateur magnétique. La concentration en O_2 dissous est gérée par le logiciel «Pyro Oxygen Logger». La surface du capteur comprend un indicateur «Redflash» qui est excité par la lumière rouge et émet dans le proche infrarouge. Le principe de la mesure est basé sur l'extinction de la luminescence causée par la collision entre les molécules d' O_2 et l'indicateur de Redflash.

L'oxymètre a été étalonné avec de l'eau distillée dégazée par un flux d'azote (0 % O_2) et par bullage d'air (100 % O_2) avant utilisation. Pour chaque échantillon, la salinité et la température de mesure ont été précisées. Les mesures ont été effectuées avec un volume de 1,5 mL de culture dans lequel ont été ajoutés 30 μL de NaHCO_3 (0,2 M) afin que le CO_2 ne soit pas un facteur limitant de la photosynthèse. Avant la mesure, la teneur en O_2 a été abaissée d'environ 30 % à l'aide d'un flux d'azote gazeux. Les mesures ont été réalisées sous un éclairage de 300 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour *P. tricornutum* et *T. lutea*, ou 120 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour *D. lutheri* (Intralux 4000-1) et à la même température de culture grâce à la circulation d'eau thermostatée dans la double paroi de la cellule de mesure.

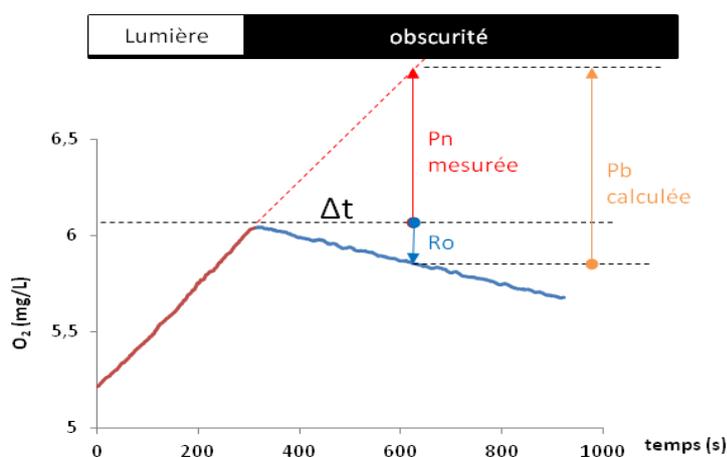


Figure II-5 : Mesure de l'intensité photosynthétique nette (P_n) et de l'intensité respiratoire à l'obscurité (R_o) à l'aide de l'évolution de la teneur en O_2 dans le milieu en fonction du temps.

Les pentes des courbes d'émission ou d'absorption d'O₂ en fonction du temps à la lumière et à l'obscurité, respectivement ont permis de déterminer l'intensité photosynthétique nette (Pn) ainsi que la respiration (Ro) en mg O₂ L⁻¹ s⁻¹ (Figure II-5).

L'intensité photosynthétique a été exprimée en fonction du C cellulaire.

II.4.3 Mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a*

Les cinétiques de la fluorescence chlorophyllienne ont été mesurées *in vivo* à l'aide d'un fluorimètre FMS-1 (Hansatech) modifié pour pouvoir être utilisé avec des suspensions de microalgues (Rech *et al.*, 2003). Lorsque l'appareil photosynthétique reçoit de la lumière, l'énergie correspondante peut être utilisée de plusieurs façons mais toujours de façon exclusive. La somme du rendement photochimique, de la fluorescence et de la dissipation non radiative (chaleur) est constante. Les variations du rendement de fluorescence sont donc directement liés à l'activité photochimique et non photochimique. Différents paramètres de la fluorescence de la Chl *a* permettent de connaître l'état physiologique des microalgues.

Les mesures ont été effectuées avec un volume de 2 mL de la suspension de microalgues dans laquelle ont été ajoutés 40 µL de NaHCO₃ (0,2 M), sous agitation magnétique et circulation d'eau thermostatée à la même température que la culture. Avant chaque mesure, l'échantillon a été placé 15 min à l'obscurité afin que tous les centres réactionnels soient «ouverts». Les mesures ont été réalisées à l'aide du logiciel «Modelf2». Le programme appliqué est composé de 3 étapes (Roháček *et al.*, 2014) :

- Étape 1 : Acclimatation à l'obscurité : L'échantillon a été illuminé à l'aide d'une lumière modulée (ML) de faible intensité produite par une LED bleue (0,1 µmol photons m⁻² s⁻¹) qui permet de mesurer la fluorescence minimale F₀ (Figure II-6), fluorescence pour laquelle l'accepteur quinonique d'électrons (Q_A) reste sous forme oxydée, prêt à accepter les électrons. Les centres réactionnels sont dits «ouverts». Un flash saturant (SP) d'une durée de 0,8 secondes est ensuite appliqué pour mesurer la fluorescence maximale F_m, fluorescence pour laquelle tous les centres réactionnels se ferment temporairement (l'ensemble des Q_A est alors sous forme réduite).
- Étape 2 : Acclimatation à la lumière : L'échantillon est ensuite illuminé pendant 7 min pour *P. tricornutum* et *D. lutheri*, ou 14 min pour *T. lutea*, par une lumière continue actinique non saturante (AL) d'intensité de 300 µmol photons m⁻² s⁻¹ pour *P. tricornutum* et *T. lutea*, ou

120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour *D. lutheri*. L'adaptation à la lumière se traduit par une diminution du niveau de fluorescence jusqu'à un niveau stationnaire « F_s », qui reflète un état d'équilibre entre l'excitation des centres et leurs voies de désactivation. Cette diminution correspond à un mécanisme d'extinction de la fluorescence. D'une manière générale, cette extinction a deux causes : 1) la réouverture des centres réactionnels temporairement fermés ; il s'agit du quenching photochimique (qP) et 2) l'activation de mécanismes protecteurs de l'appareil photosynthétique, ceux-ci ayant pour effet d'augmenter la dissipation de l'énergie absorbée sous forme de chaleur ; il s'agit du quenching non photochimique (qN). A la fin de cette phase, un autre flash saturant permet d'obtenir le niveau F_m' , niveau où toutes les Q_A sont réduites.

- Etape 3 : Relaxation à l'obscurité : l'AL a été supprimée afin de permettre aux mécanismes de quenching non photochimique de se relaxer. Au cours de cette période, l'échantillon a été traité par une série de SP pour déterminer les valeurs de F_0'' et F_m'' et ainsi de suivre la relaxation du quenching non photochimique.

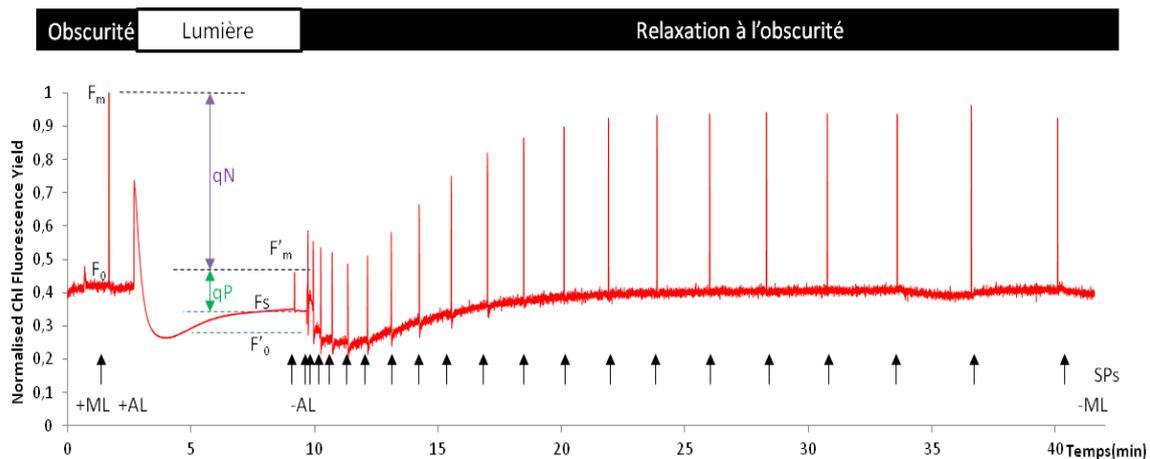


Figure II-6 : Exemple de cinétique de la fluorescence de la chlorophylle a chez une diatomée marine mesurée à l'aide du fluorimètre modulé FMS-1.

ML=lumière modulée, AL=lumière actinique, SP=flash saturant, F_0 =fluorescence minimale, F_m =fluorescence maximale, F_s =fluorescence stabilisée à la lumière, F_m' =fluorescence maximale à la lumière, F_0'' =fluorescence minimale après une période d'éclairement, qN=quenching non photochimique, qP=quenching photochimique. Chaque flèche indique un SP.

A partir des résultats obtenus, différents paramètres de fluorescence (Tableau II-2) ont été calculés pour caractériser le fonctionnement de l'appareil photosynthétique : 1) le rendement quantique maximum de la photochimie du PSII (Φ_{P0}), 2) le rendement quantique opérationnel du PSII (à la lumière) (Φ_{II}), 3) le quenching photochimique (qP) et 4) le quenching non photochimique (qN et NPQ). Le qN reflète l'activation de plusieurs processus de quenching non

photochimique pendant la période lumineuse et le paramètre NPQ est souvent utilisé comme indicateur de la dissipation d'énergie radiante en excès sous forme de chaleur (Roháček *et al.*, 2008). Les formules sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II-2 : Les paramètres de fluorescence, d'après Roháček *et al.* (2008)

Rendement quantique maximum de la photochimie du PS II	$\Phi_{P0} = F_v / F_m = 1 - F_0 / F_m$
Rendement quantique opérationnel du PS II	$\Phi_{II} = (F_m' - F_s) / F_m'$
Quenching photochimique	$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$
Quenching non photochimique	$qN = (F_v - F_v') / F_v = 1 - F_v' / F_v$
	$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' = F_m / F_m' - 1$

Pour s'affranchir des variations aléatoires de la quantité de chlorophylle et donc du niveau de fluorescence, les paramètres de fluorescence ont été corrigés à l'aide des formules suivantes :

- 1) Normalisation : $F_{(t)}^n = F_{(t)} / F_m$
- 2) Correction en considérant la valeur maximum Φ_{P0} comme la référence, notée Φ_{P0}^{ref} .

$$F_{(t)}^c = F_{(t)}^n \times (\Phi_{P0} / \Phi_{P0}^{ref}) = (F_{(t)} / F_m) \times (\Phi_{P0} / \Phi_{P0}^{ref})$$

$$qN^c = 1 - F_v'^c / F_v^{c,ref} = 1 - (1 - qN) \times (\Phi_{P0} / \Phi_{P0}^{ref})^2$$

$$NPQ^c = F_m^{c,ref} / F_m'^c - 1 = (NPQ + 1) \times (\Phi_{P0}^{ref} / \Phi_{P0}) - 1$$

Pour évaluer les composantes de qN ainsi que les relaxations, une régression non linéaire a été réalisée à l'aide des formules suivantes :

- 1) Modèle sigmoïde :

$$\frac{F_v''(t) - F_v'}{F_v} = qN_f(1 - e^{B_f \times t}) + qN_i \left(\frac{1 - e^{-t/B_i}}{1 + e^{(X_0^i - t)/B_i}} \right) + qN_s(1 - e^{B_s \times t})$$

- 2) Modèle exponentiel :

$$\frac{F_v''(t) - F_v'}{F_v} = qN_f(1 - e^{B_f \times t}) + qN_i(1 - e^{B_i \times t}) + qN_s(1 - e^{B_s \times t})$$

$$B_x = -\ln 2 / \tau_{1/2}^x, \quad qN = qN_f + qN_i + qN_s$$

La cinétique de relaxation du quenching non photochimique présente plusieurs contributions reposant sur deux mécanismes d'origines différentes, à savoir des processus énergétiques et des processus relevant de l'acidification du lumen. L'étude de la cinétique de relaxation de qN a permis d'identifier trois composantes notées : qN_f (composante rapide), qN_i (composante intermédiaire) et qN_s (composante lente) (Tableau II-2) (Roháček *et al.*, 2014). Pour

l'analyse de ces trois composantes, une lumière continue actinique plus élevée ($1000 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a été appliquée. L'évaluation des composantes du quenching non photochimique ainsi que les relaxations ont été réalisées à l'aide du logiciel Sigmaplot par la méthode de régression non linéaire (Roháček, 2010; Roháček *et al.*, 2014).

II.5 Analyses biochimiques

II.5.1 Extraction et dosage des protéines et glucides solubles

Les microalgues (environ 30×10^6 cellules) ont été récoltées tous les jours par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Le surnageant a été éliminé et le culot a été rincé 1 fois avec 10 mL de NaCl 1032 mOsm et conservé à -80 °C jusqu'aux analyses. L'extraction des protéines et glucides solubles a été réalisée à l'aide d'un choc osmotique par immersion des cellules dans l'eau ultra pure et/ou broyage à l'aide d'un homogénéiseur (6,0 m/s, 10s, Lysing Matrix D, FastPrep-24 5G), puis centrifugation à 16100 g pendant 20 min à 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5415 R) pour éliminer les débris cellulaires.

Le dosage des protéines solubles a été effectué par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) modifiée, basée sur la formation d'un complexe entre les acides aminés basiques et aromatiques avec le bleu de Coomassie G-250. Le mélange réactionnel comprend : 50 μL de réactif de Bradford et 150 μL du lysat. L'ensemble a été incubé pendant 5-10 min à température ambiante, puis l'absorbance à 595 nm (xMark Bio-Rad) a été mesurée. L'albumine de sérum bovin (ASB) a été utilisée comme référence pour établir la courbe d'étalonnage.

Le dosage des glucides solubles a été réalisé en utilisant un mélange phénol-acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1951). Un mL du lysat a été mis dans un tube à essai avec 250 μL de phénol à 3 % dans l'eau. Puis 2,5 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés et l'ensemble a été mélangé dans la glace. Le mélange a été incubé dans l'étuve à 90 °C pendant 30 min, puis refroidi immédiatement dans la glace. L'absorbance a été mesurée à 485 nm, les teneurs en glucides solubles ont été déterminées en référence à une gamme étalon de glucose.

II.5.2 Estimation des lipides neutres avec le fluorochrome Nile red

Le fluorochrome Nile red (9-diéthylamino-5H-benzo- α -phénoxazine-5-one) est un outil d'analyse rapide pour mesurer et suivre les variations relatives de la teneur en lipides neutres. Beaucoup de recherches ont déjà montré que l'intensité de la fluorescence du Nile red est

proportionnelle à la quantité de lipides neutres, cette technique cependant demeure très sensible à de nombreux paramètres (Rumin *et al.*, 2015).

Pour *P. tricornutum*, environ 3×10^6 cellules ont été mises en suspension dans 3 mL de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) 25 % qui facilite la pénétration du Nile red dans les cellules. Les mesures ont été effectuées immédiatement après y avoir ajouté 1,5 μL de Nile Red à 1 mg mL^{-1} dans l'acétone (Chen *et al.*, 2009).

En ce qui concerne *T. lutea* et *D. lutheri*, les mesures ont été faites sur un volume de 3 mL de culture (environ 3×10^6 cellules) dans lequel ont été ajoutés directement 3 μL de Nile Red (1 mg mL^{-1} dans l'acétone).

Le spectrofluorimètre (Perkin Elmer LS-55) a été configuré pour une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 580 nm. Les résultats présentés sont exprimés en intensité de la fluorescence rapportée à un nombre de cellules ou à une quantité de carbone cellulaire.

II.5.3 Extraction et dosage des lipides totaux

Les échantillons de microalgues (environ 300×10^6 cellules) en phase exponentielle de croissance, en début de phase stationnaire et en fin de phase stationnaire (+3J) ont été récoltés par filtration (Whatman GF/C diamètre 47 mm), puis conservés à -80°C .

L'extraction des lipides totaux a été réalisée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les algues, sur filtre, ont été décongelées puis transférées dans un broyeur de Dounce. Un mélange de 3,2 mL de chloroforme/méthanol/NaCl à $2,8 \text{ g L}^{-1}$ (1/2/0,2 ; v/v/v) a été ajouté puis le tout a été broyé. Pour faciliter la rupture des cellules, ce mélange a été placé dans une cuve à ultrasons (Branson 3210) pendant 20 min à 20°C . Un volume de 2 mL de chloroforme a été ensuite ajouté et le mélange a été broyé à nouveau pendant 1 min et replacé dans la cuve à ultrasons pour une durée de 30 min. Les débris de filtre ont été éliminés à l'aide d'une filtration sous vide partiel (Büchner), et la phase chloroformique contenant les lipides a été récupérée dans un ballon puis évaporée dans un évaporateur rotatif (Heidolph 94200). L'extrait sec lipidique a été repris par 2 mL de chloroforme. Après conditionnement sous azote afin d'éviter tout phénomène d'oxydation, l'extrait lipidique a été conservé à -20°C .

Le dosage des lipides totaux a été effectué par la méthode de Marsh et Weinstein (1966). Cette méthode spectrophotométrique repose sur la réaction de décarboxylation des acides carboxyliques en milieu acide et leur brunissement à haute température. Dix μL de l'extrait

chloroformique lipidique à doser ont été versés dans un tube à essai. Le chloroforme a été évaporé sous azote puis 2 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés. Après homogénéisation douce dans la glace, le tout a été mis à incuber dans une étuve à 200 °C pendant 20 min puis refroidi immédiatement dans la glace. Trois mL d'eau osmosée ont été ajoutés et mélangés doucement dans la glace. L'absorbance a été mesurée à 375 nm contre la référence ne contenant pas de lipide. Le dosage a été effectué en utilisant une gamme étalon de tripalmitate de glycérol.

II.6 Analyses lipidiques

II.6.1 Séparation et caractérisation des lipides

II.6.1.1 Utilisation de standards

L'identification des lipides contenus dans les microalgues a nécessité l'emploi de standards lipidiques. Ceux-ci sont commercialisés sous forme de poudre ou de liquide dans des ampoules scellées. Tous les standards ont été solubilisés dans du chloroforme, bouchés sous flux d'azote et conservés à -20 °C. La liste (Tableau II-3) répertorie les standards utilisés et leur provenance.

Tableau II-3 : Liste des standards lipidiques

- PC : 1,2-dilinolénoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine	(Avanti, Polar lipids)
- PS : 1,2-diacyl-sn-glycéro-3-phospho-L-sérine	(Sigma-Aldrich)
- PE : 1-hexadécanoïl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatétraénoïl)-sn-glycéro-3-phospho-éthanolamine	(Avanti, Polar lipids)
- PG : 1,2-diacyl-sn-glycéro-3-phospho-(1-rac-glycérol)	(Sigma-Aldrich)
- PI : 1,2-diacyl-sn-glycéro-3-phospho-(1-D-myo-inositol)	(Sigma-Aldrich)
- DGTS : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-O-4'-(N,N,N-triméthyl)-homosérine	(Avanti, Polar lipids)
- MGDG : 1,2-diacyl-3-O-β-D-galactosyl-sn-glycérol	(Avanti, Polar lipids)
- DGDG : 1,2-diacyl-3-O-(α-D-galactosyl1-6)-β-D-galactosyl-sn-glycérol	(Avanti, Polar lipids)
- SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol	(Avanti, Polar lipids)
- TAG : tripalmitate de glycérol	(Sigma-Aldrich)
- DAG : 1,3-dilinoléoyl-rac-glycérol	(Sigma-Aldrich)
- DHA : cis-4,7,1,13,16,19-acide docosahénoïque	(Sigma-Aldrich)
- EPA : cis-5,8,11,14,17-acide eicosapentaénoïque	(Sigma-Aldrich)

II.6.1.2 Séparation des classes lipidiques sur colonne de silice

Les principales classes lipidiques présentes chez les microalgues ont été obtenues par fractionnement de l'extrait brut lipidique sur une petite colonne renfermant 500 mg de gel de silice 60 (phase normale, 0,0063-0,2 mm, Merck), pré-conditionnée avec du chloroforme pur. L'échantillon pré-concentré dans 100 μ L de chloroforme a été déposé en tête de colonne, puis élué par différents solvants. La fraction des lipides neutres a été éluee par 20 mL d'un mélange chloroforme/acétone (9/1 ; v/v), puis celle des glycolipides par le passage successif de 2 mélanges de solvants : 4 mL de chloroforme/méthanol (5/2 ; v/v) et 6 mL d'acétone/méthanol (9/2 ; v/v). La dernière fraction qui contient les phospholipides et les bétaine lipides a été éluee par 20 mL d'un mélange très polaire méthanol/eau (9/1 ; v/v).

Les solvants de chacune des fractions recueillies ont été évaporés à l'évaporateur rotatif. Chaque extrait sec lipidique a été repris dans 2 mL de chloroforme. Après conditionnement sous azote, les différentes fractions ont été conservées à 4 °C.

II.6.1.3 Séparation par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode physique de séparation des différents constituants d'un mélange ; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile (Fuchs *et al.*, 2011).

- CCM monodimensionnelle

La séparation des différents lipides des microalgues a été réalisée en utilisant comme phase stationnaire de la silice répartie sur la plaque CCM 20×20 cm (Silica gel 60, Merck). Les plaques CCM ont été pré-développées dans de l'isopropanol pour éliminer les impuretés et ensuite activées pendant 30 minutes à 120 °C avant utilisation. Les extraits lipidiques bruts correspondant à $7,5 \times 10^6$ cellules ont été déposés sur les plaques à l'aide d'un déposateur semi-automatique (Camag Linomat V) muni d'une micro-seringue permettant de déposer un volume précis d'échantillon.

Les phases mobiles sont constituées d'un mélange de plusieurs solvants. Un système permettant 3 migrations avec des mélanges de solvants différents a été utilisé : (A1) acétate de méthyle/ isopropanol/ chloroforme/ méthanol/ KCl 0,25 % (25/25/25/10/9 ; v/v/v/v/v) ; (A2) acétate de méthyle/ isopropanol/ chloroforme/ méthanol/ KCl 0,25 % (5/5/5/2/1 ; v/v/v/v/v) ; (B) hexane/ diéthyl-éther/ acide acétique (40/10/1 ; v/v/v).

Les migrations ascendantes des phases mobiles se font dans des cuves de migration saturées par les vapeurs des solvants de migration. Pour séparer les lipides polaires, une première migration a été faite jusqu'à la moitié de la plaque avec le mélange A1. Cette migration permet de séparer PC, PS, DGDG, MGDG, mais DGTS est co-élué avec PI, et SQDG est co-élué avec PE+ PG. Après séchage, une seconde migration a été effectuée avec le mélange A2 jusqu'au 2/3 de la plaque afin d'isoler DGTS, PI et SQDG, cependant PE+PG sont co-élués. Une troisième migration s'est déroulée jusqu'à environ 1,5 cm du haut de la plaque avec le mélange B, qui est peu polaire et qui permet de séparer les lipides non polaires comme DAG, TAG et les acides gras libres (AGL). La séparation se fait selon la polarité des lipides : les lipides les plus polaires correspondent aux spots en bas de la plaque à proximité de la ligne de dépôt alors que les moins polaires sont positionnés en haut de la plaque.

- CCM bidimensionnelle

La CCM bidimensionnelle est un outil puissant pour séparer des lipides polaires des microalgues. La première migration a été effectuée avec le mélange A1, alors que la deuxième migration dans l'autre dimension a été réalisée avec le mélange C composé de chloroforme, d'acétone, de méthanol, d'acide acétique et d'eau dans les proportions 10 :4 :2 :2 :1 (v/v/v/v/v).

L'identification des lipides est possible après révélation en comparant la position de chacun des spots avec les standards.

- Révélation des spots

Les révélateurs spécifiques ou non spécifiques ont été pulvérisés sur les plaques CCM en vue de visualiser les spots.

La primuline a été utilisée comme révélateur non spécifique et non destructif à raison de 5 mg pour 100 mL dans un mélange acétone/eau (8/2, v/v) (White *et al.*, 1998). Les fractions lipidiques révélées ont été visualisées en chambre noire sous lampe UV à 366 nm.

D'autre part, un réactif au trioxyde de molybdène (Sigma-Aldrich) a été utilisé. Il permet de détecter visuellement les phospholipides en colorant les spots en bleu (Dittmer et Lester, 1964).

II.6.1.4 Identification des lipides

Une identification supplémentaire des spots lipidiques a été réalisée selon Huang *et al.* (1999) en utilisant un spectromètre de masse (LCQ, Thermo Finnigan) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) et d'un analyseur à piège ionique (IT) (plateforme ThalassOMICS, Nantes). Les lipides récupérés de la silice ont été dissous dans du méthanol pur puis dilués jusqu'à environ $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Les échantillons ont été injectés dans la source à l'aide d'une seringue de perfusion en raccordant à la ligne de perfusion, avec un débit à $15 \mu\text{L min}^{-1}$ puis à $3 \mu\text{L min}^{-1}$. Les analyses de masse ont été menées dans les modes positifs et négatifs. Toutes les données ont été acquises et analysées par le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Finnigan).

II.6.1.5 Quantification des lipides

La quantification des lipides polaires a été réalisée par densitométrie. Pour déterminer la quantité de lipides contenus dans chacun des spots séparés par CCM, les plaques de silice revêtues par la primuline ont été scannées à l'aide d'un système d'imagerie Versadoc 3000 (Bio-Rad) sous LED bleue à 530 nm, qui permet de prendre une photographie de la plaque de CCM en haute résolution.

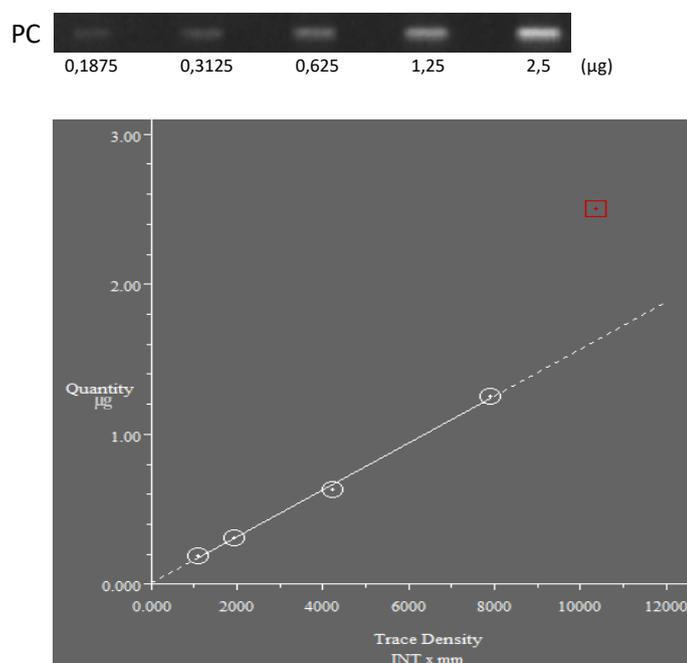


Figure II-7 : Exemple de courbe d'étalonnage du standard lipidique PC par densitométrie. Le point rouge en carré indique une concentration hors de la gamme linéaire.

Le logiciel Quantity One (Bio-Rad) a été utilisé pour détecter les bandes et quantifier les composés par comparaison avec une gamme étalon réalisée en parallèle avec des standards connus. Les différentes concentrations du mélange de standards déposés en parallèle nous permettent de tracer une courbe d'étalonnage pour chacun des standards lipidiques et pour chacune des plaques (Figure II-7). Lorsque des lipides ne sont pas disponibles dans le commerce, la quantification a été effectuée par comparaison au standard le plus proche. Par exemple, l'étalon PC est utilisé pour quantifier la DGCC ; l'étalon PS est utilisé pour quantifier la DGTA.

II.6.2 Détermination des profils en acide gras

L'analyse du profil en acides gras de chacune des fractions lipidiques par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a nécessité l'obtention d'esters méthyliques d'acides gras volatils.

II.6.2.1 Obtention des esters méthyliques d'acides gras

Les fractions lipidiques ont subi une saponification puis une méthylation selon la méthode de Slover et Lanza (Slover et Lanza, 1979) pour obtenir les esters méthyliques d'acides gras.

La saponification permet l'hydrolyse des liaisons esters et la libération des acides gras du glycérol. Un volume précis d'extrait chloroformique de chacune des classes lipidiques à analyser a été placé dans un tube à métyler. Après évaporation du chloroforme sous flux d'azote, le résidu lipidique sec est repris par 1 mL de soude méthanolique à 0,5 mol L⁻¹. Le tube à métyler est agité énergiquement, bouché sous azote puis placé dans une étuve à 80 °C pendant 20 min pour obtenir des sels d'acides gras. Après saponification, 2 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore (BF₃) à 14 % ont été ajoutés aux sels d'acides gras obtenus puis chauffés à 80 °C pendant 20 min afin d'obtenir les esters méthyliques d'acides gras.

Après saponification et méthylation, 2 mL d'isooctane ont été ajoutés pour extraire les esters méthyliques formés. L'ajout de 1 mL de NaCl à 35 g L⁻¹ suivi d'une étape de centrifugation à 1200 g pendant 5 min est nécessaire pour obtenir une bonne séparation des 2 phases du mélange. Les esters méthyliques d'acides gras contenus dans la phase isooctane sont recueillis dans des tubes à hémolyse de 5 mL après avoir été séchés par passage sur une colonne de sulfate de sodium anhydre.

II.6.2.2 Analyse des esters méthyliques d'acides gras par CPG

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Focus GC (Thermo Electron Corporation) équipé d'une colonne capillaire CP Sil-88 de 25 m × 0,25 mm (Varian). L'azote a été utilisé comme gaz vecteur inerte avec un débit constant de 1 ml min⁻¹. L'injection a été réalisée à l'aide d'un injecteur automatique AI 3000 (Thermo Electron Corporation) en mode split avec un volume de 3 µL à 250 °C. Les analyses ont été effectuées de 120 °C à 220 °C: 120 °C pendant 4 min, puis avec une augmentation progressive (6 °C min⁻¹) jusqu'à 220 °C et un maintien à 220 °C pendant 5 min. Les esters méthyliques d'acides gras ont été détectés par un détecteur à ionisation de flamme (FID), alimenté par un mélange air/hydrogène à 280 °C.

Différents mélanges d'esters méthyliques d'acides gras connus (Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour déterminer les temps de rétention des différents acides gras. Les esters méthyliques d'acides gras ont été quantifiés avec le logiciel Azur V.4 (Datalys), par détermination d'une aire relative calculée en faisant le rapport de l'aire du pic d'intérêt sur l'aire de tous les pics du chromatogramme, et ont été exprimés en pourcentage molaire.

II.7 Quantification de l'expression des gènes d'intérêt

II.7.1 Extraction des ARN totaux et transcription inverse

Les échantillons de microalgues (environ 100×10⁶ cellules) correspondant à la phase exponentielle de croissance, au début de la phase stationnaire et à la fin de la phase stationnaire (+3J) ont été récoltés par filtration (Whatman GF/C diamètre 47 mm). Les filtres ont été chauffés à 150 °C pendant 6 h avant utilisation afin d'éliminer les RNases. Les cellules sur filtre ont été fixées dans l'azote liquide afin de bloquer toute réaction enzymatique, puis conservées à -80 °C. L'extraction des ARN totaux a été réalisée grâce au Kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich). Les filtres sur lesquels ont été fixées les cellules ont été broyés avec 1 mL d'un mélange de solution de lyse additionné de 2-mercaptoéthanol. Le broyat a été incubé 5 min à 56 °C puis centrifugé à 16100 g pendant 3 min à température ambiante (toutes les centrifugations suivantes ont été effectuées dans les mêmes conditions). Le surnageant a été transféré sur une colonne de filtration puis centrifugé 1 min afin d'éliminer les débris résiduels. La solution d'accrochage (Binding Solution) a été ajoutée à raison d'un mL dans le lysat clarifié et mélangé par pipetage. Le tout a été versé dans une colonne d'accrochage (binding column) retenant les ARN après centrifugation. Après lavage avec 300 µL de solution de lavage (Wash Solution I), 80 µL de solution de DNase (10 µL DNase I + 70 µL tampon de digestion) ont été ajoutés

directement sur la colonne et incubés 15 min à température ambiante afin d'éliminer les traces d'ADN génomique. La colonne a été lavée successivement avec 2 solutions de lavage (Wash Solution I et Wash Solution II diluée dans éthanol), puis séchée par centrifugation. 50 µL de solution d'éluion ont ensuite été ajoutés à la colonne, incubés 1 min puis centrifugés. La solution d'ARN a été récupérée et conservée à -80 °C.

La quantité et la pureté des extraits d'ARN ont été déterminées au spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific), en mesurant l'absorbance à 260 nm (une unité de DO_{260nm} correspond à 40 µg d'ARN mL^{-1}), et 280 nm (contamination protéique). Un rapport DO_{260nm} / DO_{280nm} compris entre 1,8 et 2,2 indique une pureté suffisante pour les manipulations suivantes.

La transcription inverse (RT) a permis d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers (ARNm) présents dans les extraits d'ARN totaux. 1 µg d'ARN totaux a été mélangé avec 250 ng d'amorces oligo(dT)₁₅ ainsi que 250 ng d'amorces aléatoires (Random primers), le volume est ajusté à 12,25 µL avec de l'eau RNase-free. L'ensemble a été incubé à 70 °C pendant 5 min afin de dénaturer les ARN, puis placé immédiatement sur la glace. Aux 12,25 µL précédents ont été ajoutés : 5 µL de tampon MMLV 5×, 6,25 µL de dNTP (2 mM), 20 U RNAsin inhibiteur et 200 U transcriptase inverse (MMLV RT, Promega), ajusté à 25 µL avec de l'eau RNase-free. Le milieu réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 90 min pour permettre de synthétiser les brins d'ADNc, puis à 70 °C pendant 5 min afin de bloquer les activités enzymatiques. Les ADNc ont été conservés à -20 °C.

II.7.2 PCR quantitative

Les ADNc obtenus par RT ont été analysés par PCR quantitative (qPCR) pour comparer l'expression des gènes d'intérêt en fonction des conditions et de la durée des cultures. Cette technique repose sur la possibilité de suivre au cours du temps le processus de PCR à l'aide de la fluorescence du SYBR green, un intercalant de l'ADN. Les données de fluorescence sont collectées à chaque fin de cycle de la PCR et retranscrites sous la forme d'un graphique en fonction du nombre de cycles d'amplification (Figure II-8). A partir de la courbe obtenue, un seuil est défini au niveau de la phase exponentielle, où l'expression d'un gène peut être mesurée de façon optimale. L'intersection entre la ligne seuil et la courbe de fluorescence de l'échantillon définit le C_t (threshold cycle). Pour chaque échantillon, plus le C_t est faible, plus l'expression est élevée.

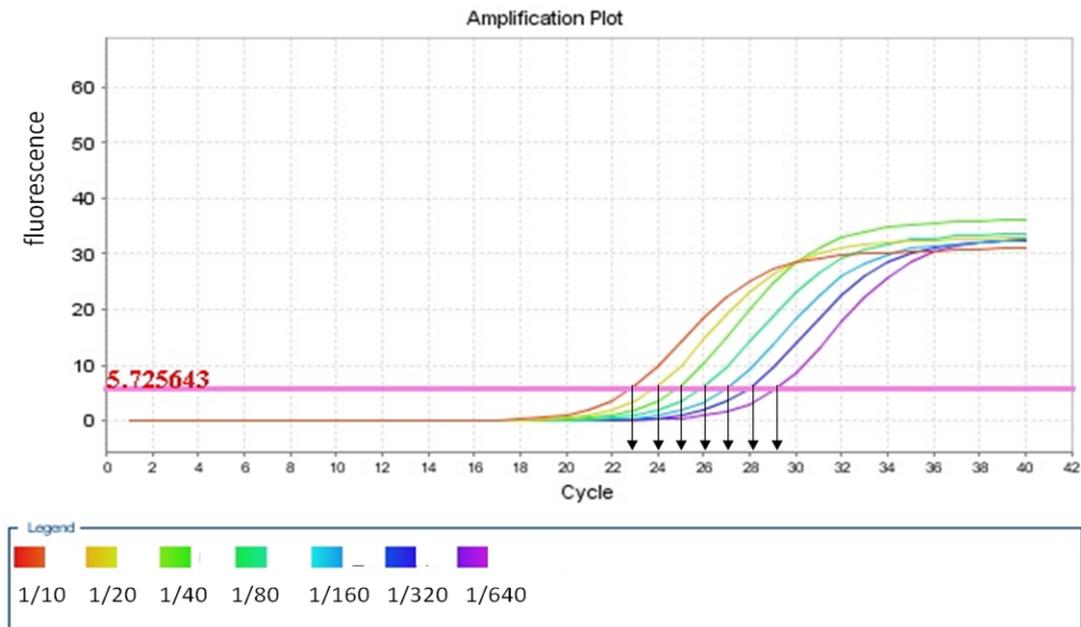


Figure II-8 : Exemple de courbe d'amplification de qPCR, la flèche indique le C_t correspondant à la dilution d'ADNc.

II.7.2.1 Définition des amorces

Selon la base de données des voies métaboliques KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp>), nous avons sélectionné 10 enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des TAG et des lipides membranaires.

Les gènes / isogènes codant les enzymes candidates chez *P. tricornutum* ont été recherchés dans les bases de données génomiques accessibles telles que JGI (Joint Genome Institute) (<http://www.jgi.doe.gov/>). Afin d'identifier les isogènes et de fixer les régions potentiellement conservées, les séquences d'isogènes potentiels ont été alignées grâce au logiciel clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Pour *T. lutea*, les gènes / isogènes correspondants ont été recherchés avec les données protéomiques de *P. tricornutum* et de l'Haptophyte *Emiliana huxleyi* (Read *et al.*, 2013) (disponibles dans JGI) par analyse BLASTp (Altschul *et al.*, 1990, 1997) contre une base de données de *T. lutea* disponible au centre IFREMER-Nantes.

Les amorces ont été désignées à l'aide du logiciel Primer Express 3.0 (Thermo Fisher Scientific) et sont présentées dans les tableaux suivants (Tableau II-4 à II-7).

Tableau II-4 : Liste des couples d'amorces chez *P. tricornutum* utilisés en qPCR

Enzyme	Gène abréviation	Protéine ID	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
Glycerol-3-phosphate acyl transferase	phGPAT1	Phatr2_37409	GTGTCCCCATTGTTCTCTGTTG	CGTTGCGTCTTCGTAGTCCTC
	phGPAT2	Phatr2_3262	AACAAGTTCAAAGAAGGTGGTGC	CGATGGTTTTAGAGTCAAAGGGTG
Lyso-phosphatidic acid acyl transferase	phAGPAT1	Phatr2_43099	GCATCCACCACACCTTTTCG	TTTCCTGCTCATCCTTTCCAA
	phAGPAT2	Phatr2_11916	TTGGCTGGAGAACTACAAAATCA	TGCCACCGAGGTAATAGC
	phAGPAT3	Phatr2_42446	GGTAGGTTCCATCCTGATTAGTGC	GACCCATTGATTGCCTTCGT
	phAGPAT4	Phatr2_20460	CGAGCGATTGGGGAGGA	CAAAAGCGGAAAGGGAGACA
	phAGPAT5	Phatr2_48640	CGTGCCGACAACCTCAATC	AGGAAAGAGAACAAGGCGAGAA
Phosphatidic acid phosphatase	phPAP1	Phatr2_40261	TTATTTGCGACCCATTTTCTACG	CATCACCTCCACCTCCATCC
	phPAP2	Phatr2_39949	CGAGTCGTCGTCGCCATC	CAGCCGAATAATCCGAACAAG
	phPAP3	Phatr2_32083	AGCCGAGAAGCGACATTGA	CAAGCCAAGACGACAAAAAAGAC
Diacylglycerol acyltransferase	phDGAT1	Phatr2_9794	TCCATCGCACTATTCACCTTTTT	TCTCGTCCAGGTCGCTCACT
	phDGAT2	Phatr2_43469	CACGGAACGAACGCAGACTA	CGATTTACGAACCAAGGGA
	phDGAT3	Phatr2_31662	GTTTTCTTGCGTTTCTGTTAGC	AATCGGGCGGGCACAT
	phDGAT4	Phatr2_49462	TTTGCCACCCGTAAGGACA	ATCAAAGAGCCGCTGGACC
	phDGAT5	Phatr2_49544	CACTTGCCTTGCGACTCATC	TTTGTGTTGCTTAGTATTTCTTCTG
	phDGAT6	Phatr2_3953	GATTCGTTTCGTTGGCTTTAGA	GCCTCGTTCTCACCAAATCC
Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	phPDAT1	Phatr2_8860	GCAAAGAGAACGCCAAATCC	GCACCGAATCCAATGAGAAAG
	phPDAT2	Phatr2_49702	GAGAACGACGCTGACAAGACG	CGGGCGGACTCCAACA
MGDG synthase	phMGD1	Phatr2_54168	TTGCCCATTCGCCACG	TGACCCAACTCCTTCTCCACC
	phMGD2	Phatr2_14125	GCCAATCCGACAAGGGTTTT	TGACGGCGAAGCGATTTAC

Enzyme	Gène abréviation	Protéine ID	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
	phMGD3	Phatr2_9619	CGCCATTCAAGCCGACC	CCACCTCCCATTACCAAAACG
SQDG synthase	phSQD2	Phatr2_50356	AGTCACAGCCCAGCACCG	GCCACCAAACAGACAATCAGG
Betaine lipid synthase	phBTA	Phatr2_42872	CACAGCCGTCGGTCTCG	CCCAGCAAATGTTGTAAATGTAGGT
Diacylglycerol-	phEPT1	Phatr2_33864	ACTGCTACTTAGTTGTGGGTCCG	TGGGCTGTTTGTGCTTTACG
ethanolaminephosphotransferase	phEPT2	Phatr2_37086	GCTTTGTTTCGTTATTCTTTTCGG	GCTTTCTGTATGATATTCCTCCC
Phosphatidate	phCDS1	Phatr2_47250	TGCCGTAGTAGCGTGCTGG	TTCGTGGAGACTCGGTGTAATAG
cytidyltransferase	phCDS2	Phatr2_7678	CTTTGTGCCTCCACATTGAA	GAAAGGGTGCCGTGAAGAGTT
	phCDS3	Phatr2_54756	GTCCAAAGGTCCAGATGAAAGC	TGGGAACGGTCAAGAGCAGT

Tableau II-5 : Liste des couples d'amorces chez *T. lutea* utilisés en qPCR

Enzyme	Gène abréviation	Protéine ID	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
Glycerol-3-phosphate acyl	tiGPAT1	Tiso _11885	GCCAAAAGCCGCCCTAA	CGAACCTCAATCCCGAGTATG
transferase	tiGPAT2	Tiso _02054	CGAGAGATTGGAGCCAGGAA	TCCCCATCATCACGAGCAG
Lyso-phosphatidic acid acyl	tiAGPAT1	P2632.01	ACAGTGCGGCAGTAAGGACG	CAGGACAAACCCAGTGAGCC
transferase	tiAGPAT2	Tiso _18153	CCATCGCCGTCTTGCTTACT	TCAACGACGCTCCAACACAC
Phosphatidic acid phosphatase	tiPAP1	Tiso _01516	GCAAGTCGCAAGCAAATCAA	CCACAAAGGCAGTCTCAAATCC
	tiPAP2	Tiso _12061	GCCTGAGTCTGGTTGTTGTCG	GTGTTGGAGCTGGGTGGTTC
Diacylglycerol acyltransferase	tiDGAT1	Tiso _5058	CCGTATCCCAGCGTTCATTT	GCATATTGTAAGTCTCCCATCCC
	tiDGAT2	Tiso _11098	CACTTTCGTCTGCTCGCTCTAC	GTGCCCGCAACAGGTCTT
	tiDGAT3	Tiso _22106	TCGCACATCTAAAACACTACTCGG	GGGAACGGCAAGCCAAAC

Enzyme	Gène abréviation	Protéine ID	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
	tiDGAT4	Tiso _6172	ATCGTTTGTGGGGTTTGGG	TTTGGTCTTCCTTGGCTCGTA
	tiDGAT5	Tiso _15851	GGGGATGAGATGCGACGAC	AGCGAAGGATGCCTGGGT
	tiDGAT6	Tiso _01740	GGCCGGGTCTACGTTTTCT	GCATTCCACCACGCTTTGT
Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	tiPDAT1	P2565.01	CCTGGCTGTCCTCACTATTCG	GCCGCTTCCGCATTTTC
	tiPDAT2	Tiso _7980	TCAGCCGATTAAGGCATAGGAA	CGGATAAAGCGAGTGCAACAG
	tiPDAT3	Tiso _9543	CAACGCATACTCCTGAAGAAACC	TGTGCCCTTGCTGAAAACCT
MGDG synthase	tiMGD1	Tiso _11866	GAGACGGGAAATGTCAAGCAC	GGGTCATCGAGCCAAGCA
	tiMGD2	Tiso _8147	TAGGAGTAGGCAGGACACGAGG	CAAGCGTCAATCAATAGAAATCAAG
SQDG synthase	tiSQD2	P3963.01	AGGCGGCACCAGCACA	TCACCTTTTCAGACTCCACTCG
Diacylglycerol- ethanolaminephosphotransferase	tiEPT	Tiso _16476	GGGGAGTATAGATGTTTAGAGGGACC	AATGGCACAGGAACGACGAG
Phosphatidate cytidyltransferase	tiCDS1	Tiso _9387	CCGATTCATTCCAACGACG	ACAAGCGATGCGAAACTGC
	tiCDS2	Tiso _3348	CTCTTCCTTGTTTCCTTCCTTCTG	TTCACCCGACATTCCTCCAC
Betaine lipid synthase	tiBTA1	Tiso _17669	GGAATGGACGAAAGAGGTGTTG	TGTTGCGGGAGTGAATGTGA
	tiBTA2	Tiso _31533	ATGCGGGCGAAGGACA	CAGGCTGACGGCTACGATG

Tableau II-6 : Liste des couples d'amorces des gènes de ménage chez *P. tricornutum* utilisés en qPCR, d'après Heydarizadeh (2015)

Gène abréviation	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
phActin12	TCGCCTGAGTCGAGAACACA	GCCCATCCAGTCCTGTTGAC
phActin16	AGGCAAAGCGTGGTGTCTTA	TCTGGGGAGCCTCAGTCAATA
phTub α	CTGGGAGCTTTACTGCTTGGGA	ATGGCTCGAGATCGACGTAAA
phTub β	TAACGCGACTCTTTCCATCCA	TTGGCAATCAATTGGTTCAGG
phTBP	ACCGGAGTCAAGAGCACACAC	CGGAATGCGCGTATACCAGT
phUBI	CCATCGACAACGTCAAGACCA	CCACGTAGACGCAACACCAAA
phCdkA	CGAAGTCGTTACCCTGTGGT	CCAATTGATCGGCTTCAGAT
phEF1 α	GCCTCGGGTGTTCCTTCCTT	ACGGGAGAGTATCCGTTGGA
phRPS	TCGAAGTCAACCAGGAAACCA	GCCATTTGCTGCTCAACCA
phHist4	CCGTGGAGTCCTCAAGGTCTT	CATGGCGGTGACGGTCTTAC

Tableau II-7 : Liste des couples d'amorces des gènes de ménage chez *T. lutea* utilisés en qPCR

Gène abréviation	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
tiActin3	CGGGGCAGCGGAAAC	TGACCAGGAGATGCAAACAGC
tiActin4	TTCCCAGTTCTGTACGATGCC	TCCCCTCGCACATTTTCC
tiTub α	TGACTTGGCGAAAGAAGAAACA	TGCCATACGACCGAAAAGC
tiTub β	GAATACCAGCAATACCAAGACGC	GCCTTAGAAGCAGCCTTGAGAT
tiTBP	CGTGCGAACCGCTGTATG	GCTCTGGGTCGTCAAGGTAATA
tiUBI	GAAGCAACTTGAGGATGGGC	GCCACGGAGACGAAGCAC
tiGAPDH	GCCCCACGGAACCTCATT	ACGATACCGCCTCCTCCAC
tiGAPDH2	TGACCTCAGCCTTGATCTCGT	CGTCGCCAAGTGCTACCC
tiEF1 α	ATCCAGAAGGGCAACCACAA	CTCCGCCAACCTCATCGTA
tiHist	GCTCTAGCCAATGGAAACCTCA	CAATCGCTGGTCCCCTCTT

II.7.2.2 Tests d'amorces

Les amorces doivent avant tout être testées pour vérifier leur spécificité et l'absence d'inhibition.

Pour chaque couple d'amorces, le milieu réactionnel de qPCR comprenait 7,55 μ L de master mix 2 \times (GoTaq), 4,9 μ L d'ADNc dilué à 1/10, 0,8 à 0,1 μ M d'amorce sens et anti-sens, ainsi que 0,15 μ L CXR référence dye (30 μ M) et ajusté à 15 μ L avec de l'eau RNase-free. La qPCR a été réalisée à l'aide de l'appareil StepOnePlus Real-time PCR (Applied Biosystems). Le

programme de qPCR était le suivant : 2 min à 95 °C pour activer l'enzyme, suivi de 40 cycles : 15 s à 95 °C (dénaturation), 1 min à 60 °C (hybridation et élongation). Enfin une augmentation de 0,3 °C toutes les 30 s jusqu'à 95 °C a été effectuée pour obtenir la courbe de fusion et vérifier la spécificité des amorces.

Les couples d'amorces et leur concentration ont été sélectionnés selon les 2 critères suivants :

- Un seul pic doit être visible sur la courbe de fusion, témoignant de l'absence de produits de qPCR aspécifiques et de dimères d'amorces.
- L'efficacité (E) estimée par le programme PCR Miner (Zhao et Fernald, 2005) doit être comprise entre 85 % et 115 %. Une valeur de 100 % signifie qu'à chaque cycle de qPCR, 1 brin de matrice a été dupliqué.

II.7.2.3 Expression relative

La valeur du Ct pour chaque échantillon ainsi que la moyenne de E pour chaque couple d'amorce ont été déterminées par l'analyse des données de fluorescence brute en utilisant le PCR Miner (Zhao et Fernald, 2005).

Dix gènes de ménage chez *P. tricornutum*: phActine12, phActine16, phTub α (tubuline α), phTub β (tubuline β), phTBP (TATA box binding protéine), phUBI (ubiquitine), phCdKA (kinase A cycline-dépendante), phEF1 α (élongation facteur), phRPS (protéine ribosomale de la petite sous unité 30S) et phHist4 (Histone 4); et chez *T. lutea* : tiActine3, tiActine4, tiTub α , tiTub β , tiTBP, tiUBI, tiGAPDH, tiGAPDH2, tiEF1 α et tiHist ont été testés sur les différents échantillons respectivement. Ceux dont l'expression était la plus stable quelles que soient les conditions étudiées ont été sélectionnés à l'aide du logiciel Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). Les 2 critères de sélection ont été 1) un faible écart-type de C_t (inférieur à 1) entre tous les échantillons, et 2) une forte corrélation par paire (corrélation de Pearson). Un index Bestkeeper a été calculé à partir des gènes de ménage sélectionnés (correspondant à la moyenne géométrique) et utilisé pour normaliser les expressions.

L'expression relative (ER) des gènes d'intérêt par rapport à la condition témoin a été calculée selon l'équation suivante (Livak et Schmittgen, 2001) :

$$ER = \frac{(1 + E \text{ du gène d'intérêt})^{(C_t \text{ du témoin} - C_t \text{ de l'échantillon})}}{(1 + E \text{ du gène de ménage})^{(C_t \text{ du témoin} - C_t \text{ de l'échantillon})}}$$

Si $ER > 1$, la valeur indique le niveau de surexpression du gène d'intérêt comparativement à la condition témoin ; si $ER < 1$, le niveau de sous-expression est indiqué sous la forme du rapport $1/ER$.

II.8 Analyses statistiques

Si ce n'est pas mentionné de façon spécifique, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Sigmaplot selon l'hypothèse que les moyennes correspondantes sont égales. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA à un facteur avec mesures répétées, suivie d'un test post-hoc de LSD de Fisher. La différence entre les groupes a été considérée statistiquement significative lorsque $p \leq 0,05$. Tous les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (S.D.).

Les dissimilarités dans la composition des lipides membranaires et la composition en AG de chaque fraction lipidique ont été calculées par l'analyse de pourcentage de similarité (SIMPER), effectuées sur les données de pourcentage relatif. Cette méthode peut identifier les composés qui contribuent le plus à la variance entre les conditions testées. Les lipides membranaires ou les AG qui ont contribué de manière cumulative jusqu'à $> 80\%$ des différences ont été sélectionnés pour identifier les dissimilarités entre les conditions de culture. Les données sur le pourcentage relatif ont été transformées en logarithmes ($\log [x + 1]$) puis converties en une matrice de similarité de Bray-Curtis. Un test d'ANOSIM (analyse de similarité) a été utilisé pour tester la différence statistiquement globale en calculant un indice statistique R global basé sur les rangs des dissimilarités au sein et entre les groupes. Un indice R proche de 1 indique des différences entre les entités, alors qu'un indice de 0 représente l'hypothèse nulle. La significativité de l'indice est ensuite testée de façon aléatoire (Chapman et Underwood, 1999). Les analyses SIMPER et ANOSIM ont été réalisées à l'aide du logiciel R (Community Ecology Package, version 2,4-6) (Oksanen *et al.*, 2018).

Afin de résumer les réponses des trois espèces et de mettre en évidence les différences entre les réponses des espèces, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée à l'aide du logiciel R (Lê *et al.*, 2008).

PARTIE 3

Résultats et Discussion

Chapitre 1

Réponses physiologiques

III.1 REPONSES PHYSIOLOGIQUES DES MICROALGUES MARINES A UNE LIMITATION NUTRITIVE EN PHOSPHORE OU EN AZOTE

Dans ce chapitre, les réponses physiologiques de microalgues marines soumises à une limitation en P sont comparées à celles obtenues avec une limitation en N et une condition non limitante. Les résultats portent sur la croissance des 3 espèces microalgales étudiées, leurs teneurs en pigments et leur activité photosynthétique en fonction de la concentration en P et N dans les milieux de culture.

III.1.1 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la croissance des microalgues

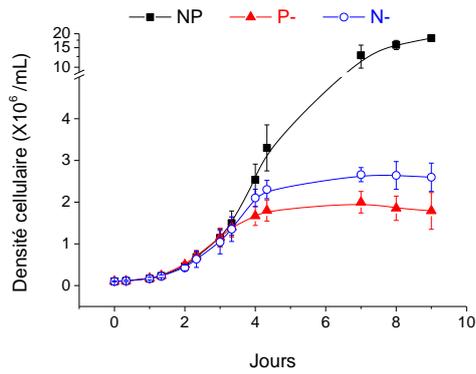
III.1.1.1 Taux de croissance

La croissance des trois microalgues cultivées en batch a été suivie pendant 9 ou 14 jours. L'évaluation du taux de croissance spécifique (μ) permet de définir les différentes phases de la croissance. Les cultures limitées en P (P-) et en N (N-) présentent des courbes de croissance similaires à celle des cultures témoins (NP) pendant la phase exponentielle ; les taux de croissance ont atteint leur valeur maximale au même moment. Cependant le taux de croissance diminue plus rapidement en condition de limitation par rapport à la condition témoin (Figure III-1-1).

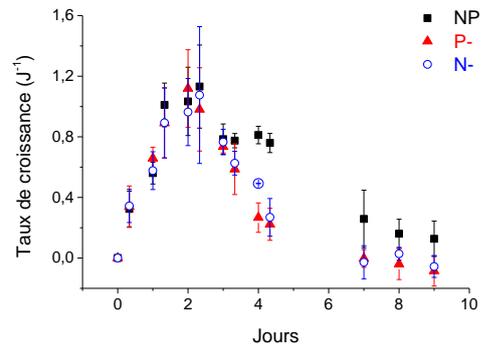
Chez *P. tricornutum*, les jours J2, J4 et J7 correspondent respectivement à la phase exponentielle qui est brève, le début de la phase stationnaire et la phase stationnaire avancée pour les cultures en condition de limitation. Tandis que les cultures NP maintiennent un taux de croissance relativement élevé, et entrent dans la phase stationnaire vers J7. La densité cellulaire maximale est significativement diminuée dans les cultures P- et N- (-90 % et -86 %, respectivement) par rapport au témoin.

Chez *T. lutea*, pour faciliter les échantillonnages, les jours J2, J4 (pour P-, et J3 pour N-) et J7 représentent respectivement la phase exponentielle qui est brève, le début de la phase stationnaire et la phase stationnaire avancée pour les cultures limitées en nutriments. Les cultures NP maintiennent leur taux de croissance et entrent dans la phase stationnaire vers J7. La densité cellulaire maximale diminue significativement dans les cultures P- et N- (-69 % et -83 %, respectivement) par rapport au témoin.

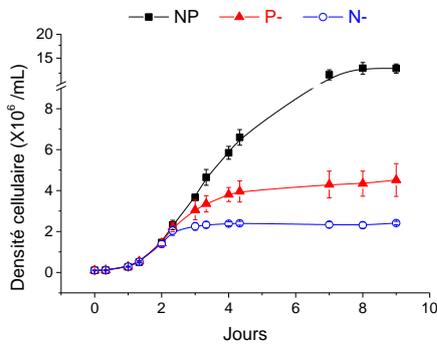
A-1

P. tricornutum

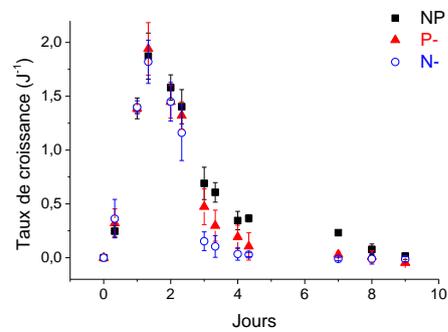
A-2

P. tricornutum

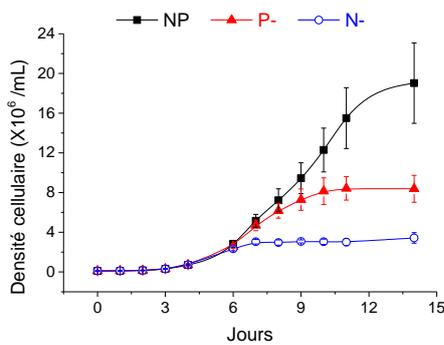
B-1

T. lutea

B-2

T. lutea

C-1

D. lutheri

C-2

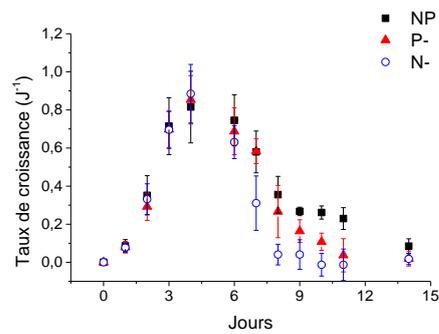
D. lutheri

Figure III-1-1 : Evolution de la densité cellulaire (10^6 mL^{-1}) et du taux de croissance spécifique (j^{-1}) des trois microalgues cultivées en batch en condition témoin non limitante (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Moyenne \pm S.D. ($n = 5-6$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Chez *D. lutheri*, la phase exponentielle se déroule à J4, la phase stationnaire a débuté principalement vers J10-11 pour les cultures P- et vers J8 pour les cultures N-, respectivement. Les cultures NP maintiennent leur taux de croissance et entrent en phase stationnaire jusqu'à la

fin d'expérience (J14). La densité cellulaire maximale diminue significativement dans les cultures P- et N- (-56 % et -84 %, respectivement) par rapport aux cultures NP.

La diminution de la densité cellulaire maximale est du même ordre de grandeur en condition de limitation en N pour les trois espèces de microalgues étudiées tandis que la limitation en P conduit à une baisse plus importante de la densité cellulaire maximale chez *P. tricornutum* comparativement à celle observée chez les Haptophytes. Ce résultat suggère que la croissance de *P. tricornutum* est plus sensible vis-à-vis de la limitation en P.

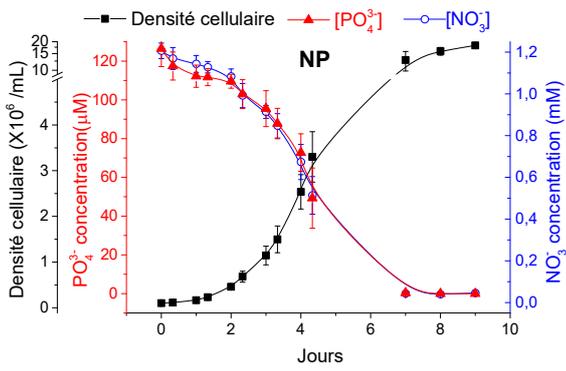
III.1.1.2 Eléments résiduels dans les milieux de culture

Les mesures des éléments résiduels (P et N) dans les milieux permettent de confirmer l'état de limitation des cultures. La concentration de l'élément limitant (P ou N) a diminué rapidement au cours de la croissance des microalgues. La privation d'un de ces éléments conduit à la diminution des taux de croissance. En revanche, l'élément non limitant est souvent demeuré disponible pendant toute la période de croissance (Figure III-1-2).

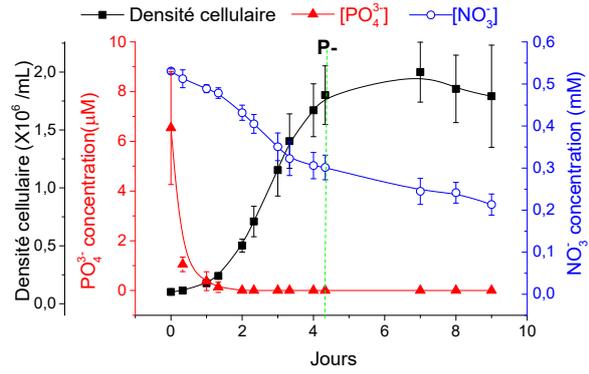
Chez *P. tricornutum*, pour les cultures P-, la concentration en PO_4^{3-} a atteint une valeur indétectable dès J1, soit 72 h avant l'entrée dans la phase stationnaire tandis que la concentration en NO_3^- dans les milieux a continué à diminuer mais est restée supérieure à 0,2 mM jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pour les cultures N-, la concentration en NO_3^- a atteint une valeur inférieure à la limite détectable vers J3, soit 32 h avant le début de la phase stationnaire. La concentration en PO_4^{3-} résiduelle a continué à diminuer mais est restée supérieure à 40 μM jusqu'à la fin de l'expérience. En ce qui concerne les cultures NP, la co-privation en PO_4^{3-} et en NO_3^- a été observée vers J7 (Figure III-1-2A).

Chez *T. lutea*, pour les cultures P-, la concentration en PO_4^{3-} a atteint une valeur indétectable vers J2, soit 48 h avant le début de la phase stationnaire. La concentration en NO_3^- continue de diminuer au cours de la phase stationnaire, jusqu'à devenir indétectable en fin de culture. Pour les cultures N-, NO_3^- a été épuisé vers J2, soit 24 h avant l'entrée en phase stationnaire. L'absorption de PO_4^{3-} a été quasiment arrêtée pendant la phase stationnaire, la concentration résiduelle en PO_4^{3-} est restée supérieure à 80 μM jusqu'à la fin de l'expérience. En ce qui concerne les cultures NP, la co-privation en PO_4^{3-} et en NO_3^- a été observée vers J7 (Figure III-1-2B).

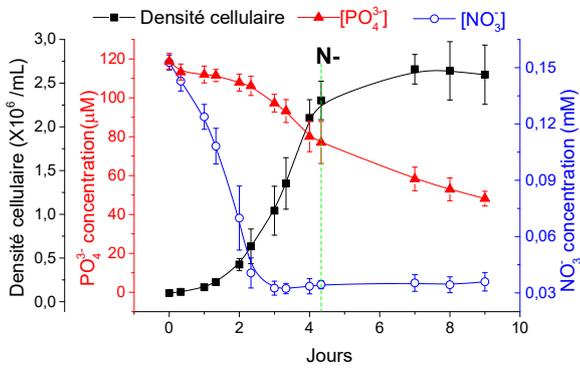
A-1

P. tricornutum

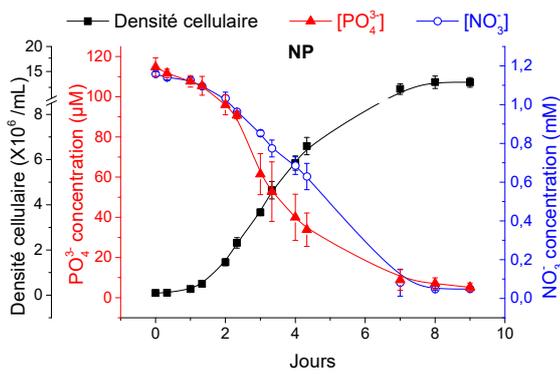
A-2

P. tricornutum

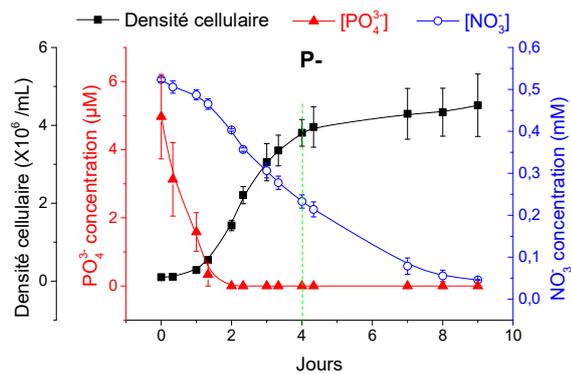
A-3

P. tricornutum

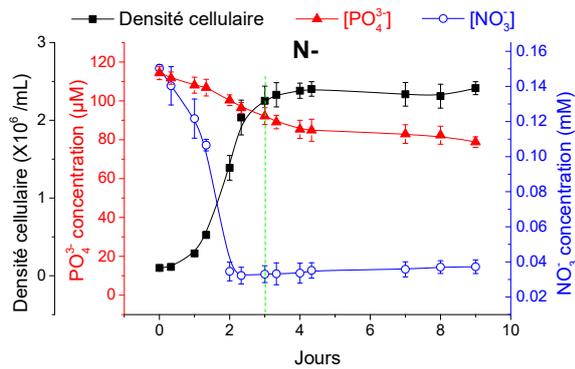
B-1

T. lutea

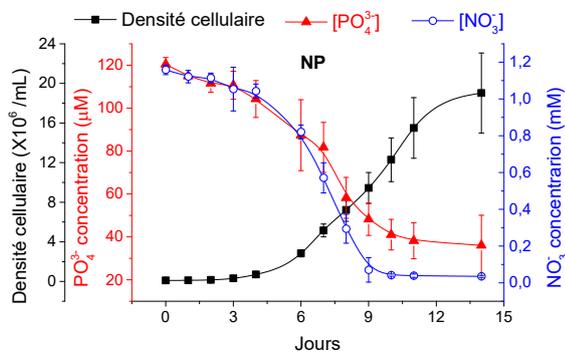
B-2

T. lutea

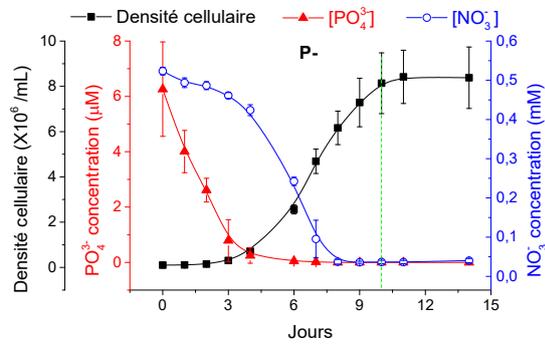
B-3

T. lutea

C-1

D. lutheri

C-2

D. lutheri

C-3

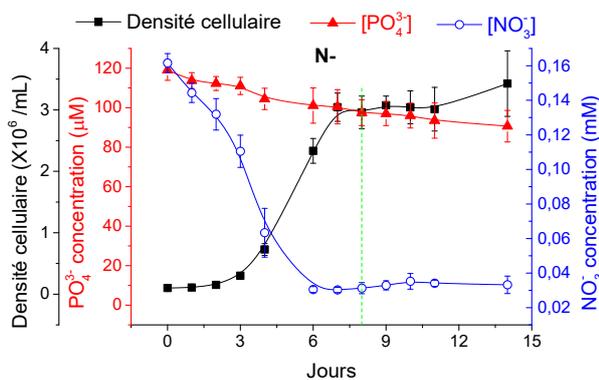
D. lutheri

Figure III-1-2 : Evolution des éléments résiduels PO_4^{3-} (μM) et NO_3^- (mM) dans les milieux de culture en batch en condition témoin (NP) et en condition de limitation en P (P-) ou en N (N-). Moyenne \pm S.D. (n = 5-6). Les lignes pointillées en vert indiquent le début de la phase stationnaire. (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Chez *D. lutheri*, pour les cultures P-, la concentration en PO_4^{3-} a atteint une valeur indétectable au bout de J4, environ 6 jours avant le début de la phase stationnaire. Cependant, la concentration en NO_3^- a continué à diminuer et est devenue inférieure à la limite de détection vers J8. Pour les cultures N-, NO_3^- a été épuisé vers J5-J6, environ 2-3 jours avant le début de la phase stationnaire, tandis que la concentration en PO_4^{3-} résiduelle a continué à diminuer avec un taux d'absorption très faible. En ce qui concerne les cultures NP, la privation de NO_3^- a été

observée vers J10, tandis que PO_4^{3-} est demeuré disponible. Les cultures NP ont évolué vers une limitation en N (Figure III-1-2C).

Pendant la phase stationnaire, les cultures P- ont continué à consommer NO_3^- disponible dans les milieux, mais de manière moins marquée chez *P. tricornutum*. Il pourrait s'agir d'une consommation de luxe pour N (Elrifi et Turpin, 1985). Lomas et Glibert (1999) ont montré que la réduction du NO_3^- peut, dans certaines conditions, contribuer à la dissipation de l'excès d'énergie. Cette hypothèse est en accord avec les faibles quotas de N rapportés au C (voir section III.1.1.3). Une partie de N réduit pourrait être libérée hors de la cellule sous forme de NO_2^- , NH_4^+ ou d'azote organique dissous (DON) (Lomas et Glibert, 1999).

Dans les cultures N-, une absorption de luxe de P a été observée chez *P. tricornutum*, elle pourrait être liée au stockage du P sous forme de polyP. Ce type de stockage pourrait aussi exister chez les Haptophytes (Skau *et al.*, 2017), mais il pourrait être très faible vu leur taux d'absorption.

III.1.1.3 Quotas cellulaires en P et N

Les concentrations de P et N particulières ont été mesurées au cours de la croissance des trois microalgues, elles ont ensuite été rapportées à la densité cellulaire pour calculer les quotas en P et en N (Figure III-1-3 et 4). Seules les évaluations des quotas en P dans les échantillons de *T. lutea* seront présentées, les valeurs obtenues pour les deux autres espèces étant inexploitable. Les quotas cellulaires en P et N ont augmenté pendant la phase de latence grâce à la forte absorption de P et de N dans les cellules placées au préalable dans de l'eau de mer non enrichie. Ensuite, les quotas cellulaires ont diminué à cause du taux de croissance élevé et de la raréfaction progressive des éléments dans le milieu. Les différences se sont accentuées après la phase exponentielle : la carence de N ou de P dans les milieux a conduit à un quota minimum dans les cellules, tandis que les éléments non limitants ont souvent été accumulés à cause de la croissance réduite et de l'absorption de luxe.

Tableau III-1-1 : Les quotas cellulaires en P (pg cellule⁻¹) et en N (pg cellule⁻¹) chez les microalgues cultivées en batch au début de la phase stationnaire. Moyenne \pm S.D. (n = 5-6).

	<i>P. tricornutum</i>		<i>T. lutea</i>		<i>D. lutheri</i>	
	P-	N-	P-	N-	P-	N-
Quota en P (pg/cellule)*	0,08 \pm 0,01	0,52 \pm 0,04	0,03 \pm 0,00	0,30 \pm 0,04	0,01 \pm 0,00	0,23 \pm 0,04
Quota en N (pg/cellule)	1,70 \pm 0,11	0,76 \pm 0,06	1,19 \pm 0,12	0,81 \pm 0,03	0,74 \pm 0,13	0,66 \pm 0,12

*Estimation approximative à partir du dosage des éléments résiduels dans les milieux.

Les quotas cellulaires en P (estimation approximative à partir du dosage des éléments résiduels au début de la phase stationnaire) sont plus faibles chez les Haptophytes que chez *P. tricornutum* (Tableau III-1-1). Ce faible quota cellulaire en P chez les Haptophytes est probablement lié à la composition lipidique puisqu'elles possèdent peu de PL constitutifs (voir chapitre 3). Les Haptophytes, notamment *D. lutheri*, nécessiteraient moins de P que *P. tricornutum*.

Il faut noter que les quotas cellulaires en P dosés par la méthode d'oxydation humide (Figure III-1-3A) sont inférieurs à ceux estimés à partir du dosage des éléments résiduels dans les milieux N- (Tableau III-1-1). Cette sous-estimation est probablement due au stockage de polyP au niveau cellulaire non détectés par la méthode d'oxydation humide.

Les quotas cellulaires en N sont similaires en condition de limitation en N pour les trois espèces de microalgues étudiées dès le début de la phase stationnaire. Pour les cultures P-, chez *D. lutheri*, le quota cellulaire en N est fortement réduit et est du même ordre de grandeur que celui des cellules N- (Figure III-1-4C-1; Tableau III-1-1). Comme NO_3^- a été épuisé avant l'entrée en phase stationnaire (Figure III-1-2C-2) chez *D. lutheri*, la phase stationnaire des cultures P- pourrait être due à une limitation en P et une limitation en N.

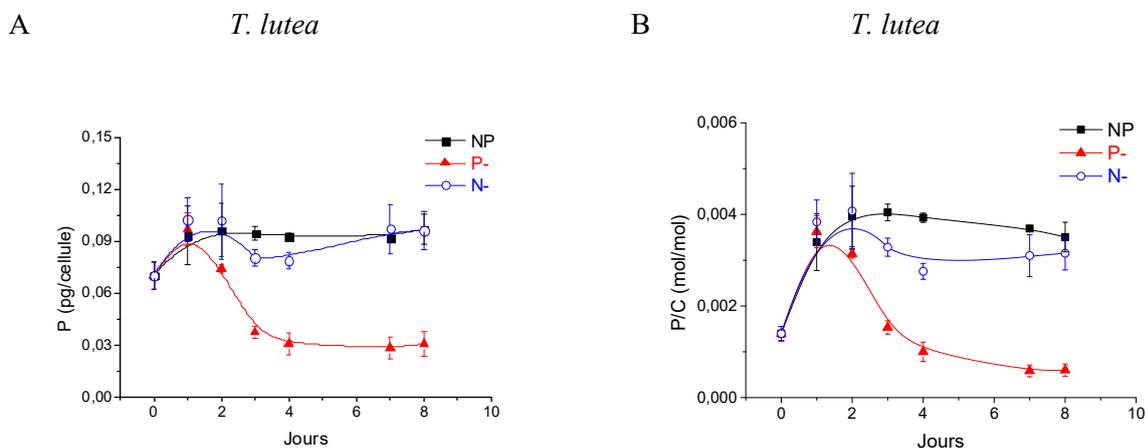


Figure III-1-3 : Evolution du quota cellulaire en P (pg cellule^{-1}) (A) et du quota rapporté au C (mol/mol) (B) chez *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Moyenne \pm S.D. (n = 3).

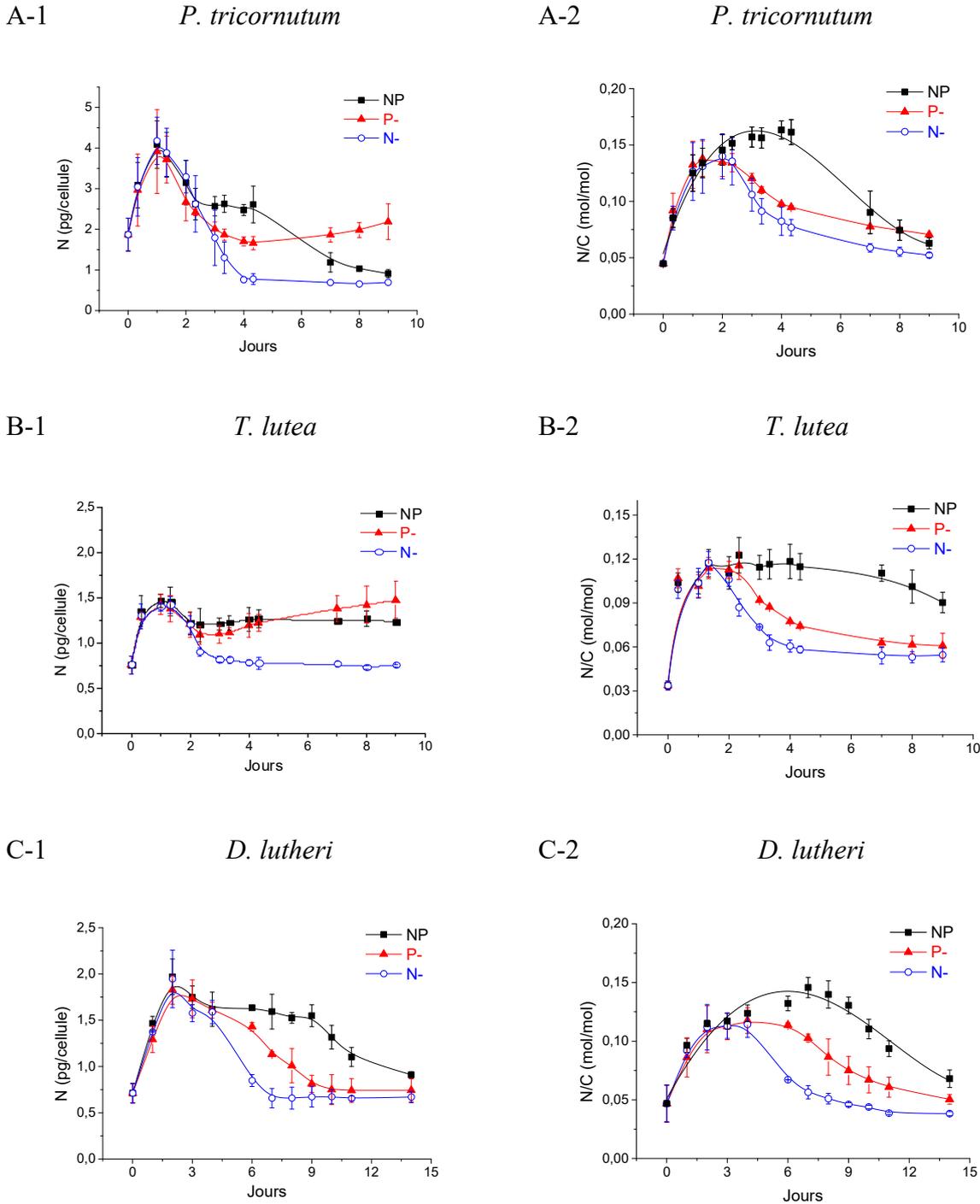


Figure III-1-4 : Evolution du quota cellulaire en N (pg cellule⁻¹) et du quota rapporté au C (mol/mol) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Moyenne \pm S.D. (n = 3). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Les quotas de P et de N rapportés à la cellule peuvent être influencés par des changements substantiels du volume cellulaire. Pour faire abstraction de ces variations de volume, les quotas ont été exprimés en fonction du C cellulaire. Les quotas de P et de N rapportés au C reflètent ainsi la disponibilité de ces éléments dans les cellules.

Selon le modèle de Droop (Droop, 1973), le taux de croissance des microalgues est une fonction hyperbolique du quota interne de l'élément limitant. Dans ce travail, l'élément limitant peut être P ou N. Effectivement, les quotas de P et de N rapportés au C augmentent pendant la phase exponentielle et supportent une hausse du taux de croissance. Suite à l'épuisement de l'élément limitant dans le milieu, le quota de ce même élément rapporté au C est aussi fortement réduit, ce qui entraîne la chute du taux de croissance. Le quota limitant atteint sa valeur minimale pendant la phase stationnaire. Chez *T. lutea*, pour laquelle nous disposons des évolutions des quotas de P et N rapportés au C, un comportement différent du quota de l'élément non limitant est observé, selon la nature de l'élément limitant (P ou N) (Figure III-1-3B et Figure III-1-4B-2).

Dans les cultures P-, chez les trois espèces, le quota non limitant de N rapporté au C est aussi fortement réduit et suit la même évolution que celui dans les cultures N-. Ce résultat suggère un plus grand déséquilibre entre l'assimilation de N et l'accumulation de C. L'absorption active de N nécessite de l'ATP, et son assimilation une réduction des nitrates. La diminution de l'assimilation de N pourrait être due à une compétition pour l'utilisation de ATP et de pouvoir réducteur phosphoré tel que NADPH (Bougaran *et al.*, 2010; Rhee, 1974; Terry, 1982). Par conséquent, la disponibilité en N est aussi diminuée dans les cellules, ce qui pourrait entraîner des réponses secondaires similaires à celles observées lors d'une limitation en N chez les cultures P-.

Il faut noter qu'au début de la phase stationnaire, la limitation en P conduit à un quota N/C légèrement supérieur à celui obtenu avec la limitation en N chez *P. tricornutum* ($0,11 \pm 0,002$ vs. $0,09 \pm 0,008$) et chez *T. lutea* ($0,09 \pm 0,001$ vs. $0,07 \pm 0,006$), tandis que chez *D. lutheri*, aucune différence significative n'est observée entre les 2 conditions limitantes ($0,07 \pm 0,01$ vs. $0,06 \pm 0,005$). Ces résultats sont en accord avec l'état de limitation en P et en N.

Au contraire, l'assimilation du P chez *T. lutea* est moins affectée par la limitation en N. Une diminution transitoire du quota de P/C a été observée dès la fin de la phase exponentielle dans les cultures N-, ce qui suggère une diminution de l'assimilation de P. Tandis que les cellules ont tendance à rétablir l'équilibre entre l'assimilation de P et l'accumulation de C dans la biomasse, le quota de P rapportée au C est demeuré relativement stable jusqu'à la fin de l'expérience (Figure III-1-3B). Les résultats sont en accord avec des études antérieures (Galbraith et Martiny, 2015).

III.1.1.4 Quota cellulaire de carbone

Le quota cellulaire de C diminue pendant la phase exponentielle à cause de la division cellulaire intense. Puis il augmente chez les trois espèces lorsque la croissance ralentit. L'accumulation de C n'évolue pas de la même façon selon le type de limitation et l'espèce microalgale (Figure III-1-5).

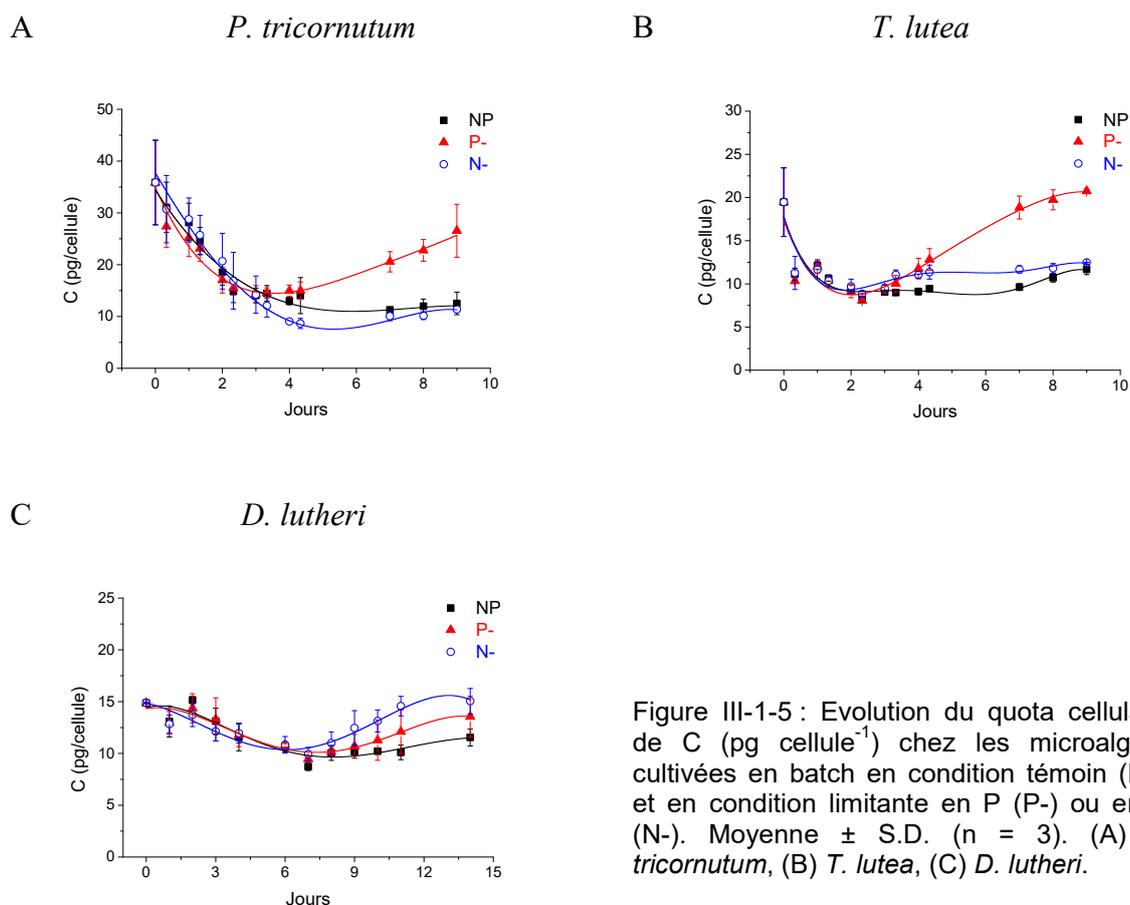


Figure III-1-5 : Evolution du quota cellulaire de C (pg cellule^{-1}) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Chez *P. tricornutum*, la limitation en P ralentit le taux de croissance et maintient le quota cellulaire de C (J2-J4) par rapport au témoin. Par contre, la limitation en N favorise la baisse du quota cellulaire de C jusqu'à l'arrêt complet de la croissance. Une différence significative du quota cellulaire de C est obtenue entre les conditions P- et N- dès J4. Puis cette différence s'est accentuée, le quota cellulaire de C est environ 2 fois plus élevé pour les cultures P- que pour les cultures N- vers J7, en phase stationnaire. Ces résultats corroborent des études antérieures (Alipanah *et al.*, 2018; Chauton *et al.*, 2013).

Chez *T. lutea*, le quota cellulaire de C a augmenté progressivement après la phase exponentielle dans les cultures P- alors que cette accumulation de C est fortement réduite dans les cultures N- dès qu'il y a une carence sévère.

Chez *D. lutheri*, après une diminution modérée du quota cellulaire de C pendant la phase exponentielle, une augmentation progressive de celui-ci est observée au cours de la phase stationnaire dans les 2 conditions de limitation. La faible accumulation de C dans les cultures P- pourrait être due à la croissance continue. Cependant, il faut noter qu'aucune différence significative n'est observée entre les 2 conditions limitantes au début de la phase stationnaire (J11 en P- vs. J8 en N-).

La limitation en P favorise l'accumulation du C cellulaire chez *P. tricornutum* et *T. lutea* tandis que chez *D. lutheri* celle-ci n'a aucun effet supplémentaire sur l'accumulation du C cellulaire par rapport à la seule limitation en N. Ce résultat indique que la limitation en P joue en rôle mineur dans l'accumulation du C cellulaire chez *D. lutheri*. L'accumulation du C cellulaire, notamment pendant la phase stationnaire, est fortement liée à l'intensité photosynthétique nette à l'échelle cellulaire dont certains aspects seront abordés dans les sections suivantes.

Par ailleurs, Theodorou *et al.* (1991) ont souligné une augmentation de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) chez l'algue verte *Selenastrum minutum* en condition de limitation en P. Ils ont indiqué une stimulation de la fixation du C par la voie « C4 », c'est-à-dire *via* la formation d'un composé à 4 carbones, tel que l'oxaloacétate (OAA).

III.1.1.5 Volumes cellulaires

Chez *P. tricornutum*, la limitation en P tend à augmenter le volume des cellules de 15 % à J7, tandis que la limitation en N le réduit d'environ 13 %. Le volume des cellules dans le milieu témoin NP a tendance à être plus réduit vers J7, partiellement à cause de l'apparition de la limitation en N.

De même chez *T. lutea*, le volume cellulaire augmente de presque 2 fois dans les cultures P- dès qu'il y a une carence sévère (J4 à J7) tandis qu'il reste inchangé sous condition N limitant. Le volume des cellules dans le milieu témoin NP a tendance à être plus réduit, probablement à cause de la croissance élevé.

Chez *D. lutheri*, le volume des cellules diminue de J4 à J7 compte tenu du taux de croissance élevé, puis augmente à nouveau à J11 dans les trois conditions de culture. Les cellules

N- ont tendance à avoir un volume plus élevé, ce qui pourrait être simplement dû à la durée plus longue de la phase stationnaire.

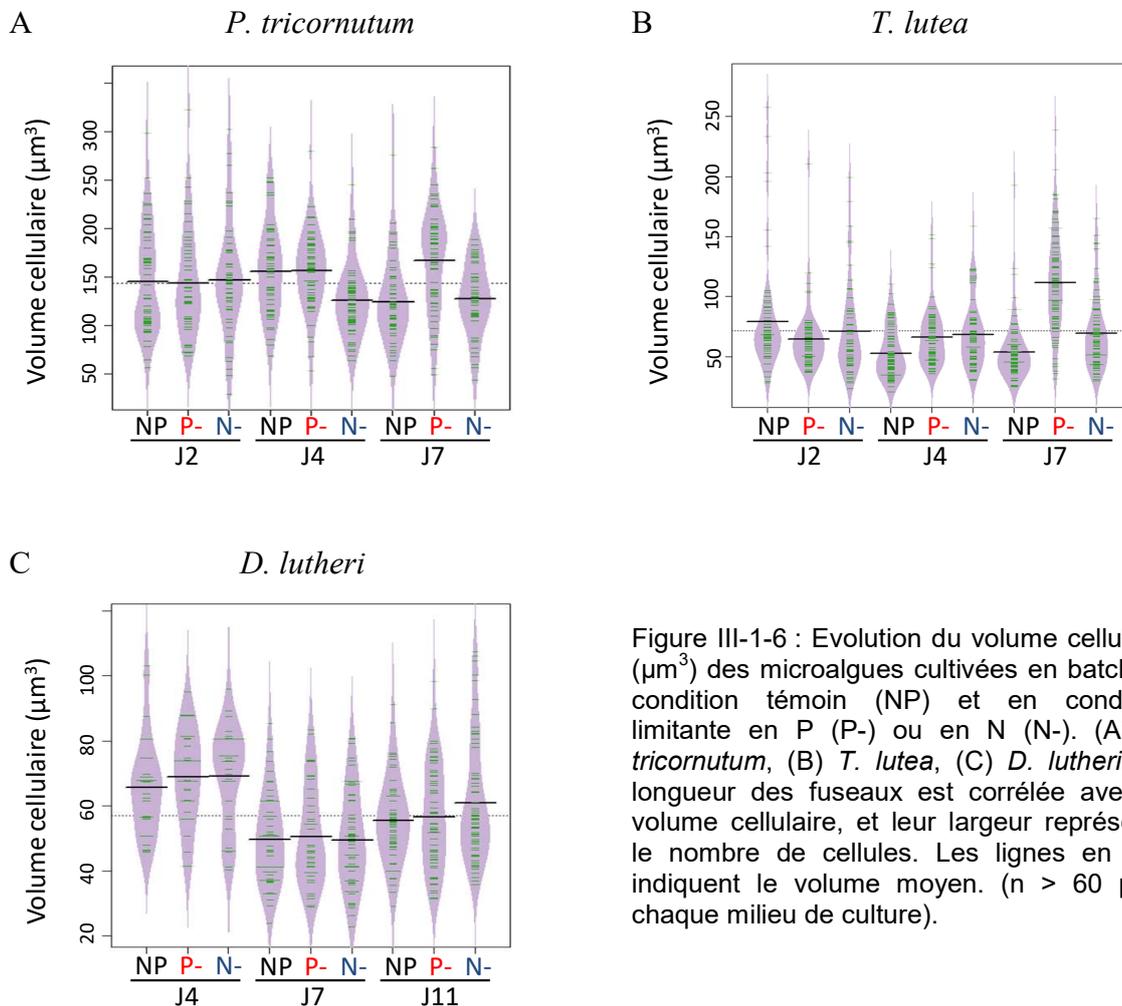


Figure III-1-6 : Evolution du volume cellulaire (μm^3) des microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*. La longueur des fuseaux est corrélée avec le volume cellulaire, et leur largeur représente le nombre de cellules. Les lignes en noir indiquent le volume moyen. ($n > 60$ pour chaque milieu de culture).

Selon des études antérieures, une carence en P conduit souvent à une augmentation du volume cellulaire (Li *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2011; Mühlroth *et al.*, 2017; Shemi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014), un volume plus grand favorise l'absorption des éléments en diminuant le rapport entre la surface et le volume (Shemi *et al.*, 2016). L'augmentation du volume cellulaire suggère que les cellules continuent à croître après l'arrêt du cycle cellulaire.

Il est à remarquer que les variations du volume cellulaire sont corrélées avec l'évolution des quotas cellulaires de C.

III.1.2 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la photosynthèse

III.1.2.1 Teneur en pigments

Les pigments majeurs chez les trois microalgues étudiées sont les chlorophylles *a* et *c*, ainsi que la fucoxanthine (Heydarizadeh *et al.*, 2013); leurs teneurs ont été déterminées quotidiennement. Les teneurs en pigments ont suivi une même tendance pour les trois conditions de culture pendant la phase exponentielle, des différences sont apparues lors du début de la phase stationnaire.

La chlorophylle (Chl) est un pool de N cellulaire important. Les teneurs en Chl sont fortement diminuées dès l'apparition de la limitation en N (Figure III-1-7 et 8). Ces résultats corroborent des études antérieures (Alipanah *et al.*, 2015; Garnier *et al.*, 2014; Geider *et al.*, 1993). Ces auteurs ont signalé une diminution des protéines impliquées dans la biosynthèse des pigments lors d'une privation en N, un tel déclin est susceptible d'affecter directement le nombre d'unité de photosystème, l'efficacité photosynthétique et la productivité des cellules.

En revanche, les teneurs en Chl sont moins affectées par la limitation en P (Figure III-1-7 et 8), bien que ces teneurs rapportées au C aient tendance à diminuer notamment pendant la phase stationnaire. Ceci pourrait être dû à une compétition vis-à-vis de l'utilisation de l'ATP et du NADPH qui sont nécessaires à la synthèse de la Chl (Roopnarain *et al.*, 2014). À l'échelle cellulaire, les teneurs en Chl ne sont pas abaissées en condition P- chez *P. tricornutum* et *T. lutea* (données non présentées), ce qui suggère que le nombre d'unités de PSI et PSII est maintenu. Chez *D. lutheri*, les teneurs en Chl diminuent dès la privation de NO_3^- dans les cultures P-, mais se maintiennent à un niveau plus élevé par rapport aux cultures N-. La limitation en P semble limiter la dégradation massive des Chl, suggérant une réduction du recyclage de N cellulaire. Cela pourrait être dû à la diminution du besoin en N pour soutenir le métabolisme cellulaire en condition de carence en P.

Aucun changement significatif du rapport Chl *c* / Chl *a* n'a été détecté chez *P. tricornutum* et *D. lutheri*, bien que ce rapport ait tendance à augmenter dans les deux conditions de limitation nutritive (Figure III-1-9). Chez *T. lutea*, le rapport Chl *c* / Chl *a* est plus élevé pendant la phase stationnaire dans les cultures N-. Cette augmentation du rapport Chl *c* / Chl *a* est probablement liée à la modification de la taille des antennes collectrices (Nguyen-Deroche *et al.*, 2012). Ainsi, l'augmentation de la taille de ces antennes en condition de limitation en N pourrait partiellement compenser la diminution du nombre d'unités des photosystèmes.

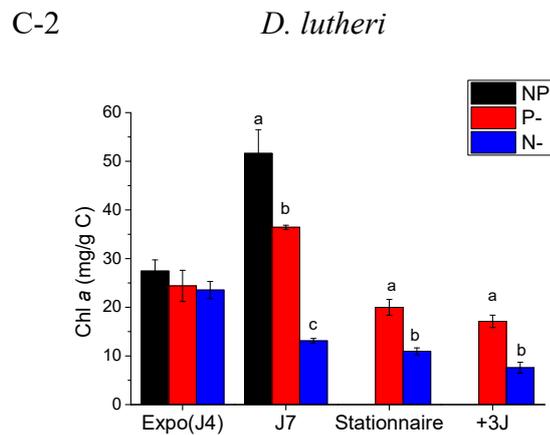
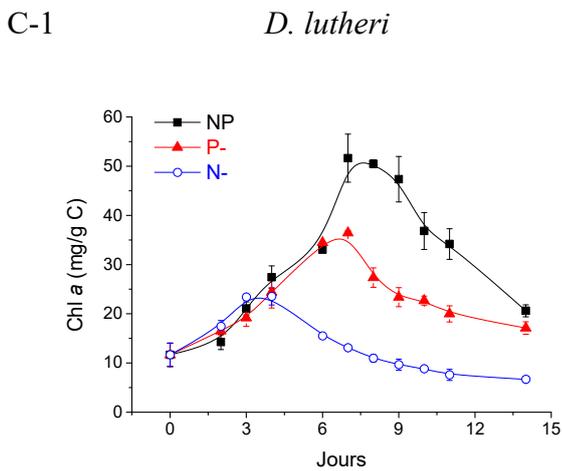
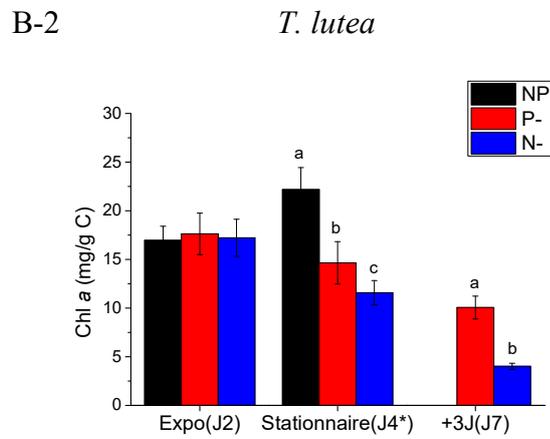
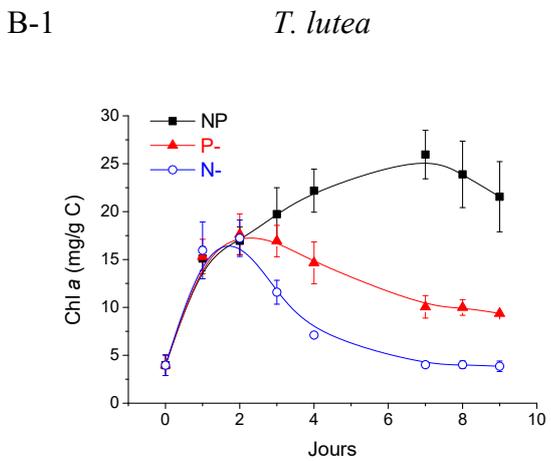
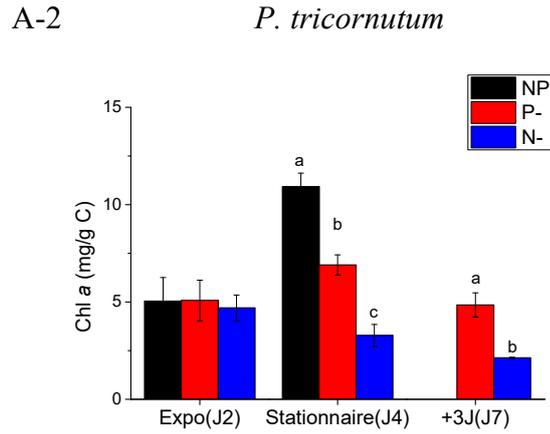
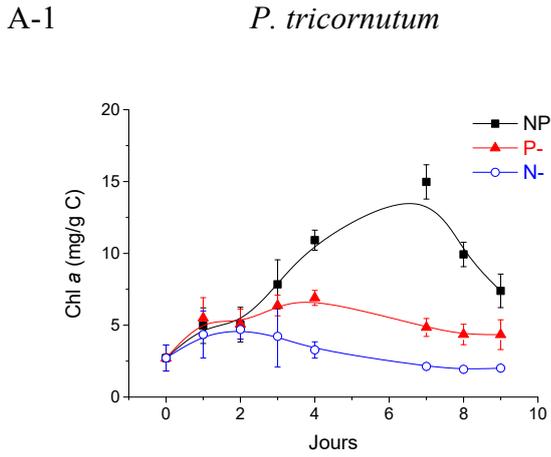


Figure III-1-7 : Evolution de la teneur en Chl a rapportée au C (mg/g C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

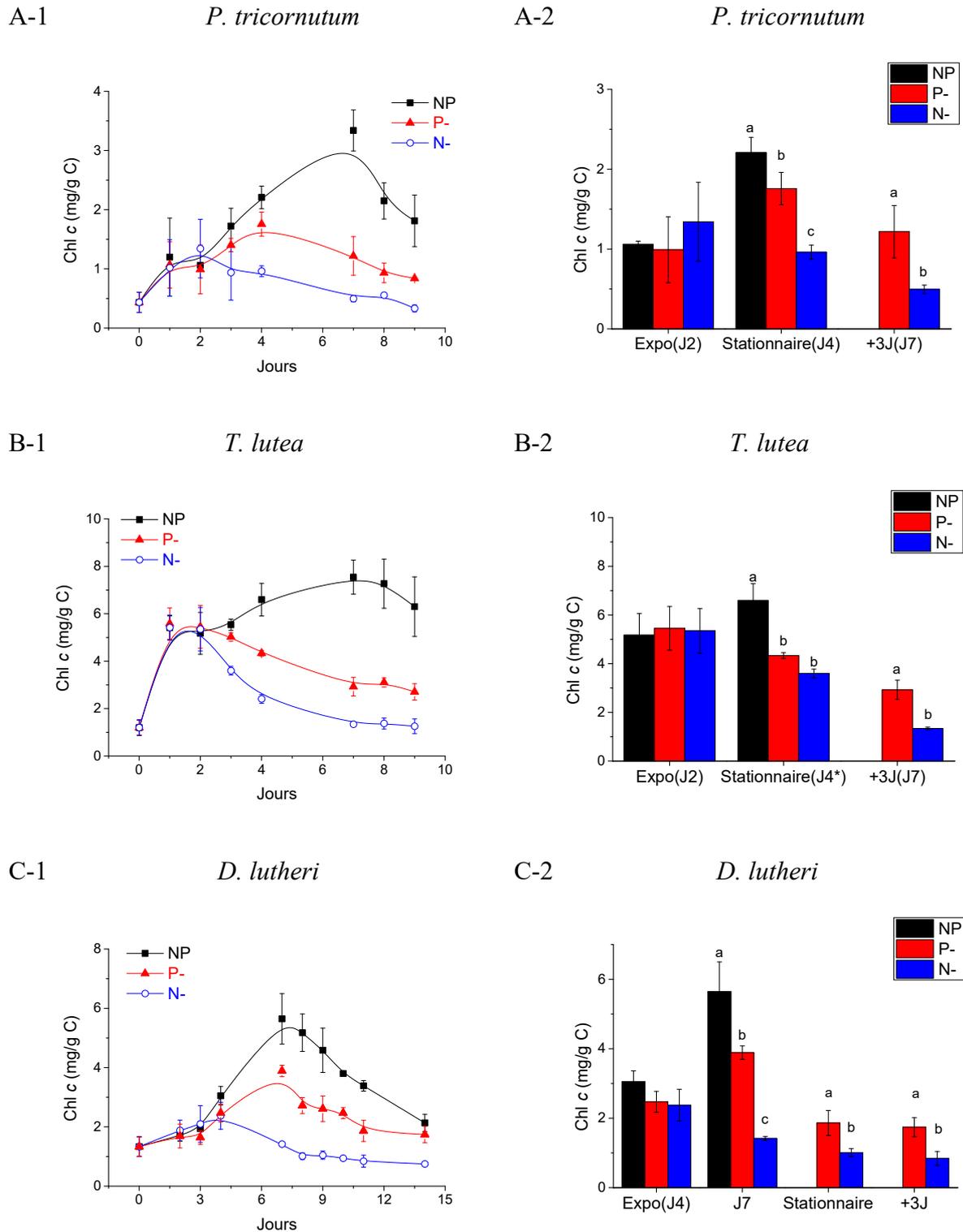


Figure III-1-8 : Evolution de la teneur en Chl c rapportée au C (mg/g C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

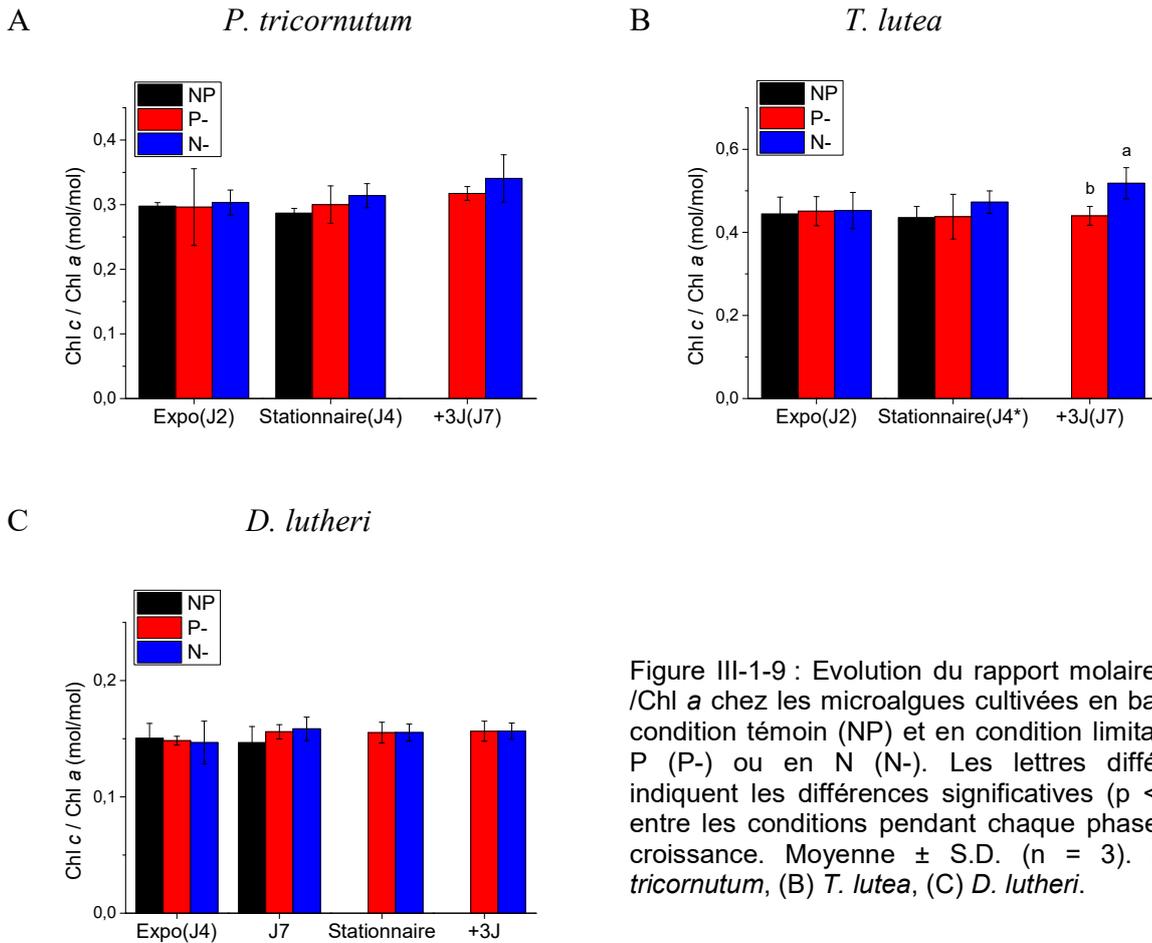


Figure III-1-9 : Evolution du rapport molaire Chl c /Chl a chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

En ce qui concerne le pigment non-azoté, la fucoxanthine, caroténoïde majeur chez les trois espèces étudiées, sa teneur rapportée au C suit la même tendance que celle des Chl, en particulier chez *P. tricornutum* et *D. lutheri* (Figure III-1-10), suggérant une biosynthèse coordonnée de ces deux pigments (Alipanah *et al.*, 2018; Geider *et al.*, 1993). Chez *T. lutea*, en revanche, la teneur en fucoxanthine rapportée au C est beaucoup moins affectée, surtout en condition de limitation en N.

La fucoxanthine peut servir d'antioxydant et ainsi jouer un rôle d'atténuateur (quencher) direct de la Chl *a* dans l'état triplet (Di Valentin *et al.*, 2012; Young et Britton, 1990). Une augmentation progressive du rapport fucoxanthine / Chl *a* est observée dans les deux conditions de limitation nutritive, en particulier dans le cas de la privation en N chez *T. lutea* (Figure III-1-11). La hausse du rapport fucoxanthine / Chl *a* prévient et réduit les dommages oxydatifs potentiels de la machinerie photosynthétique, et constitue un moyen de défense vis à vis d'un stress oxydant.

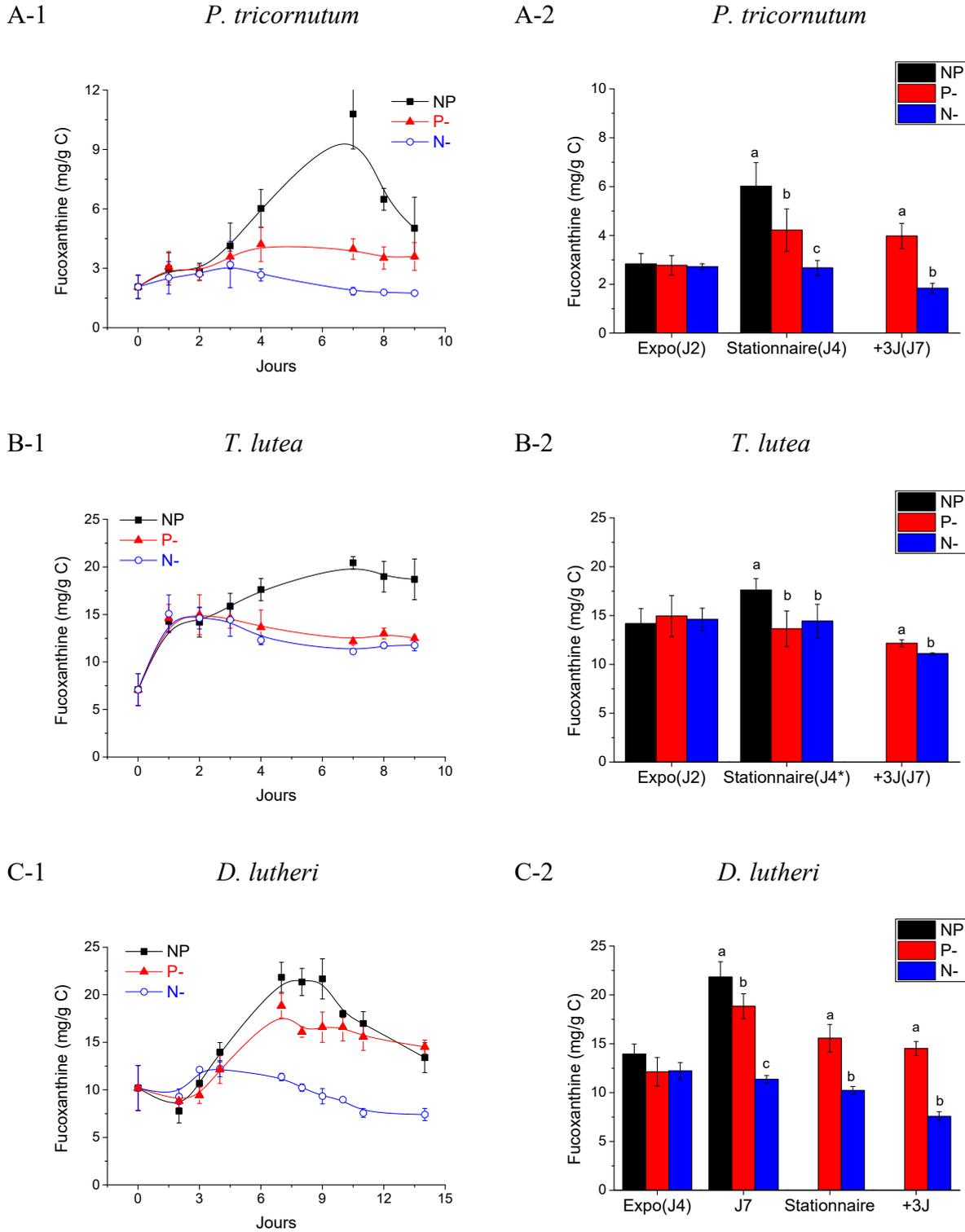


Figure III-1-10 : Evolution de la teneur en fucoxanthine rapportée au C (mg/g C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

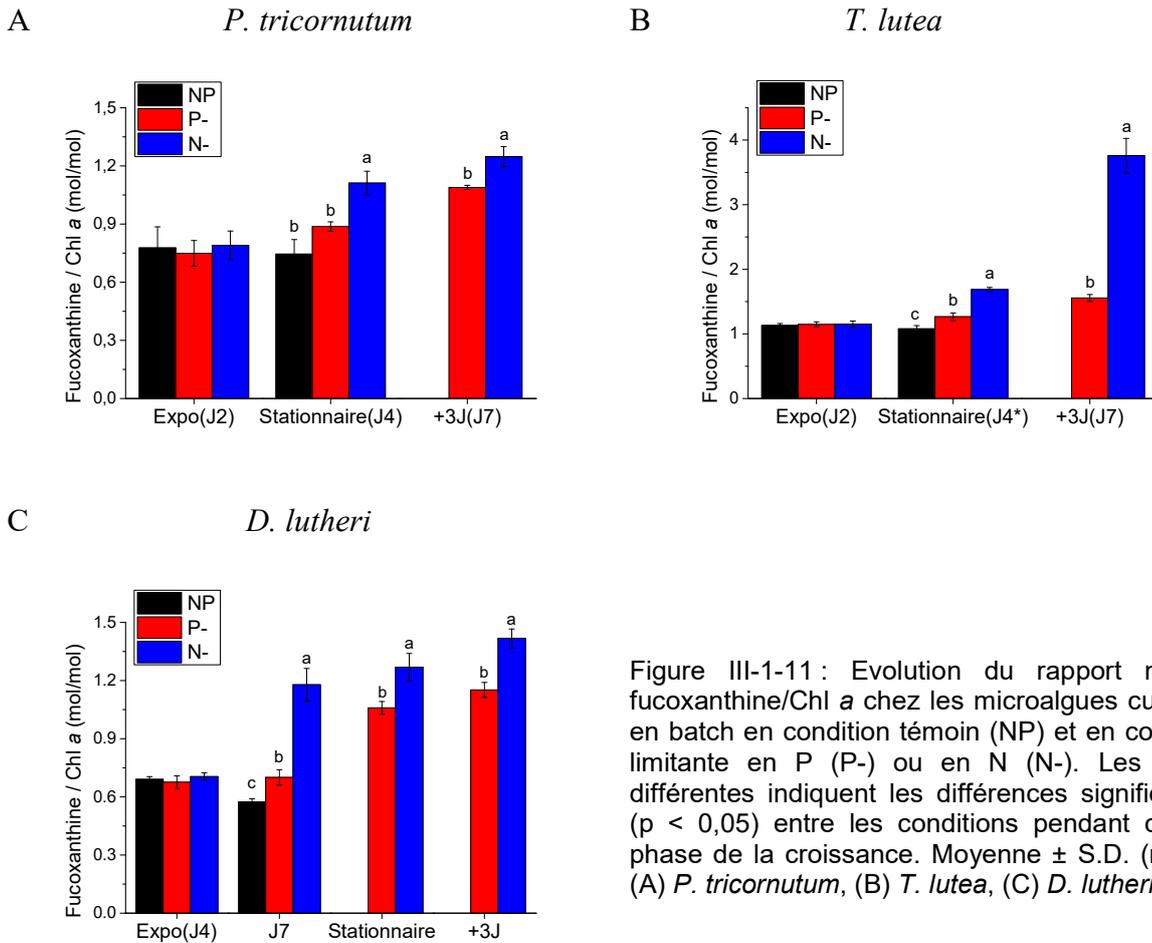


Figure III-1-11 : Evolution du rapport molaire fucoxanthine/Chl a chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Il faut noter que la teneur en fucoxanthine mesurée ici n'est qu'une estimation approximative à partir des teneurs en caroténoïdes totaux. Un rapport fucoxanthine / Chl a indépendant de la limitation nutritive a été observé dans les études antérieures chez la souche Pt1 de *Phaeodactylum* (Alipanah *et al.*, 2018, 2015; Geider *et al.*, 1993). Cependant, dans des cultures de *Thalassiosira weissflogii* limitées en P, ce rapport a fortement diminué (Liu *et al.*, 2011), suggérant une variabilité interspécifique de la régulation des pigments en réponse aux nutriments (Geider *et al.*, 1993).

Par ailleurs, les teneurs en pigments élevées dans les cultures NP denses sont probablement dues à une limitation en lumière à cause de l'auto-ombrage (Beale et Appleman, 1971; Geider, 1987).

III.1.2.2 Paramètres de la fluorescence de la chlorophylle *a*

Les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne ont été déterminés quotidiennement. Différents paramètres de la fluorescence sont directement liés à l'activité photochimique et non photochimique, ils nous permettent de caractériser l'impact d'une limitation nutritive sur l'activité des PSII et sur la capacité à dissiper l'excès d'énergie lumineuse absorbée par les microalgues. Différents paramètres ont été calculés, il s'agit du rendement quantique maximum de la photochimie du PSII (Φ_{P0}), du rendement quantique opérationnel du PSII (Φ_{II}), du quenching photochimique (qP), et du quenching non photochimique (qN, NPQ). Chaque paramètre est discuté séparément ci-dessous.

III.1.2.2.1 Rendement quantique maximum de la photochimie du PS II (Φ_{P0})

Le paramètre Φ_{P0} quantifie la capacité photochimique maximum du PSII (Roháček *et al.*, 2008), c'est-à-dire la capacité maximale à « extraire » les électrons des molécules d'eau. C'est un mécanisme enzymatique fortement lié à la conformation et la composition des membranes thylacoïdales. Il est donc sensible au stress ou à d'autres dommages (Parkhill *et al.*, 2001). Φ_{P0} atteint son maximum pendant la phase exponentielle, puis il diminue en condition de limitation nutritive (Figure III-1-12).

Chez *P. tricornutum*, Φ_{P0} est sensiblement réduit en condition de limitation en P ou en N, indiquant une baisse de la capacité photosynthétique. Il n'y a pas de différence significative entre les deux types de limitation. Des résultats similaires ont également été obtenus dans des études antérieures (Abida *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2013). Alipanah *et al.* (2018) ont observé une diminution de Φ_{P0} dès 48 h en condition limitante P-.

Un comportement analogue est observé chez *D. lutheri*, aucune différence significative n'a été observée dès que les cellules sont entrées en phase stationnaire.

En revanche chez *T. lutea*, Φ_{P0} est beaucoup moins affecté en condition de limitation en P par rapport à la condition N-. Ce qui suggère une meilleure adaptation et moins de dommages produits, notamment au niveau des chloroplastes au cours de la limitation en P chez cette espèce.

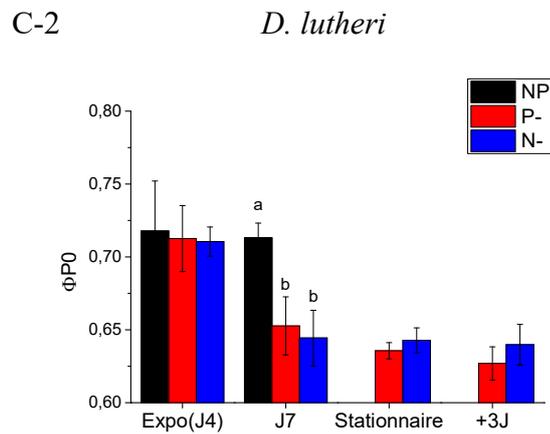
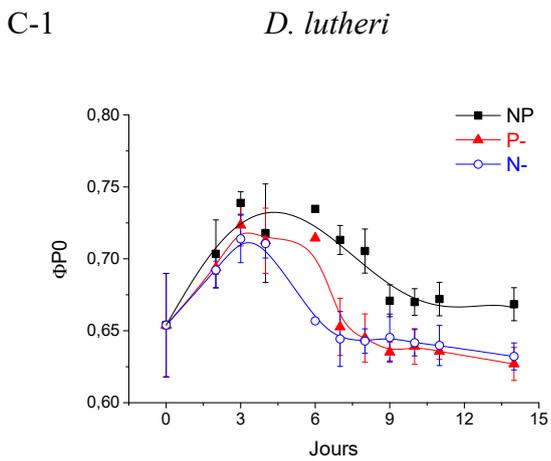
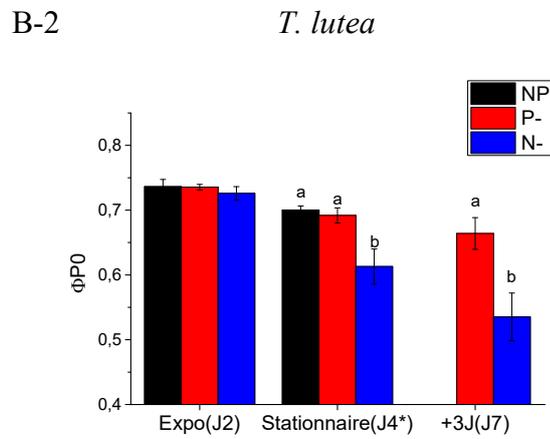
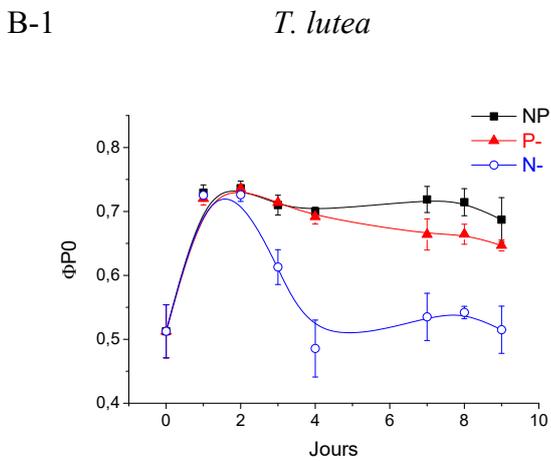
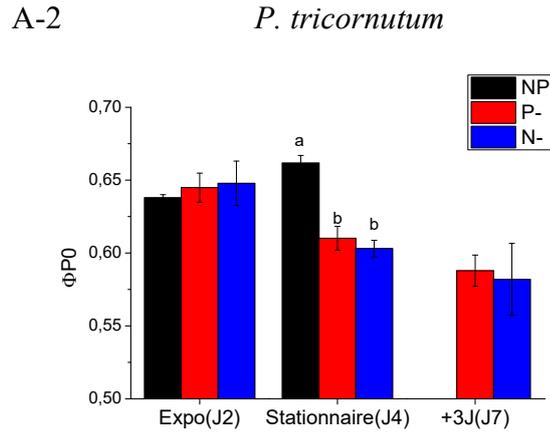
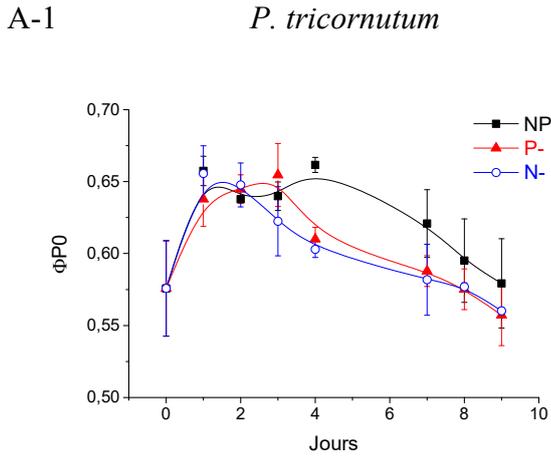
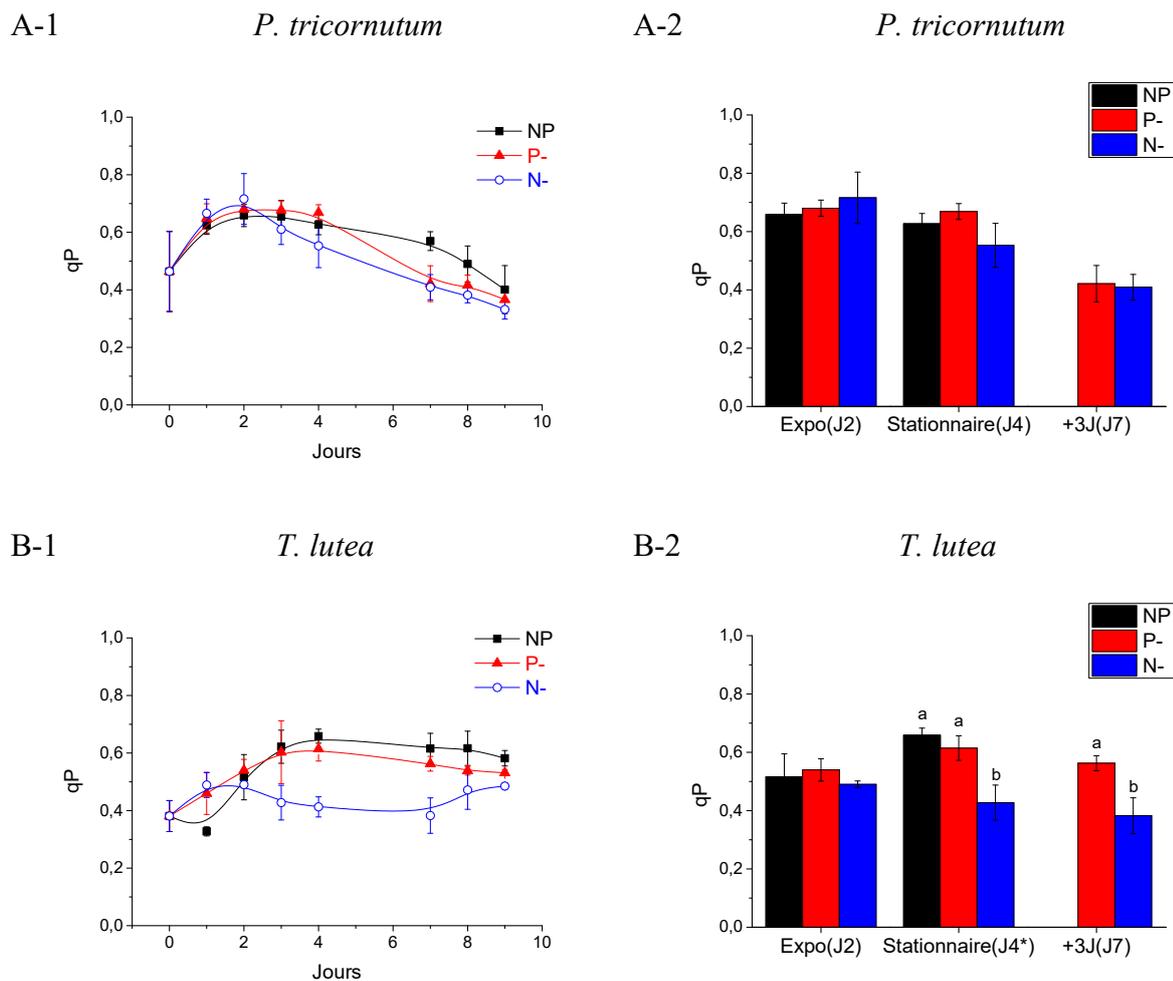


Figure III-1-12 : Evolution du rendement quantique maximum de la photochimie du PS II (Φ_{P0}) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) ou en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

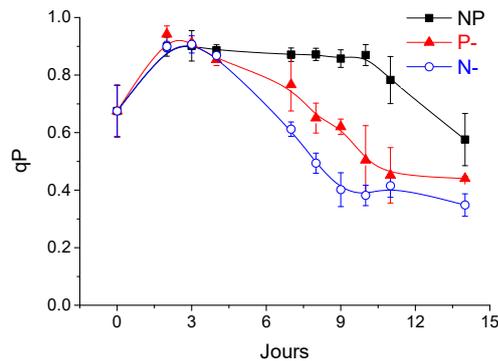
III.1.2.2.2 Quenching photochimique (qP)

Le quenching photochimique qP représente la capacité photochimique du PSII à l'issue de 7 à 14 minutes d'éclairement actinique selon les espèces. Il est directement lié au nombre de centres ouverts (Q_A sous forme oxydé) car ceux-ci sont susceptibles d'utiliser les électrons émis par la Chl *a* (Roháček *et al.*, 2008). Chez les trois espèces, qP augmente pendant la phase exponentielle, puis diminue lors de l'apparition de la carence nutritive (Figure III-1-13).

Aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs obtenues lors des deux types de limitation chez *P. tricornutum* et *D. lutheri* dès que les cellules sont en phase stationnaire. Chez *T. lutea*, qP est moins affecté par la limitation en P que par la limitation en N. Le maintien de qP signifie que les cellules conservent une concentration importante de centres ouverts, prêts à accepter les électrons. En fin d'expérimentation (J9), les qP mesurés en condition de limitation en N ont tendance à augmenter. Cette augmentation est probablement liée à la hausse de la taille des antennes collectrices.



C-1

D. lutheri

C-2

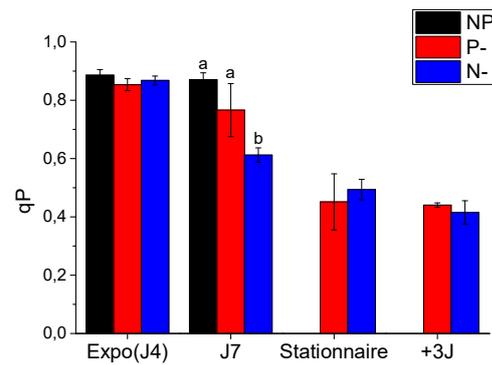
D. lutheri

Figure III-1-13 : Evolution du quenching photochimique (qP) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

III.1.2.2.3 Rendement quantique effectif du PS II (Φ_{II})

Le paramètre Φ_{II} représente l'efficacité photochimique des centres réactionnels effectivement ouverts au niveau du PSII à l'issue de la phase l'acclimatation à la lumière. Il quantifie l'efficacité du transport des électrons (non cyclique) (Roháček *et al.*, 2008). Φ_{II} augmente pendant la phase exponentielle, puis il diminue pendant la phase stationnaire (Figure III-1-14).

Chez *P. tricornutum* et *D. lutheri*, la carence en P conduit à une baisse de Φ_{II} plus importante qu'en condition N-. Les résultats indiquent un ralentissement du transport des électrons en condition P-, comme signalé par Chylla et Whitmarsh (1989) et Wykoff *et al.* (1998). Le P est nécessaire à la synthèse et à la reconstitution de l'ATP afin de maintenir le transport des électrons photosynthétiques et le cycle de Calvin (Flügge *et al.*, 2003).

Chez *T. lutea*, la limitation en P a tendance à réduire Φ_{II} mais il demeure plus élevé qu'en condition N-. Ceci est probablement dû à la concentration des centres ouverts (qP) plus élevée et au maintien de la capacité photochimique maximum du PSII (Φ_{p0}).

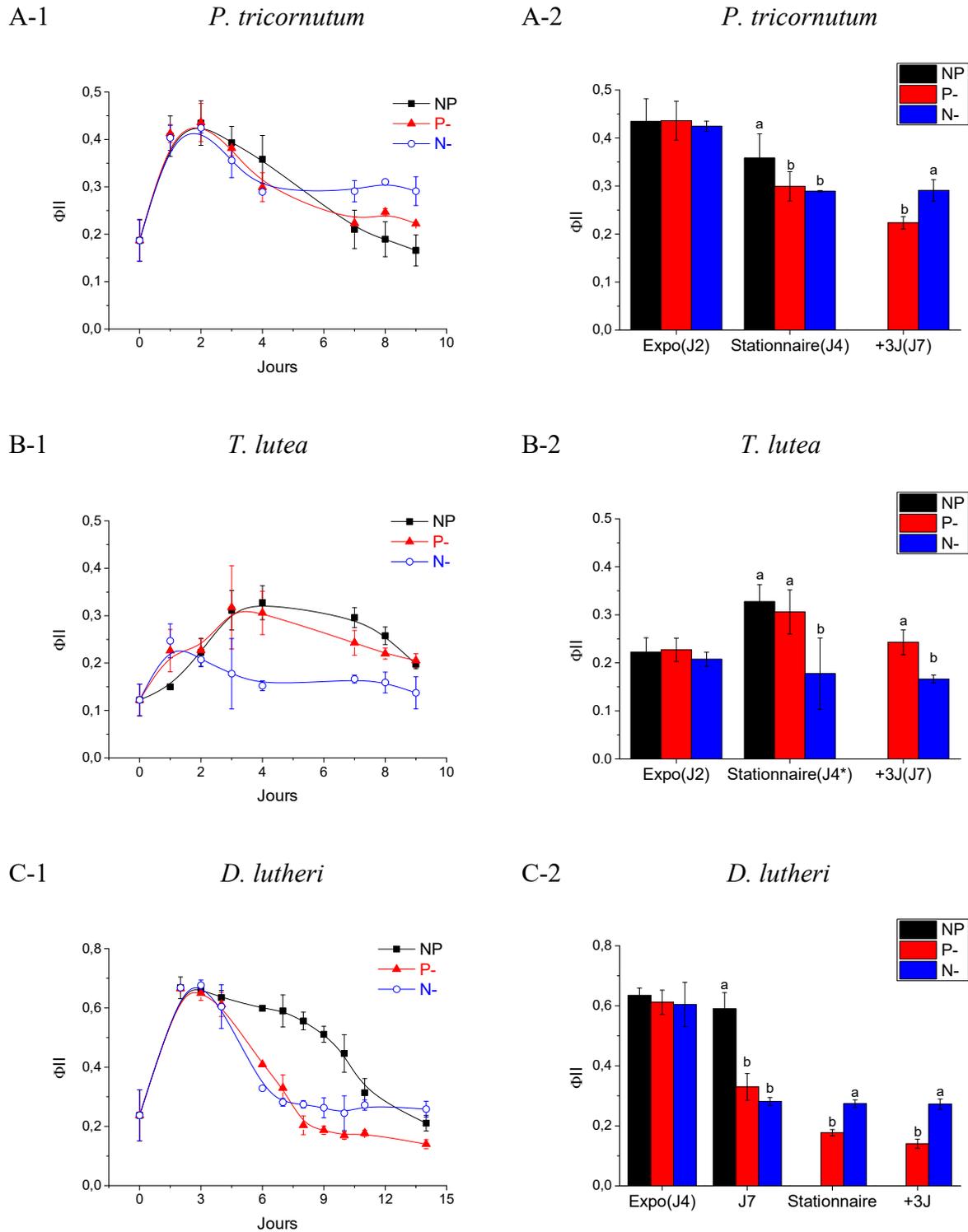


Figure III-1-14 : Evolution du rendement quantique opérationnel du PS II (Φ_{II}) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

III.1.2.2.4 Quenching non photochimique

Le quenching non photochimique représente principalement la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur due au déséquilibre entre l'absorption et l'utilisation de l'énergie lumineuse au niveau de l'appareil photosynthétique. Ce processus constitue un moyen de protection contre la formation d'espèces réactives de l'oxygène, et peut être pour partie aussi relié à l'inactivité du PSII (photo-inhibition, photo-destruction, etc.).

Dans la présente étude, il y a globalement une baisse du quenching non photochimique de la fluorescence variable (qN) pendant la phase exponentielle. Cette diminution pourrait être liée à la multiplication cellulaire qui est une grande consommatrice d'énergie. La limitation nutritive conduit à la hausse du qN chez les trois espèces (Figure III-1-15).

Le qN reflète l'activation de plusieurs processus de quenching non photochimique pendant la période lumineuse et conduit le plus souvent à la dissipation non radiative de l'énergie d'excitation sous forme de chaleur. Ce paramètre inclut l'augmentation du gradient de pH, les transitions d'état, la régulation de la synthèse de l'ATP, l'inactivation des centres réactionnels de PSII, les changements conformationnels au sein des membranes des thylakoïdes, l'activation du cycle des xanthophylles, etc. (Roháček *et al.*, 2008). Le paramètre NPQ est corrélé linéairement avec la déépoxydation de la xanthophylle diadinoxanthine (Dd) chez les diatomées qui se produit lors d'une illumination intense (Roháček *et al.*, 2014). La formation de diatoxanthine (Dt) chez les diatomées par la déépoxydation de la diadinoxanthine dissipe l'énergie excédentaire en provenance du PS II sous forme de chaleur. Du point de vue énergétique, NPQ reflète l'état de déséquilibre énergétique au niveau cellulaire.

Chez la diatomée *P. tricornutum*, aucune différence significative pour les paramètres qN et NPQ n'a été observée lors des deux types de limitation nutritive au début de la phase stationnaire, tandis que la limitation en P provoque une augmentation de qN et NPQ plus importante dès qu'il y a carence. Ceci suggère une dissipation d'énergie plus importante à cause de l'activation du cycle des xanthophylles en carence de P. Geider *et al.* (1993) ont rapporté une forte conversion de Dd en Dt lors de la privation de P chez *P. tricornutum*. Cette augmentation est probablement liée à une production d'ATP moins efficace à cause d'une pénurie en P. L'autre cause serait liée au déséquilibre plus important entre la phase « claire » et la phase « sombre », ce qui limiterait l'assimilation du CO₂ qui, à son tour, inhiberait l'ATP synthase chloroplastique. Le mauvais fonctionnement de l'ATP synthase entraînerait l'acidification du lumen des thylacoïdes qui déclenche le cycle de xanthophylle et l'augmentation de NPQ.

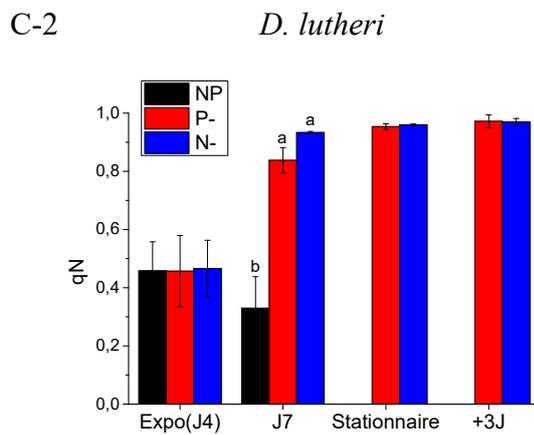
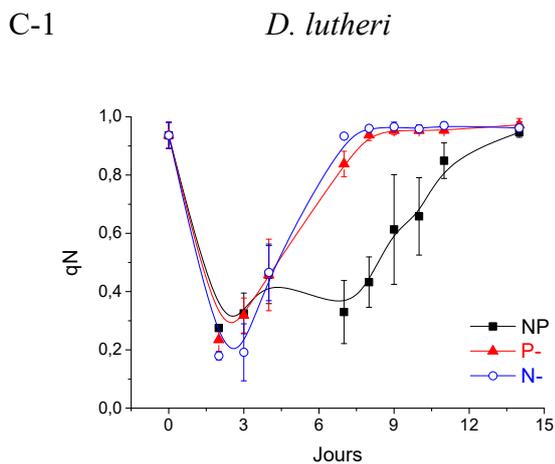
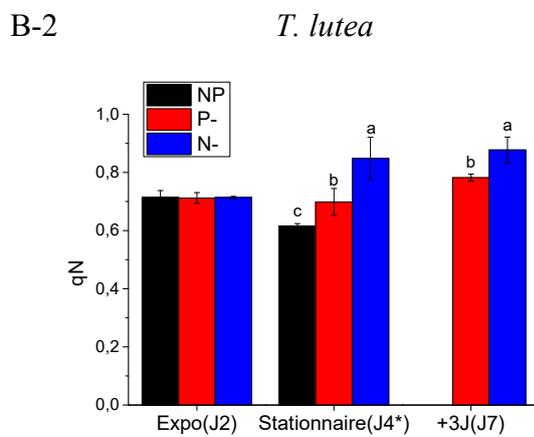
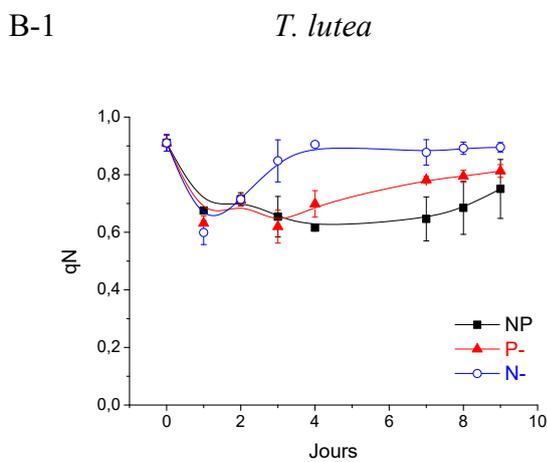
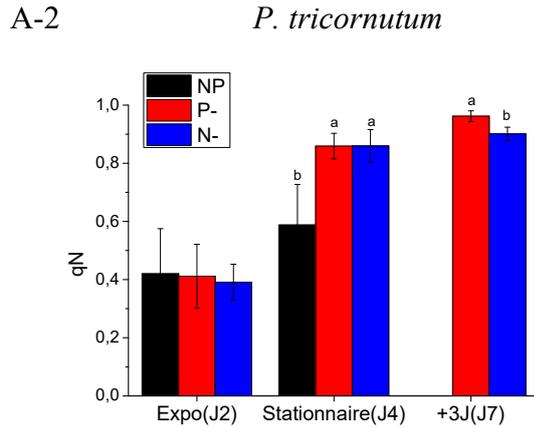
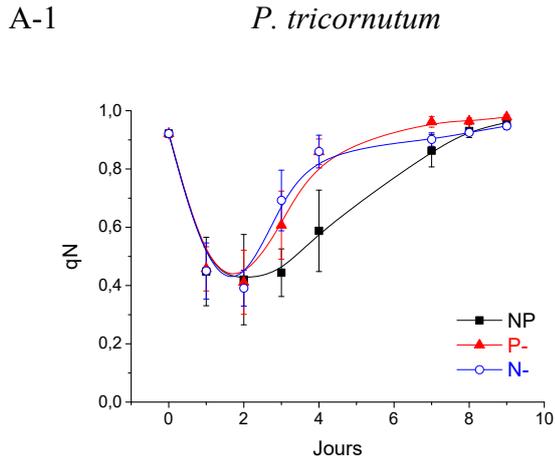


Figure III-1-15 : Evolution du quenching non photochimique (qN) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

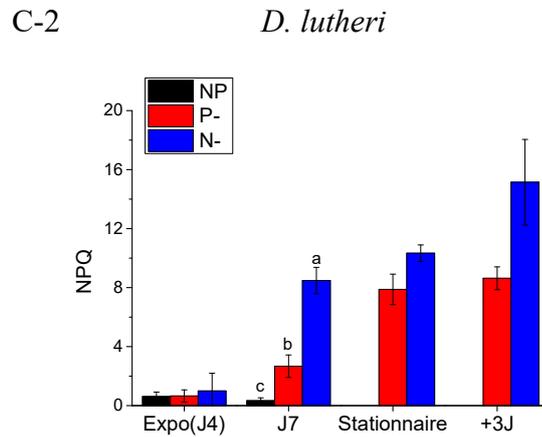
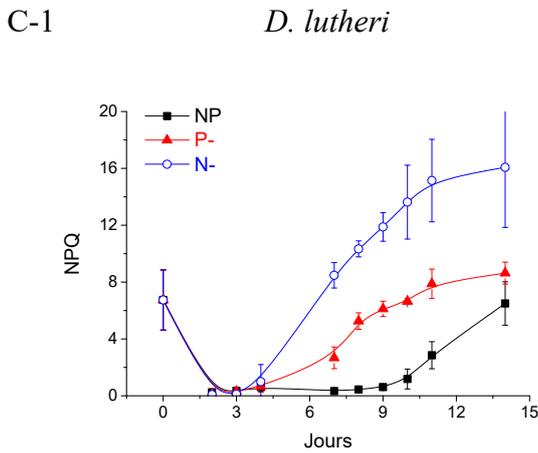
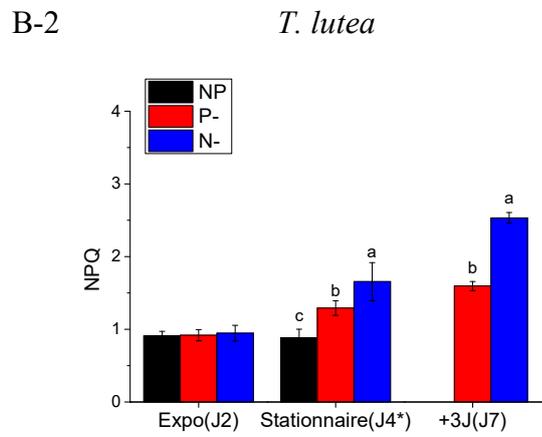
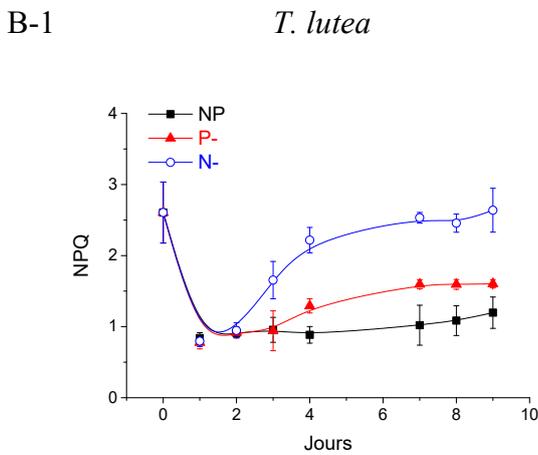
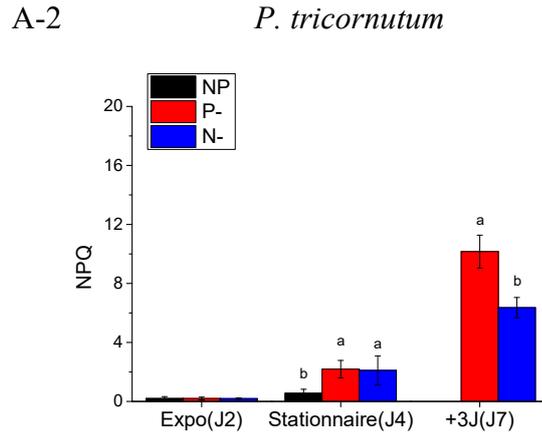
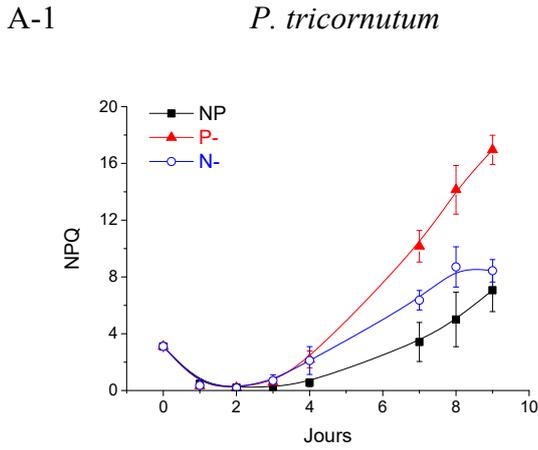


Figure III-1-16 : Evolution du quenching non photochimique (NPQ) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Chez *T. lutea*, au contraire, la limitation en P a engendré des qN et NPQ moins élevés qu'en limitation en N. Ces résultats apparaissent en accord avec la haute capacité photochimique du PSII à l'issue de l'éclairement actinique, c'est-à-dire qu'il y a plus d'énergie absorbée qui est utilisée pour la photochimie (la fixation du CO₂ et / ou d'autres voies réductrices alternatives) en condition de limitation en P qu'en N-. Cependant, *T. lutea* a montré un NPQ plus faible que ceux observés chez les deux autres espèces étudiées. Un faible NPQ a aussi été rapporté chez *Isochrysis galbana*, selon les auteurs, NPQ ne serait pas assez puissant pour dissiper l'excès d'énergie d'excitation et le transport cyclique des électrons pourrait jouer un rôle physiologique important (Zhang *et al.*, 2014). Le faible NPQ est probablement lié à la composition lipidique des membranes des thylacoïdes (voir chapitre 3). Des mesures supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre les raisons intimes de ces variations.

En ce qui concerne *D. lutheri*, il n'y a pas de différence significative pour les paramètres qN et NPQ entre les deux types de limitation pendant la phase stationnaire, NPQ a tendance à être moins élevé en condition de limitation en P. La valeur faible du NPQ dans les cultures P-pourrait être due à la croissance continue qui consomme largement l'énergie et donc réduit l'état de déséquilibre énergétique au niveau cellulaire.

III.1.2.2.5 Relaxation de quenching non photochimique (qN)

Pour mieux comprendre le quenching non photochimique, des mesures complémentaires ont été effectuées sur la période de relaxation après un stress lumineux de 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les Figures A-1 à 3 résument les cinétiques de fluorescence obtenues chez les trois espèces et l'évolution des trois composantes de qN à l'obscurité. Selon Roháček *et al.* (2014), la cinétique de relaxation de qN permet de distinguer trois composantes : qN_f (échelle de temps en seconde), qN_i (échelle de temps en minute) et qN_s (échelle de temps en heure). La composante qN_f est liée au changement de conformation rapide dans les membranes thylacoïdales au début du processus de relaxation. La composante qN_i est principalement induite par la formation du gradient de pH et la déépoxydation de la xanthophylle Dd alors que qN_s est probablement lié à la photo-inhibition.

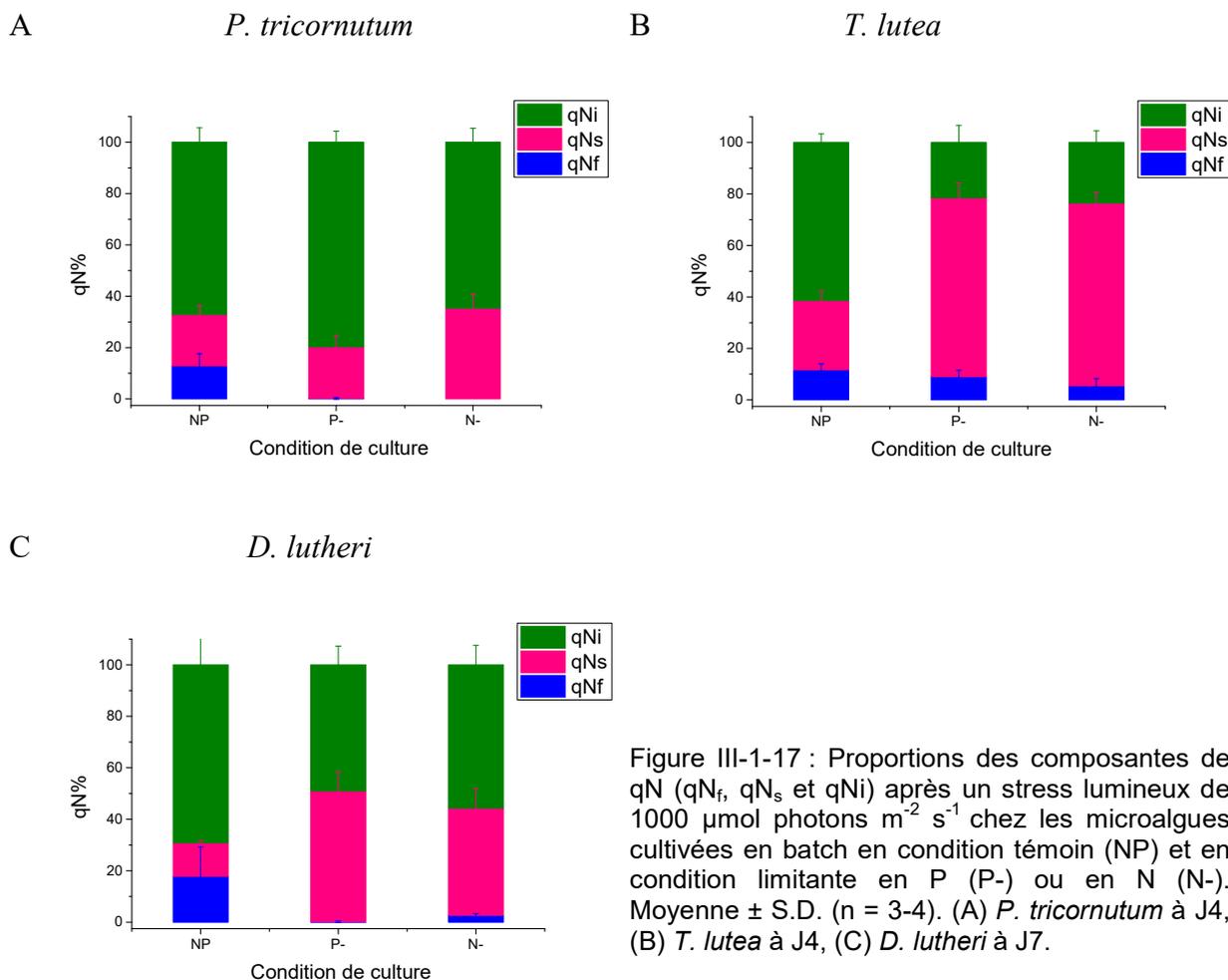


Figure III-1-17 : Proportions des composantes de qN (qN_f , qN_s et qN_i) après un stress lumineux de $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Moyenne \pm S.D. ($n = 3-4$). (A) *P. tricornutum* à J4, (B) *T. lutea* à J4, (C) *D. lutheri* à J7.

Chez *P. tricornutum* (J4), qN_f et qN_s sont deux composantes exponentielles et qN_i est une composante sigmoïde (voir Annexe 3 Figure A-1). qN_f est significativement réduit dans les cultures N- et P- par rapport aux cultures NP pour lesquelles qN_f représente 13 % de qN, cette diminution suggère une modification au niveau de la membrane. La diminution de qN_f a été compensée par l'augmentation de qN_i dans les cultures P- et qN_s dans les cultures N-, respectivement. En condition de limitation en P, qN_s est resté inchangé tandis que qN_i a augmenté significativement ($qN_i = 80 \%$) par rapport aux cultures témoins ($qN_i = 67 \%$). Cette augmentation de qN_i est en accord avec les résultats obtenus à partir de la détermination de NPQ qui indique une augmentation de la dissipation d'énergie en excès. Au contraire, en condition de limitation en N, qN_i est resté stable tandis que la proportion de qN_s augmente significativement ($qN_s = 35 \%$) par rapport aux cultures témoins ($qN_s = 20 \%$), montrant une photo-inhibition de PSII sous limitation en N (Figure III-1-17A).

Chez *T. lutea* (J4), les trois composantes sont des fonctions exponentielles (voir Annexe 3 Figure A-2). qN_f diminue significativement dans les cultures N- (où qN_f représente 5 % de qN)

par rapport aux cultures NP ($qN_f = 12\%$) et cultures P- ($qN_f = 9\%$), suggérant une modification dans les membranes thylacoïdales plus importante sous limitation en N. qN_s a fortement augmenté en condition de limitation et est devenu la composante la plus importante. Cela suggère une forte photo-inhibition de PSII sous privation en P et en N. La proportion de qN_i , en revanche, a fortement diminué sous condition de limitation (Figure III-1-17B). Cette diminution du qN_i semble indiquer que le cycle des xanthophylles n'était pas assez puissant chez *T. lutea*. Les résultats sont en accord avec le faible NPQ obtenu.

Chez *D. lutheri* (J7), qN_f et qN_s sont des composantes exponentielles et qN_i est une composante sigmoïde (voir Annexe 3 Figure A-3). qN_f a fortement diminué dans les cultures sous limitation par rapport aux cultures NP. La proportion de qN_i a aussi tendance à diminuer mais il n'y a pas de différence significative entre les trois conditions. Le maintien de qN_i suggère une dissipation thermique via NPQ. L'augmentation significative de qN_s indique une forte photo-inhibition de PSII dans les conditions de limitation nutritive (Figure III-1-17C).

III.1.2.3 Emission d'oxygène

Les échanges d' O_2 entre les microalgues et les milieux de culture ont été mesurés quotidiennement pour estimer l'impact des limitations nutritives sur l'activité photosynthétique. Pour éviter les influences dues aux changements substantiels des volumes cellulaires, l'intensité photosynthétique est présentée ici en fonction du C cellulaire (Steele, 1962).

La photosynthèse augmente pendant les premiers jours de culture chez les trois espèces et les trois conditions expérimentales, permettant de la croissance cellulaire, puis elle est fortement réduite en condition de limitation nutritive (Figure III-1-18). Cette diminution en condition de limitation en P est probablement liée à la réduction des réactions « sombres » du cycle de Calvin Benson en raison de l'épuisement des intermédiaires phosphorylés (Brooks, 1986; Jacob et Lawlor, 1993). En effet, 9 molécules de P sont ainsi impliquées pour 3 molécules de CO_2 fixées et 3 molécules d' O_2 émises (Walker et Robinson, 1978). La limitation en P pourrait fortement inhiber la fixation du carbone photosynthétique (Sivak et Walker, 1986). Cependant, il y aurait moins de produits photosynthétiques dirigés vers le métabolisme respiratoire (Theodorou *et al.*, 1991; Walker et Sivak, 1986). La respiration à l'obscurité a tendance à être plus faible dès qu'il y a une carence en P chez *P. tricornutum* et *T. lutea* (voir Annexe 4 Figure A-4).

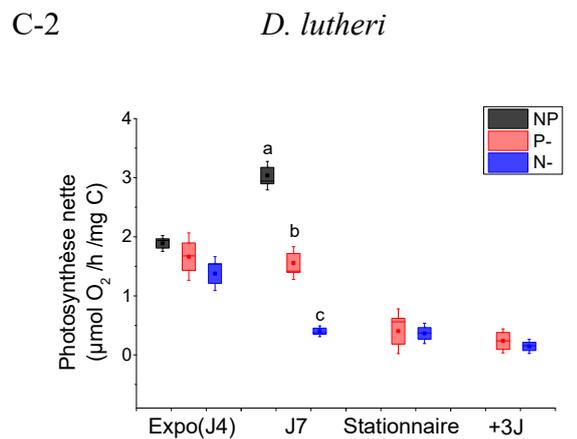
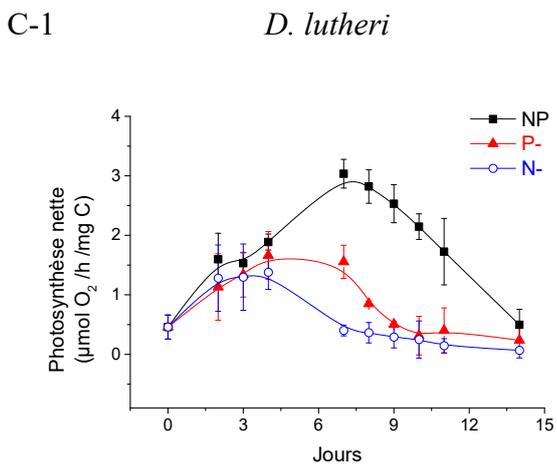
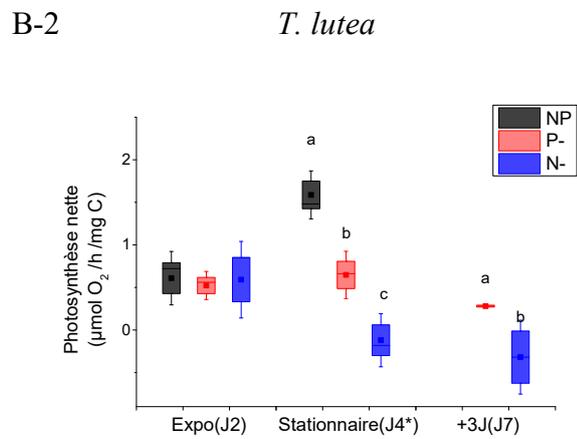
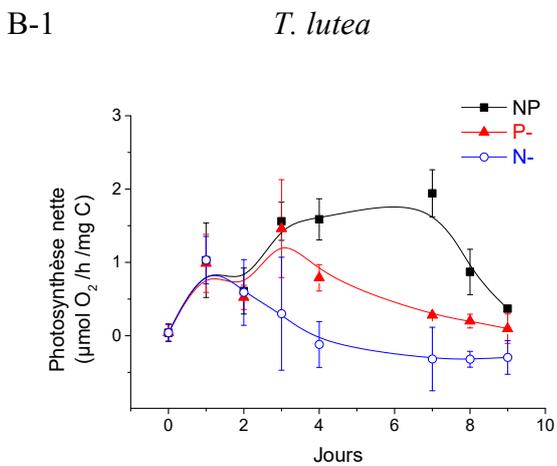
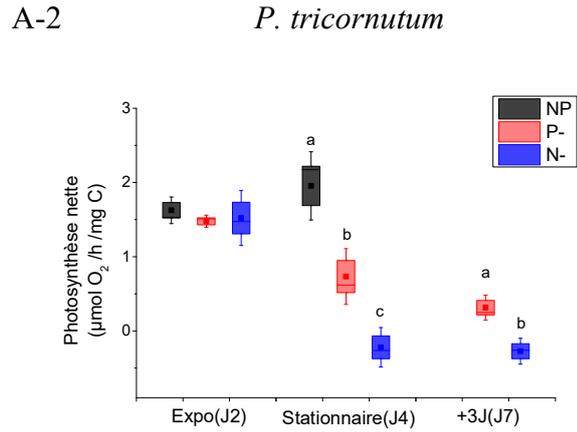
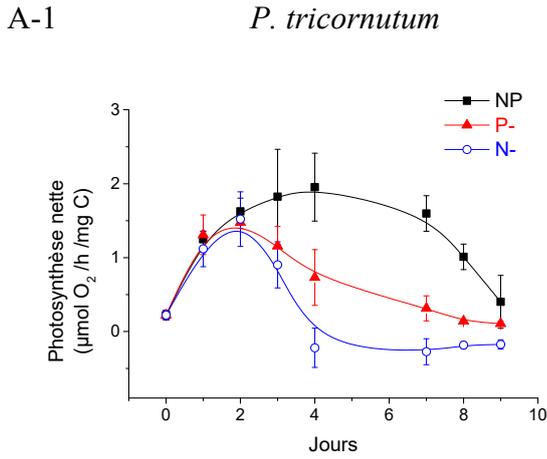


Figure III-1-18 : Evolution de la photosynthèse nette chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$), la taille des boîtes représente S.E. (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

La photosynthèse nette mesurée (Figure III-1-18) est le bilan de la photosynthèse brute et de la respiration. Elle est étroitement liée à la quantité de C disponible pour l'accroissement de biomasse. Pendant la phase stationnaire, la photosynthèse nette de *P. tricornutum* et *T. lutea* reste extrêmement faible en condition de limitation azotée indiquant que la fixation du CO₂ est fortement réduite et peut expliquer la faible accumulation de C chez ces deux espèces. La limitation en P réduit mais maintient la photosynthèse nette à un niveau plus élevé qu'en N-, ce qui permet une fixation du CO₂ continue et favorise ainsi l'accumulation de C. Chez *D. lutheri*, aucune différence significative de la photosynthèse nette n'a été observée pendant la phase stationnaire. Cette faible photosynthèse nette permet une accumulation de C dans les deux conditions limitantes.

III.1.3 Conclusion

Les limitations en P et en N réduisent la densité cellulaire maximale. Différents mécanismes d'acclimatation sont mis en œuvre chez les microalgues en fonction de la limitation nutritive. En condition de limitation en P, le quota non limitant de N rapporté au C est aussi fortement réduit. Par conséquent, la diminution de la disponibilité en N dans les cellules pourrait entraîner des réponses secondaires similaires à celles observées lors d'une limitation en N chez les cultures P-.

La limitation en N réduit fortement les teneurs en pigments, et diminue la capacité photochimique maximum du PSII. Par conséquent, l'apport d'énergie lumineuse et la fixation du CO₂ sont réduits, ce qui permet un meilleur équilibre avec la diminution du métabolisme cellulaire.

Les teneurs en pigments sont moins affectées en condition de limitation en P, en revanche, l'intensité photosynthétique est aussi fortement réduite. En raison de la faible respiration chez *P. tricornutum* et *T. lutea*, une efficacité supérieure de la fixation de C est observée et donc favorise l'accumulation de C, ainsi que l'augmentation du volume cellulaire pendant la phase stationnaire.

Les différentes espèces ont leurs propres mécanismes pour réguler l'équilibre entre la quantité d'énergie absorbée et celle utilisée. *P. tricornutum* améliore la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur par le mécanisme de NPQ notamment en condition de limitation en P,

tandis que *T. lutea* possède probablement d'autres mécanismes tels que le transport cyclique des électrons.

La limitation en P semble jouer un rôle mineur chez *D. lutheri*, la limitation en P conduit à des réponses similaires à la seule limitation en N.

Chapitre 2

Orientation du carbone

III.2. ORIENTATION DU CARBONE CHEZ LES MICROALGUES MARINES LORS D'UNE LIMITATION NUTRITIVE EN PHOSPHORE OU EN AZOTE

Dans le chapitre précédent, les résultats ont montré que la limitation en P favorise l'accumulation du C notamment chez *P. tricornutum* et *T. lutea*. Le carbone fixé est orienté principalement vers la synthèse des protéines, des glucides ou autres molécules de réserve comme les lipides neutres. Dans ce chapitre, la réorientation métabolique globale en réponse à une limitation nutritive en P ou en N chez les microalgues marines sera présentée, elle repose sur la détermination des teneurs en protéines, glucides et lipides.

Du fait des variations substantielles du volume des cellules, nous avons exprimé ces teneurs en fonction du C cellulaire, ce qui permet d'étudier de façon plus exacte la réorientation métabolique en réponse à la limitation nutritive.

III.2.1 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en protéines solubles

La teneur en protéines solubles a été déterminée au cours de la croissance des microalgues. Les protéines solubles représentent un ensemble de molécules ayant des fonctions cellulaires majeures car la plupart des réactions du métabolisme se déroule en milieu aqueux sous le contrôle de protéines enzymatiques. D'une manière générale, la teneur en protéines solubles augmente pendant la phase de latence et la phase exponentielle, le flux de carbone est ainsi orienté vers la biosynthèse des protéines tout en maintenant la croissance cellulaire (Figure III-2-1). Une fois la phase stationnaire atteinte dans les conditions P- et N-, la teneur en protéines solubles est plus faible que celle obtenue en milieu témoin. L'orientation du C vers les protéines est alors extrêmement inhibée.

Cette réduction en limitation azotée peut s'expliquer par une inhibition de la biosynthèse des composés azotés (Alipanah *et al.*, 2015; Garnier *et al.*, 2014; Levitan *et al.*, 2015). Par ailleurs, la dégradation des acides aminés, dès qu'il y a carence, pourrait fournir du NAD(P)H et de l'acétyl-CoA pour la biosynthèse des acides gras (Ge *et al.*, 2014).

En ce qui concerne la limitation en P, cette inhibition pourrait être liée à une contrainte globale sur la synthèse d'ARN et d'ATP (Berdalet *et al.*, 1994; Dyhrman, 2016; Feng *et al.*, 2015; Mühlroth *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014) sans dégradation massive. Par conséquent, la teneur en protéines solubles à l'échelle cellulaire demeure souvent stable voire à un haut niveau pendant la phase stationnaire (voir Annexe 5 Figure A-5).

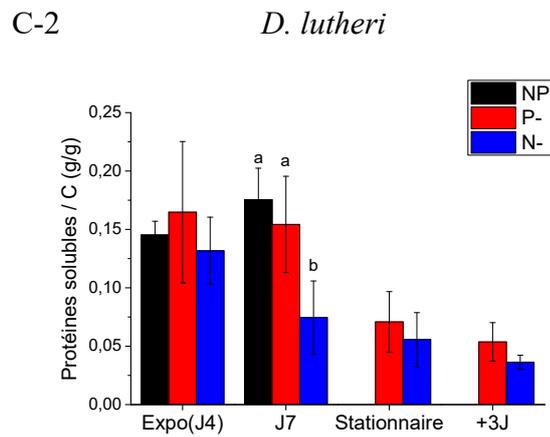
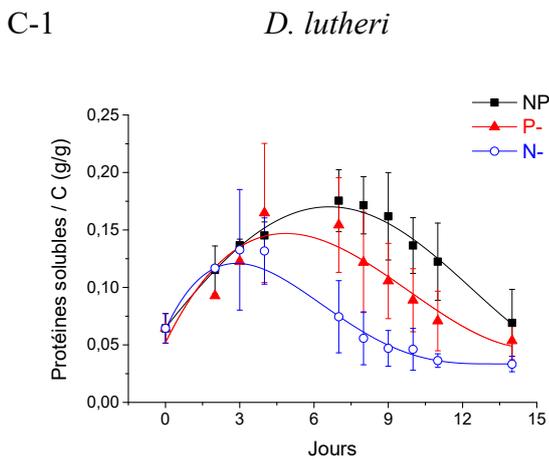
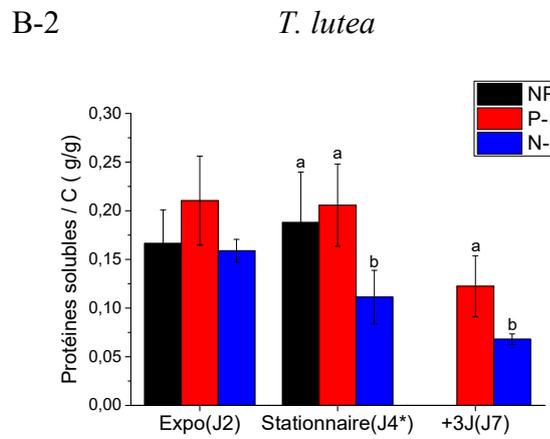
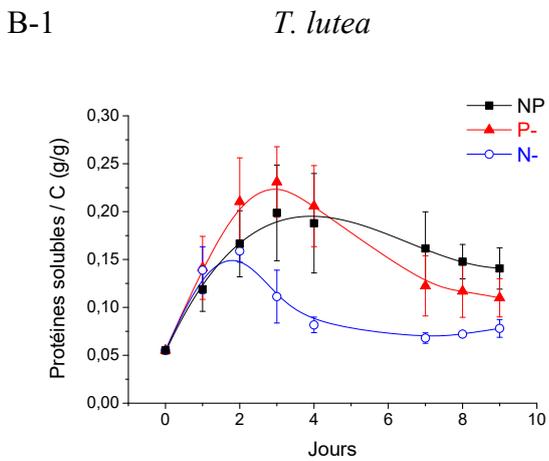
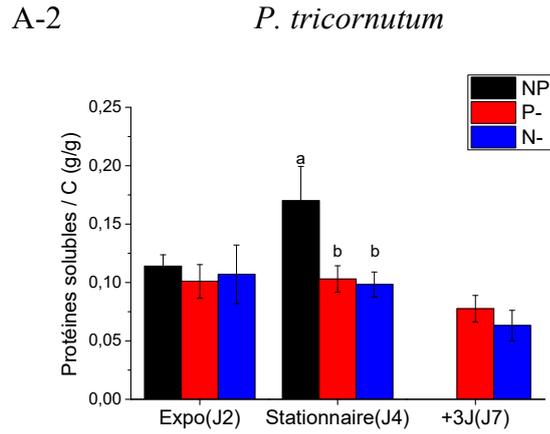
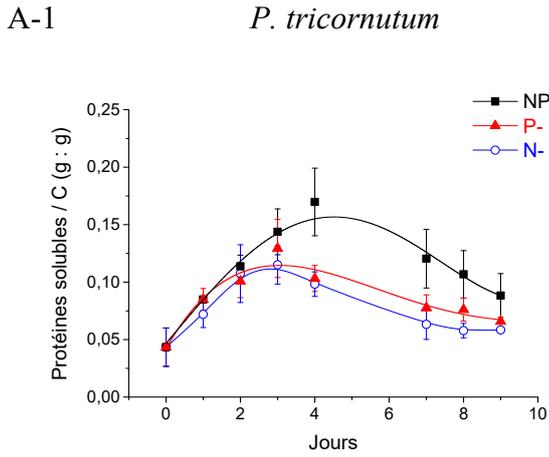


Figure III-2-1 : Evolution de la teneur en protéines solubles rapportée au C (g/g) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

En regardant le suivi temporel, *P. tricornutum* semble être plus sensible à la limitation en P, tandis que les Haptophytes réagissent plus tardivement à la diminution du P cellulaire (voir chapitre 1). Cette différence de comportement pourrait être due à un quota cellulaire en P plus faible, autrement dit le seuil provoquant cet effet d'inhibition serait plus bas chez les Haptophytes.

T. lutea a un comportement particulier avec une tendance d'allocation de C aux protéines solubles supérieure au début de la mise en place de la limitation par P (Figure III-2-1B). Ceci est probablement lié à une synthèse d'extra, qui permettrait une reprise rapide de la prolifération cellulaire lors d'un réapprovisionnement en P (M. Li *et al.*, 2016).

III.2.2 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en glucides solubles

Les glucides et les lipides neutres sont souvent considérés comme les principales réserves de carbone. Chez les diatomées et les Haptophytes, les réserves de glucides sont principalement sous forme de chrysolaminarine (β -1,3 glucane), qui est un polysaccharide soluble qui s'accumule dans la vacuole.

La teneur en glucides solubles a été mesurée au cours de la croissance des microalgues. Elle diminue pendant la phase de latence chez les trois espèces. La consommation des glucides libère de l'énergie pour la croissance cellulaire. Puis, les cellules commencent à accumuler des glucides en phase exponentielle (Figure III-2-2). Dans la condition NP, une accumulation progressivement de glucides est observée au cours des cultures chez les trois espèces, mais avec une réponse plus lente que dans les conditions N- et P-. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces cultures NP sont principalement limitées par la lumière, tandis que les éléments nutritifs N et / ou P ne sont épuisés qu'en toute fin de batch.

Chez *P. tricornutum* et *T. lutea*, l'augmentation de la teneur en glucides solubles a été observée dès la privation de PO_4^{3-} ou NO_3^- dans les cultures jusqu'au début de la phase stationnaire. Ainsi, le flux de C s'oriente vers la biosynthèse des glucides en tant que molécules de stockage primaire d'énergie. D'autres études ont aussi montré qu'une limitation nutritive favorise l'accumulation des glucides (Brown *et al.*, 1993; Da Costa *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 1990). Ces auteurs ont mis en évidence une corrélation linéaire négative entre la disponibilité en N et la teneur en glucides chez *T. lutea*, et suggèrent un mécanisme de signalisation directe entre la disponibilité en N et le métabolisme des glucides (Garnier *et al.*, 2016; Lacour *et al.*, 2012).

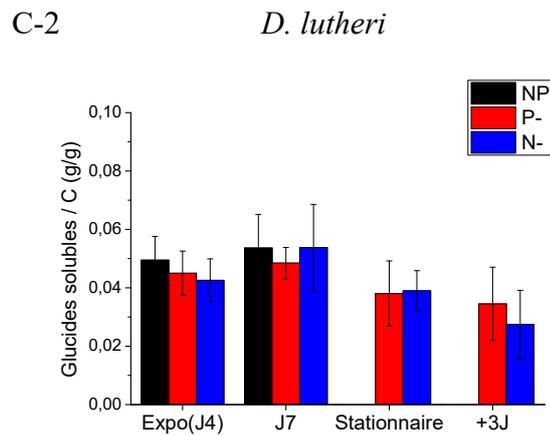
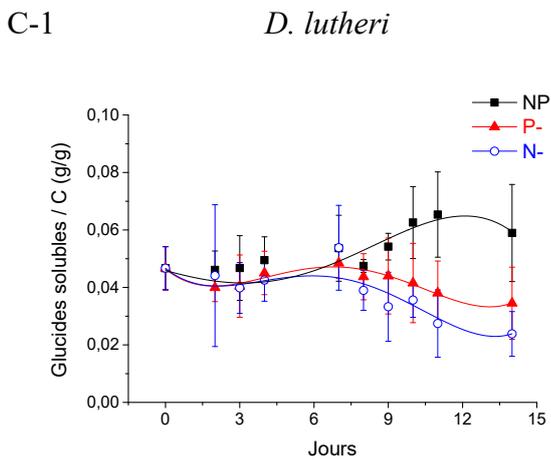
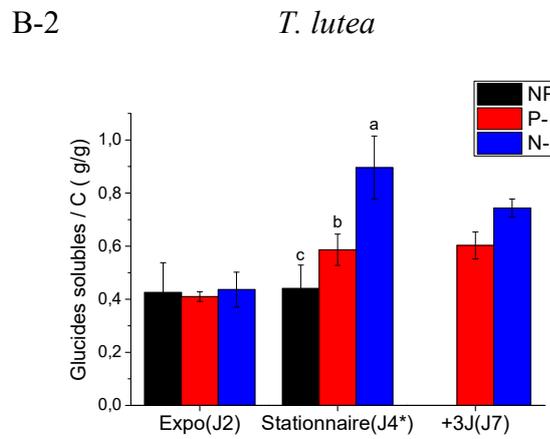
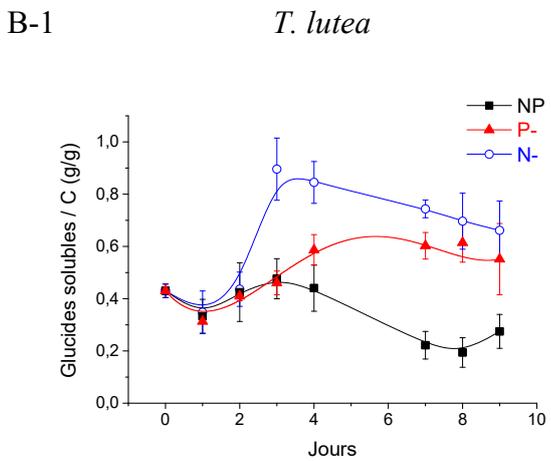
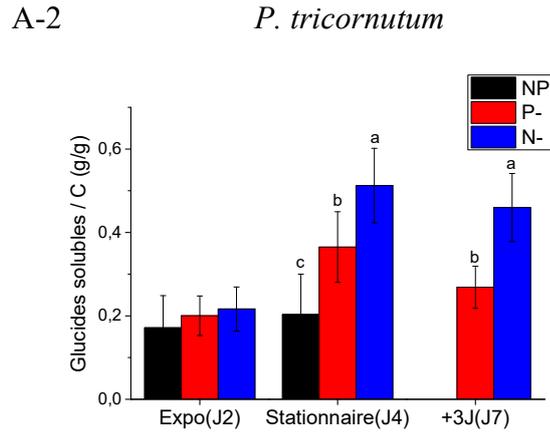
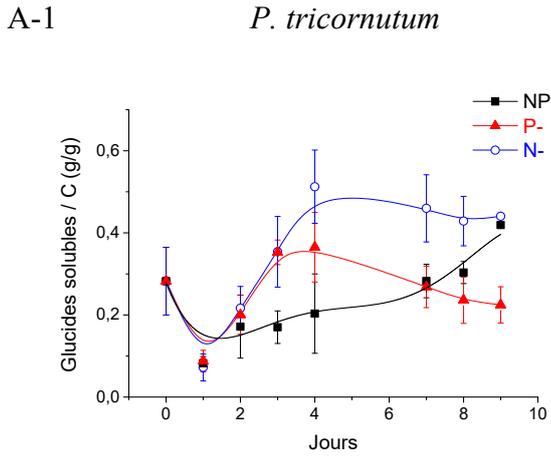


Figure III-2-2 : Evolution de la teneur en glucides solubles rapportée au C (g/g) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Dès que les carences apparaissent, la teneur en glucides solubles a tendance à diminuer pendant la phase stationnaire, suggérant une réorientation du flux de carbone. Une interconversion entre les glucides et les lipides neutres peut être soupçonnée. En effet, Garnier *et al.* (2014) ont souligné que l'accumulation de lipides chez *T. lutea* pourrait être étroitement liée au métabolisme des glucides. Les résultats sont en accord avec le modèle dynamique d'accumulation de glucides et de lipides neutres au cours de l'épuisement de N proposé par Mairet *et al.* (2011).

Nous remarquons que la teneur maximale en glucides solubles rapportée au C en condition de limitation en P est plus faible que celle obtenue en limitation en N. Chez *P. tricornutum* ainsi que chez une autre diatomée *Thalassiosira pseudonana*, des études antérieures ont montré une régulation à la hausse des transcrits de l'enzyme liée à la dégradation de la chrysolaminarine et des protéines au cours de la limitation en P (Brembu *et al.*, 2017; Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Dyhrman *et al.*, 2012). D'ailleurs, la limitation en P favorise généralement davantage la production de polysaccharides extracellulaires (ECPS) que la limitation en N (Abdullahi *et al.*, 2006; Urbani *et al.*, 2005). La production d'ECPS peut être partiellement dépendante de la dégradation de la chrysolaminarine (Underwood *et al.*, 2004).

Yang *et al.* (2014) ont suggéré que le métabolisme énergétique pourrait primer sur l'accumulation de chrysolaminarine en condition de limitation en P. Ainsi, le carbone fixé serait principalement engagé dans le métabolisme énergétique qui intervient dans la formation de l'acétyl-CoA et du NADPH, favorisant la biosynthèse des lipides.

En ce qui concerne *D. lutheri*, étant donné la faible teneur en glucides solubles mesurée, ceux-ci (notamment la chrysolaminarine) ne semblent pas être le réservoir de C dans cette espèce. Une orientation du flux de carbone vers la synthèse des glucides solubles est aussi fortement inhibée dès que les carences apparaissent. Une baisse continue est alors observée jusqu'à la fin de l'expérience en condition de limitation en P et en N. Aucune différence significative n'a observée entre les deux types de limitation nutritive.

III.2.3 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en lipides neutres

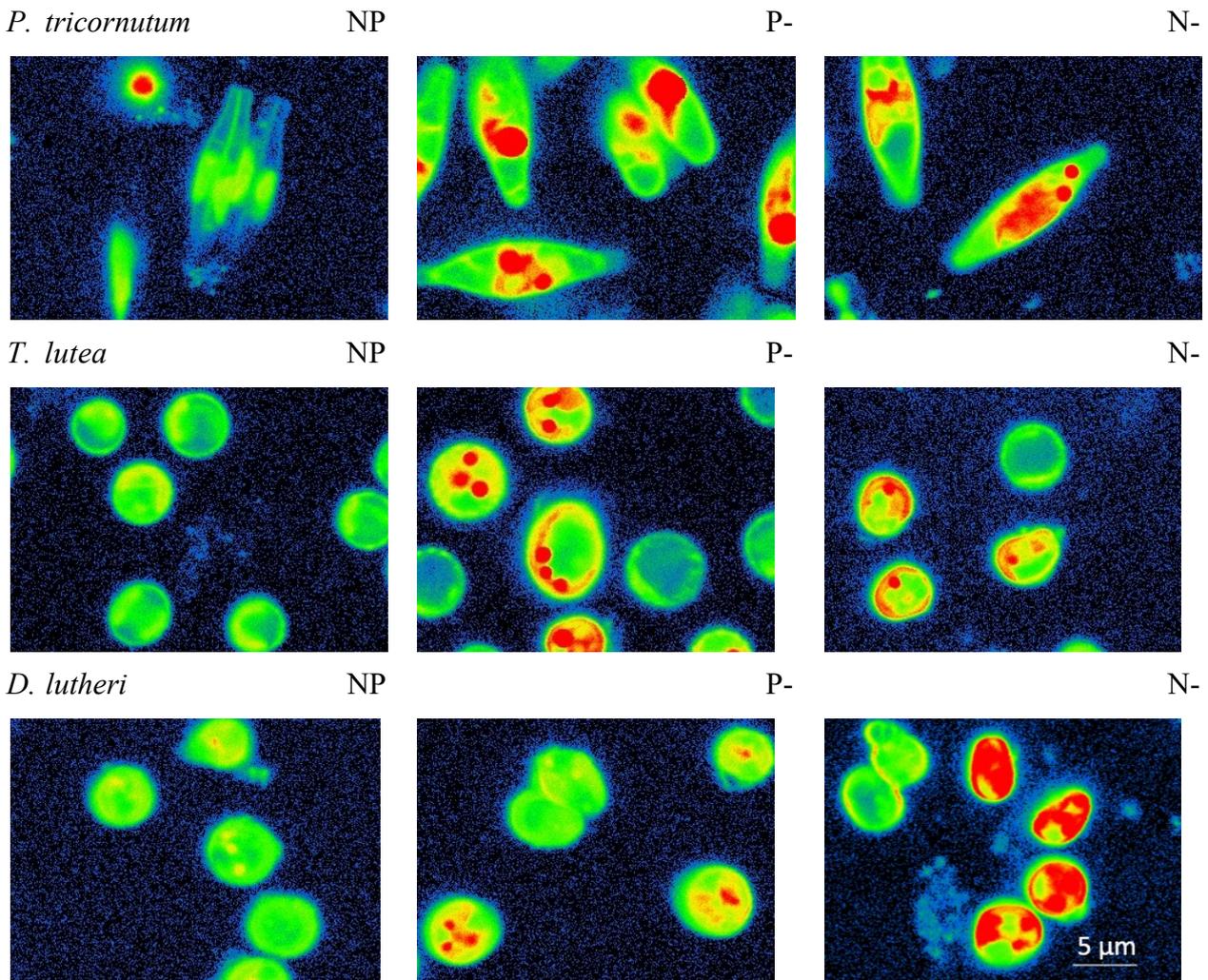


Figure III-2-3 : Photographie montrant le stockage des lipides neutres sous forme de tâches rouges chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les images ont été acquises en microscopie confocale à fluorescence avec des cellules vivantes colorées au Nile red. Longueurs d'onde d'excitation = 530 nm et d'émission = 590 nm, barre d'échelle = 5 µm.

Les lipides neutres constituent une forme de stockage d'énergie, leur teneur a été suivie au cours de la croissance des microalgues en utilisant la fluorescence du Nile red. La microscopie confocale à fluorescence permet de visualiser les gouttes lipidiques dans les cellules (Figure III-2-3). La teneur en lipides neutres montre une tendance générale à la diminution en absence de limitation. La dégradation des lipides neutres libère de l'énergie et les squelettes carbonés pour la croissance cellulaire. Lorsque le milieu est limité, les lipides neutres s'accumulent à nouveau, notamment pendant la phase stationnaire (Figure III-2-4).

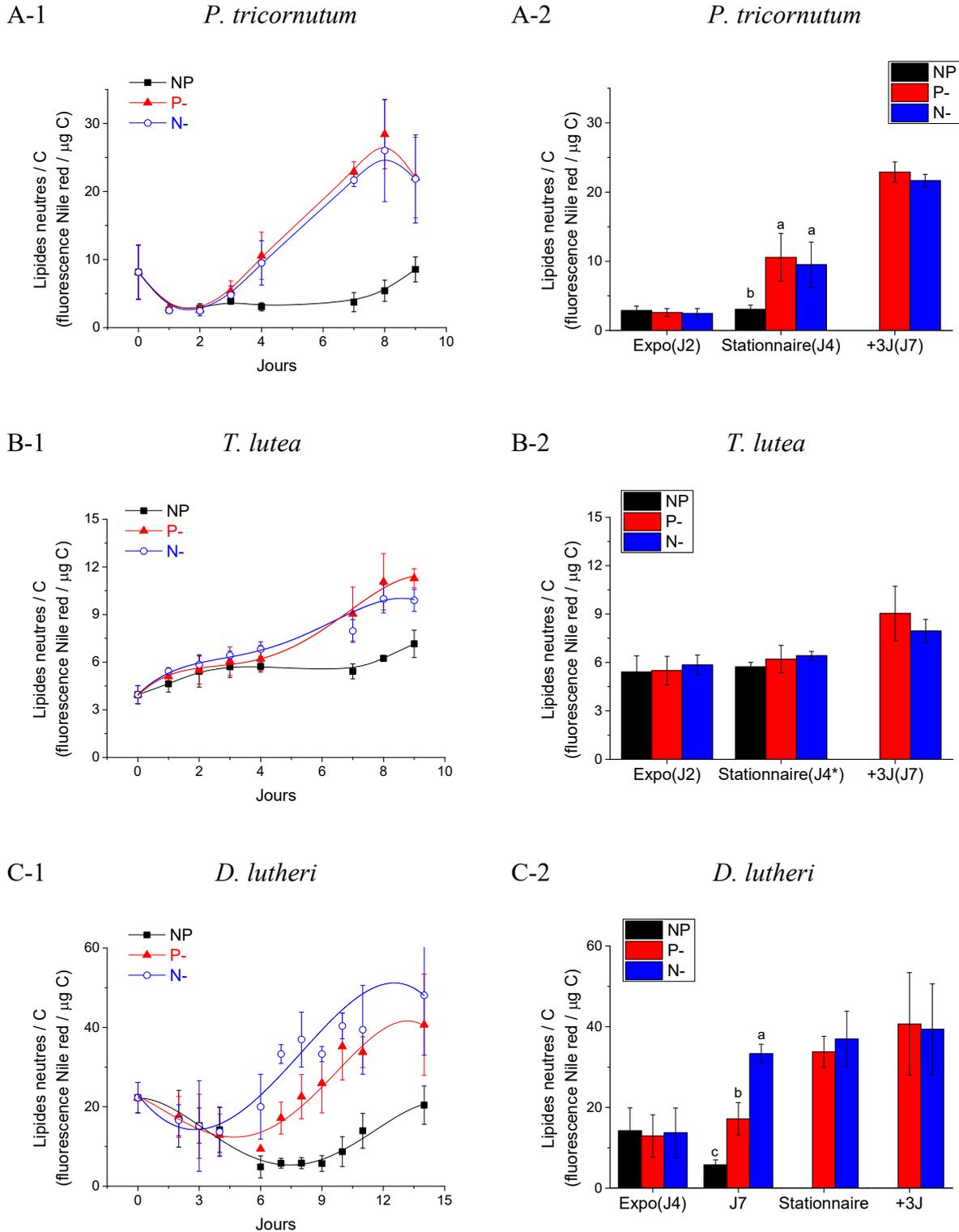


Figure III-2-4 : Evolution de la teneur en lipides neutres rapportée au C (fluorescence Nile red/ µg C) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Le suivi de la teneur en lipides neutres, notamment pendant la phase stationnaire, montre une orientation du flux de C vers la synthèse des lipides neutres. Les limitations nutritives en P et en N montrent un effet similaire sur cette teneur chez les espèces étudiées à chaque phase de croissance (Figure III-2-4). Ces résultats suggèrent un scénario de « poussée » similaire dans les conditions N- ou P-limitant, dans lesquelles l'accumulation de lipides neutres pendant la phase stationnaire pourrait être une voie « passive » en raison de l'accumulation d'acétyl-CoA et de NADPH en excès dans la cellule (Tan et Lee, 2016; Valenzuela *et al.*, 2012).

Apparemment, l'accumulation des lipides neutres dépend de l'accumulation du C cellulaire et de la phase de croissance. L'efficacité de la fixation du C chez *P. tricornutum* et *T. lutea* en condition de limitation en P favorise par conséquent l'accumulation des lipides neutres dans la cellule. Au J7 (phase stationnaire + 3 jours), la teneur cellulaire en lipides neutres en condition P- est 2 fois plus élevée que celle en condition N- ; les teneurs en lipides neutres en condition P- chez *P. tricornutum* et *T. lutea* sont respectivement environ 11 et 3 fois plus élevées que celles en condition témoin (voir Annexe 5 Figure A-7).

D'après Garnier *et al.* (2016), les glucides constituent le principal réservoir d'allocation du C chez *T. lutea* alors que cette espèce ne produit qu'une petite quantité de triacylglycérols (TAG) en condition de limitation en N (Marlowe *et al.*, 1984; Shi *et al.*, 2015; Sukenik et Wahnou, 1991). D'après Da Costa *et al.* (2017), cette augmentation de la teneur en lipides neutres pourrait être due principalement à une accumulation d'alcénones dans la cellule.

D. lutheri accumule une grande quantité de lipides neutres en condition de limitation nutritive. La limitation en P agit de la même façon que la limitation en N. A J14 (P-) ou J11 (N-) (phase stationnaire + 3J), la teneur cellulaire en lipides neutres en condition de limitation nutritive était environ 13 fois plus élevée que celle en condition témoin à J7 (voir Annexe 5 Figure A-7).

Cette accumulation accrue de lipides neutres implique une combinaison de la biosynthèse *de novo* des lipides et un recyclage des glycérolipides membranaires vers les corps lipidiques (Abida *et al.*, 2015; Garnier *et al.*, 2016; Guarnieri *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2014; Mühlroth *et al.*, 2017; Popko *et al.*, 2016; Simionato *et al.*, 2013). Certains de ces points seront abordés dans le chapitre suivant.

III.2.4 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la teneur en lipides totaux

L'évolution de la teneur en lipides totaux rapportée au C chez les trois espèces suit la même tendance que l'évolution de la teneur en lipides neutres, mais elle est beaucoup plus faible (Figure III-2-5). Ainsi, les lipides neutres sont la composante prédominante des lipides totaux (Nalder *et al.*, 2015) tandis que les lipides membranaires polaires ne sont pas un réservoir du carbone sous condition de limitation. Les lipides membranaires polaires subissent un remodelage en fonction de la limitation en nutriments (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2017b, 2017a; Khozin-Goldberg et Cohen, 2006; S. Li *et al.*, 2014; Mühlroth *et al.*, 2017; Shemi *et al.*, 2016), certains de ces points seront abordés dans le chapitre suivant.

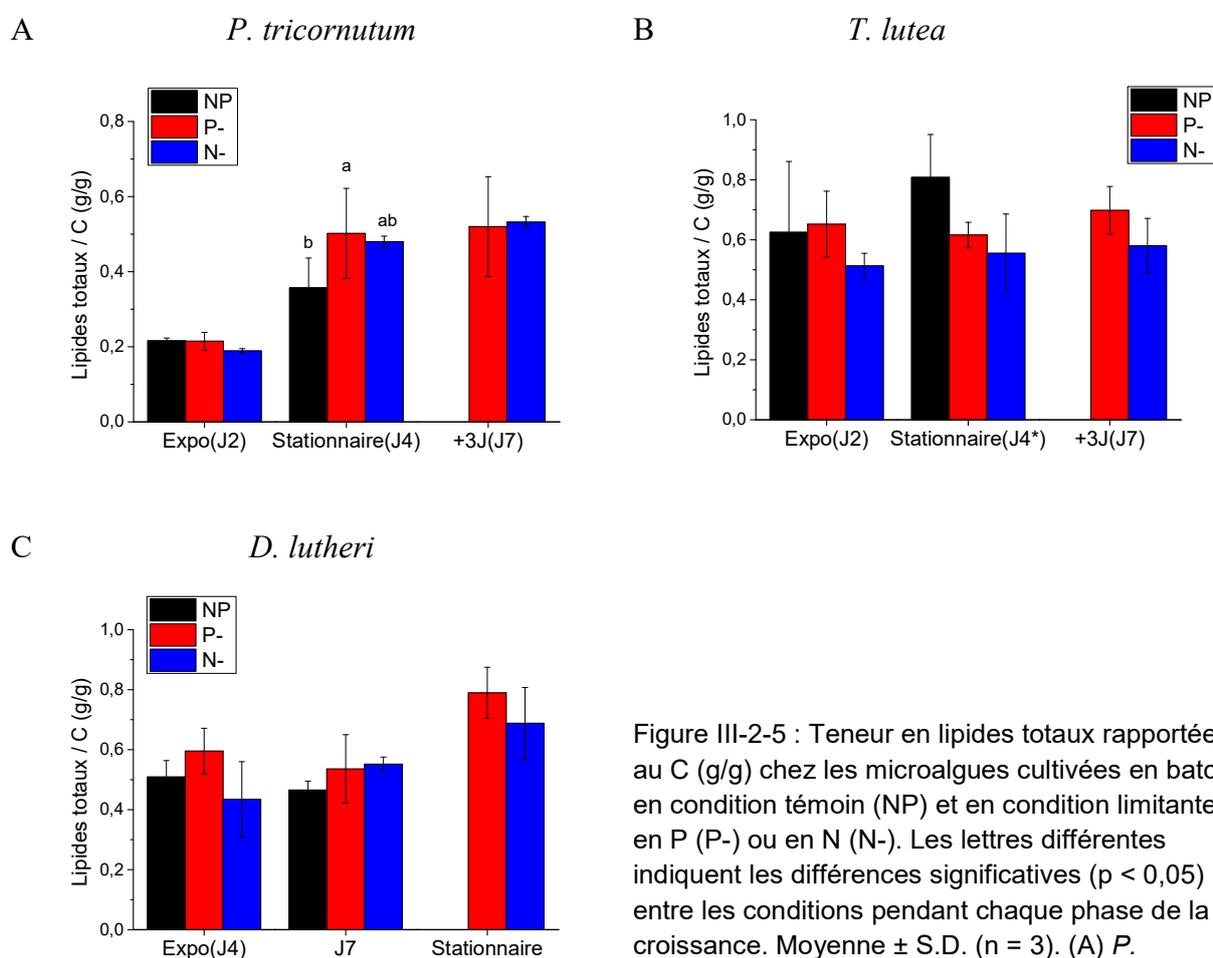


Figure III-2-5 : Teneur en lipides totaux rapportée au C (g/g) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

III.2.5 Conclusion

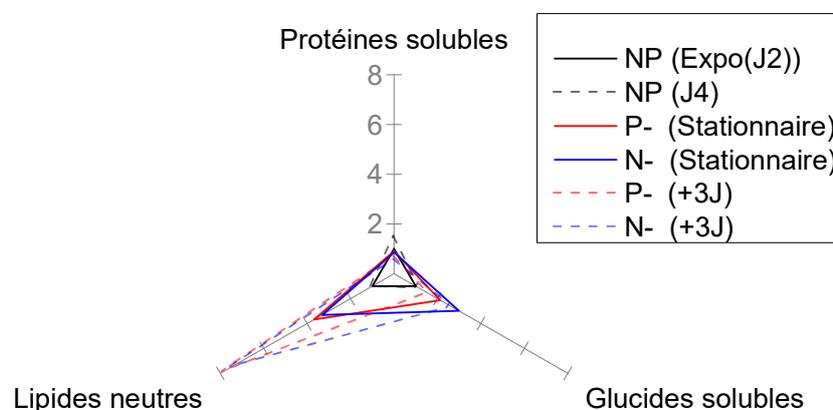
Les limitations en P et en N perturbent l'ensemble du métabolisme cellulaire, et provoquent des réorientations métaboliques de façon spécifique. Les deux limitations inhibent la synthèse des protéines et stimulent l'accumulation des lipides neutres et / ou des glucides (Figure III-2-6).

Les glucides sont considérés comme le stockage primaire d'énergie, le flux de C est orienté vers la biosynthèse des glucides au début des limitations nutritives chez *P. tricornutum* et *T. lutea*. Outre l'accumulation des glucides, la limitation en P oriente le C vers le métabolisme énergétique qui intervient dans la formation de l'acétyl-CoA et du NADPH, favorisant ainsi la biosynthèse des lipides. Les carences entraînent le passage d'un métabolisme gluconéogénique à un métabolisme glycolytique, le flux de C se réorientant vers la biosynthèse des lipides neutres en particulier pendant la phase stationnaire. La limitation en P joue un rôle similaire à la limitation en N sur l'allocation du C vers les lipides neutres. L'accumulation des lipides neutres dépend de l'accumulation du C cellulaire et de la phase de croissance. Une efficacité de la fixation du C chez *P. tricornutum* et *T. lutea* en condition de limitation en P favorise par conséquent l'accumulation des lipides neutres dans la cellule.

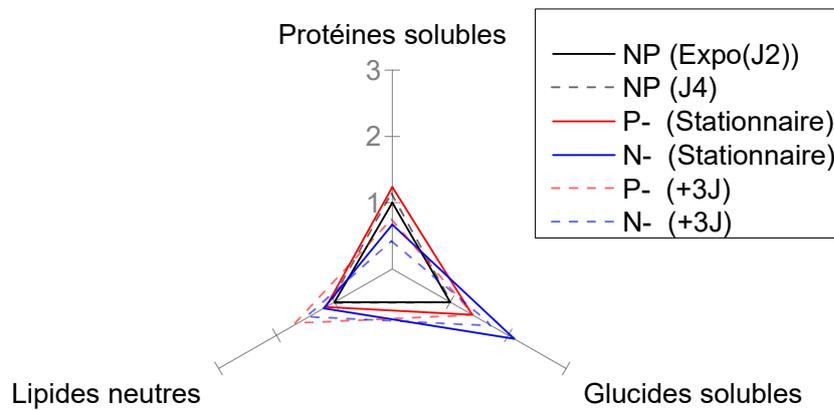
Les lipides neutres constituent le principal réservoir d'allocation du C chez *P. tricornutum* et *D. lutheri* dans le cas d'une limitation nutritive tandis que les glucides demeurent le principal réservoir d'allocation du C chez *T. lutea* (Figure III-2-6).

A

P. tricornutum



B

T. lutea

C

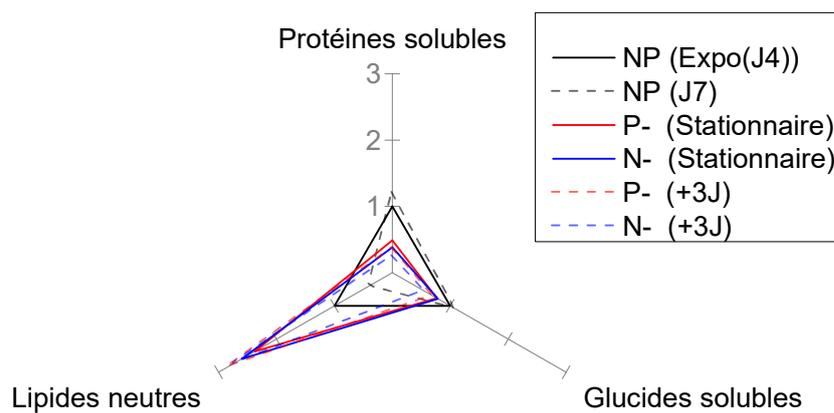
D. lutheri

Figure III-2-6 : Orientation du métabolisme du carbone vers les protéines solubles, les glucides solubles et les lipides neutres chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les axes indiquent le facteur d'augmentation ou de diminution par rapport au témoin (NP) en phase de croissance exponentielle (=1). Ces représentations reposent sur les teneurs relatives rapportées au C. (n = 3). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Chapitre 3

Remodelage des lipides polaires

III.3. REMODELAGE DES LIPIDES POLAIRES EN REPONSE A UNE LIMITATION NUTRITIVE EN PHOSPHORE OU EN AZOTE

La limitation nutritive stimule l'accumulation des lipides neutres tandis que les lipides polaires membranaires subissent un remodelage important chez les microalgues marines. Ce chapitre porte sur les analyses qualitatives et quantitatives des lipides polaires et précise les différents modes de remodelage des lipides polaires en réponse à une limitation nutritive en P ou en N.

III.3.1 Caractérisation des lipides polaires

III.3.1.1 Séparation et identification des lipides polaires par CCM bidimensionnelle

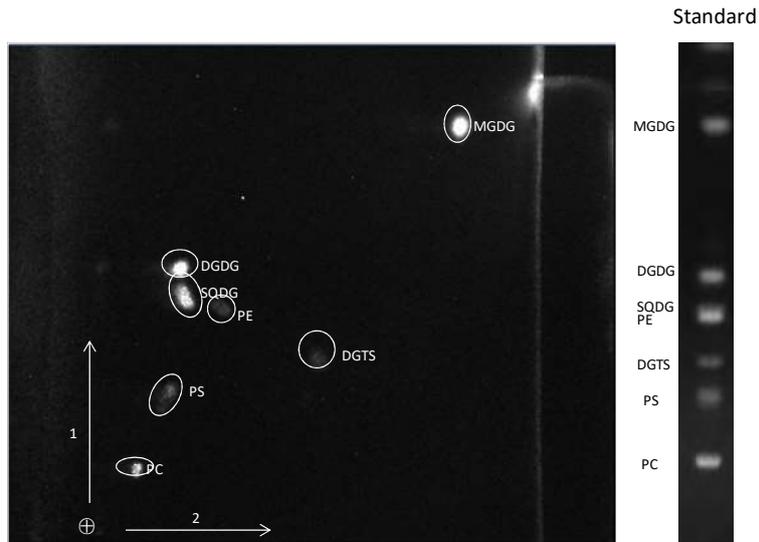
Les différents lipides polaires des microalgues ont été séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) bidimensionnelle. La CCM 2D permet de séparer des mélanges de lipides très complexes (Fuchs *et al.*, 2011). Grâce aux standards lipidiques déposés sur une autre plaque puis en suivant le même protocole de migration, l'identification des lipides est possible après leur révélation en comparant la position de chacun des spots avec celles obtenues avec les standards (Figure III-3-1).

Le réactif au trioxyde de molybdène permet de distinguer les spots de DGCC et PC ainsi que les spots de DGTA et PS en colorant les phospholipides en bleu (Cañavate *et al.*, 2016). Certains spots lipidiques ont aussi été analysés par spectrométrie de masse (LCQ), en exemple, l'analyse de la DGTS (Figure III-3-2).

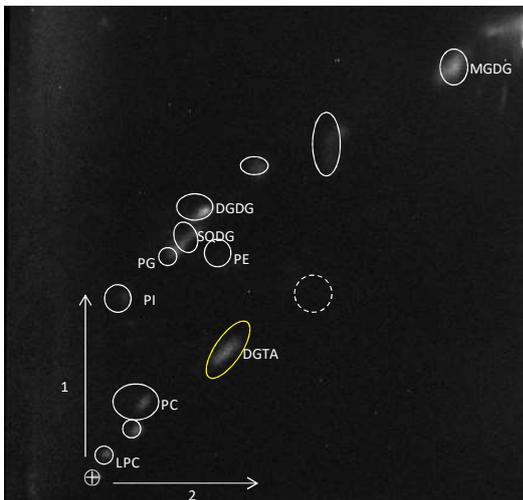
Cependant, des alignements ponctuels ainsi que l'obtention de données quantitatives demeurent difficiles car toutes les séparations ne peuvent pas être réalisées rigoureusement dans les mêmes conditions. Pour cette raison, nous avons privilégié la CCM monodimensionnelle.

A

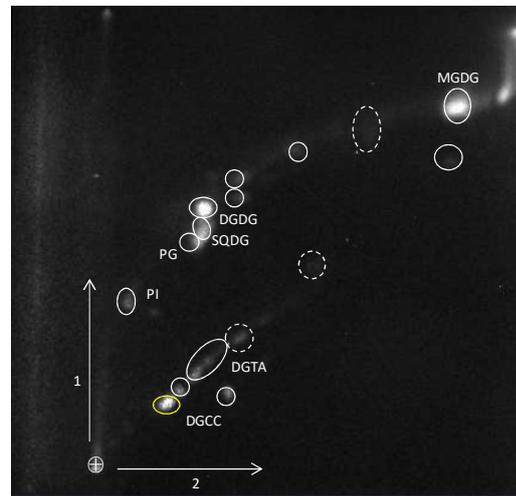
Standard



B

P. tricornutum

C

T. lutea

D

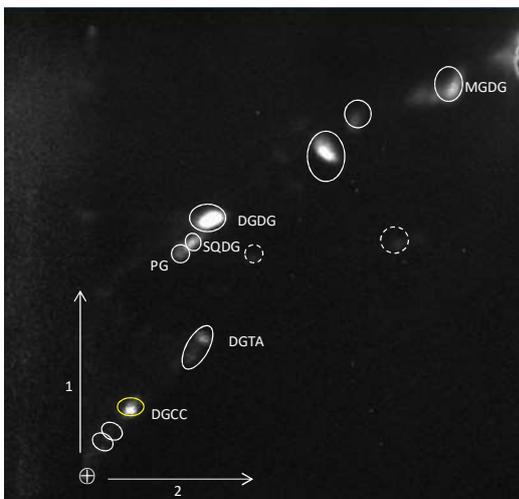
D. lutheri

Figure III-3-1 : Séparation des lipides par CCM bidimensionnelle, La croix indique le dépôt initial, les flèches 1 et 2 représentent la première et la deuxième migration, respectivement. Les spots de lipides sont visualisés sous LED bleue à 530 nm après pulvérisation de primuline. (A) Standard, (B) *P. tricornutum*, (C) *T. lutea*, (D) *D. lutheri*.

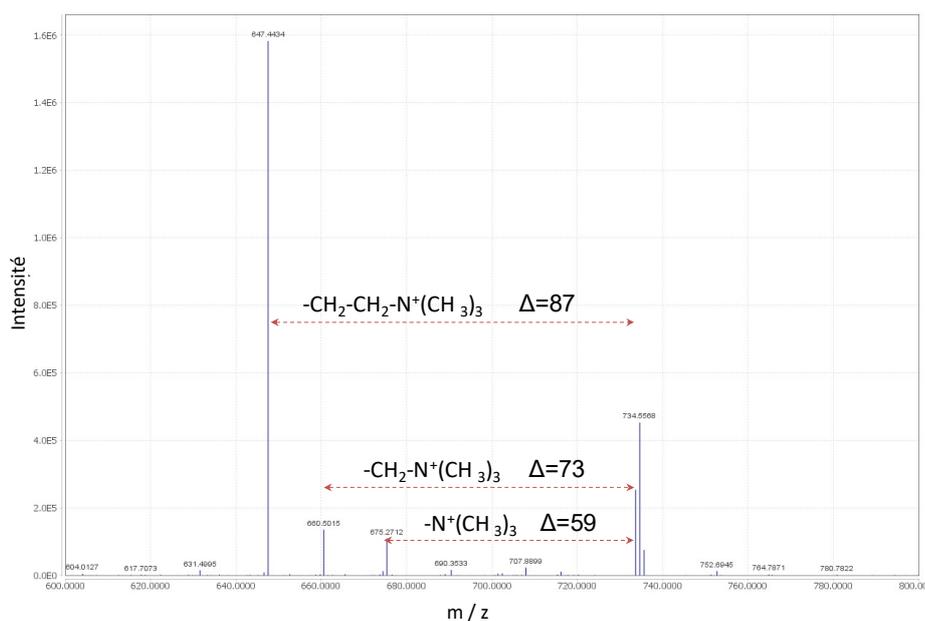


Figure III-3-2 : Spectre de masse ESI / SM / SM obtenu après injection de DGTS standard. L'anion de $m/z = 734,5568$ correspond à $\text{DGTS}+\text{Na}^+$. Les ions obtenus à partir de la molécule initiale ont été analysés pour déterminer la perte de fragments structuraux y compris $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ et $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. La présence d'un fragment caractéristique de $\Delta=87$ permet de déduire la présence de DGTS (Armada *et al.*, 2013).

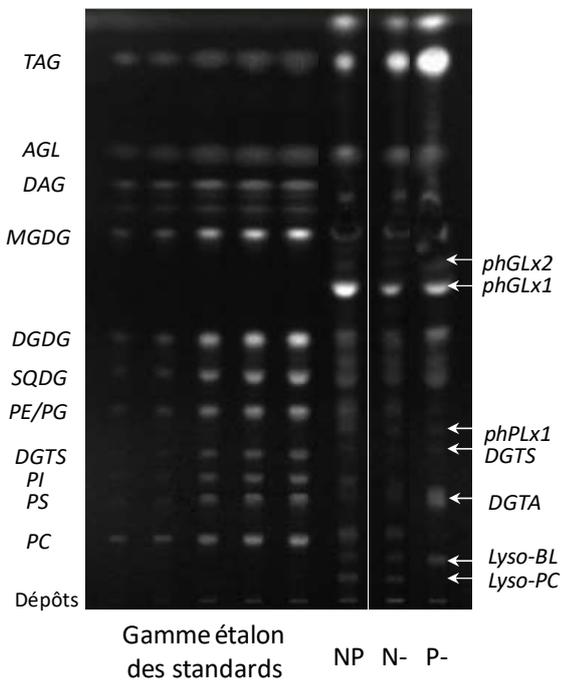
III.3.1.2 Séparation et identification des lipides polaires par CCM monodimensionnelle

L'utilisation de trois mélanges de solvants différents a permis de séparer les lipides dans une seule dimension, cette technique est une alternative à la CCM 2D. Une gamme étalon de standards lipidiques est déposée en parallèle des échantillons de lipides sur les plaques CCM afin d'identifier les différents lipides contenus dans les extraits des microalgues et de déterminer par densitométrie la quantité de lipides contenus dans chacun des spots séparés. L'ordre des standards lipidiques sur la couche mince, du plus polaire au moins polaire, est le suivant : PC, PS, PI, DGTS, PE/PG, SQDG, DGDG, MGDG, DAG, AGL et TAG (Figure III-3-3). Dans cette figure, seuls sont représentés les enregistrements, obtenus au densitomètre, mettant en évidence différents lipides.

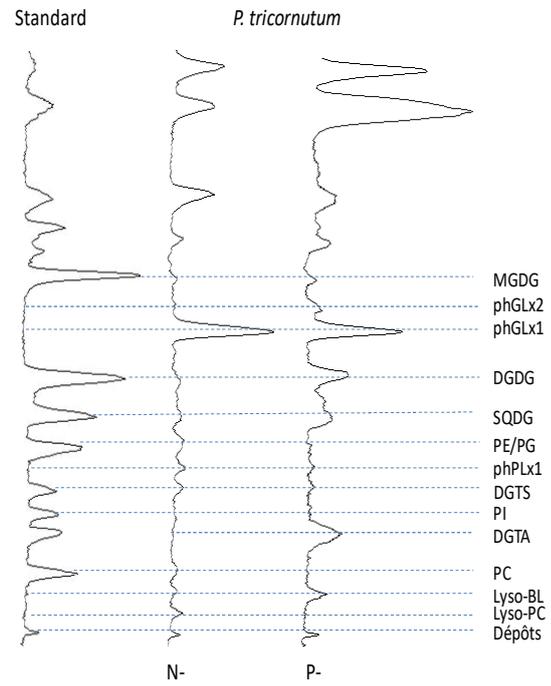
L'analyse qualitative montre que chez *P. tricornutum*, 5 glycolipides différents sont révélés à savoir SQDG, DGDG, MGDG et 2 glycolipides putatifs : phGLx1 et phGLx2. Les phospholipides : PC, PI, PE, PG, lyso-PC et les bétaine lipides : DGTA, DGTS, lyso-BL, peuvent être présents selon les conditions de culture.

A-1

P. tricornutum

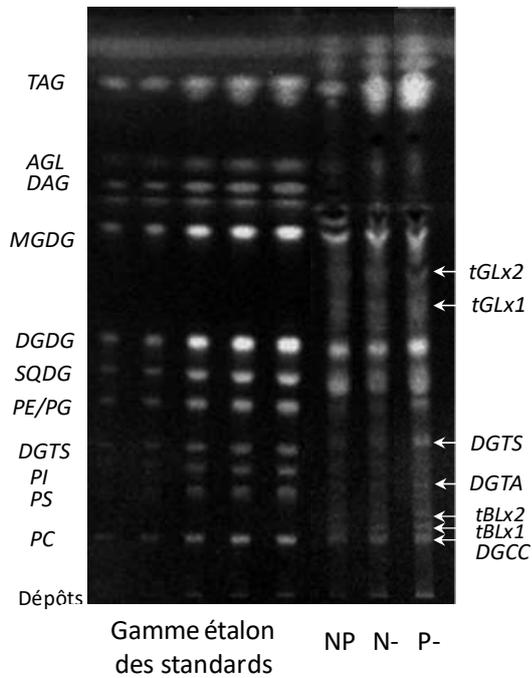


A-2

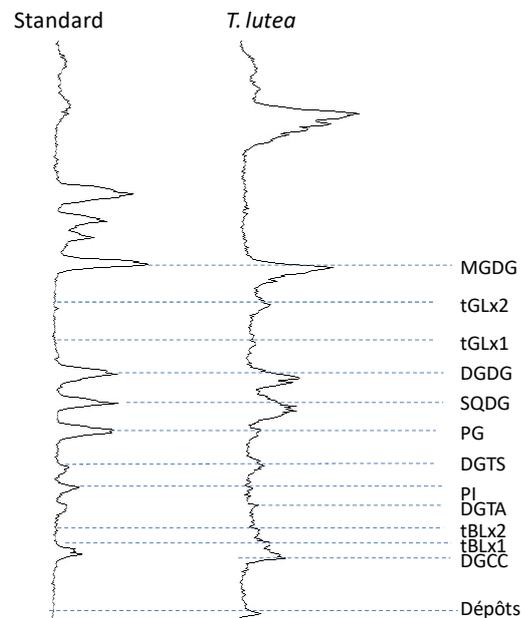


B-1

T. lutea



B-2



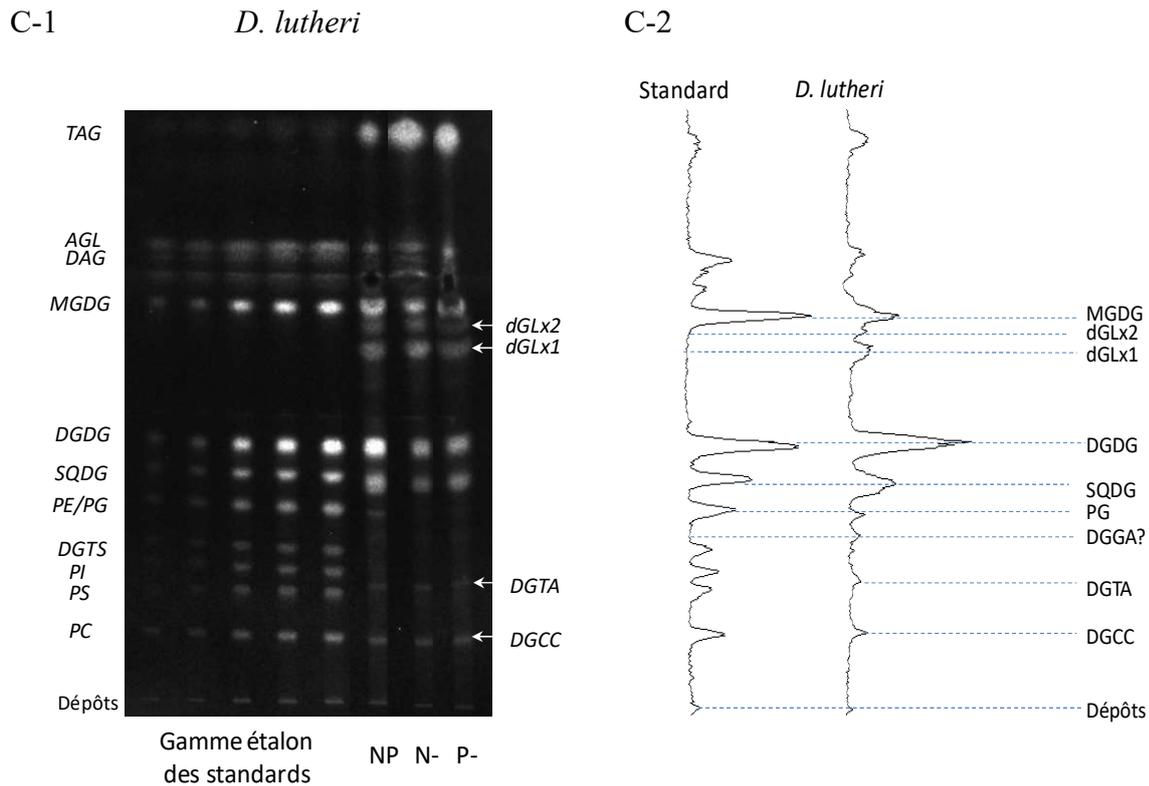


Figure III-3-3 : Séparation et alignement ponctuel des lipides des microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) par CCM monodimensionnelle avec une gamme étalon des standards en parallèle. Les spots de lipides sont visualisés sous LED bleue à 530 nm après pulvérisation de primuline. Les lipides polaires non-standards (y compris les bêtaïne lipides) sont notés à droite. (A) *P. tricornutum* (J7), (B) *T. lutea* (J7), (C) *D. lutheri* (J11).

Chez *T. lutea*, 5 glycolipides différents ont été séparés, avec SQDG, DGDG et MGDG en tant que composés principaux. En raison de la superposition de bandes et d'un alignement incorrect avec les standards, l'identification des phospholipides et des bêtaïne lipides n'a cependant pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Avec la méthode utilisée, nous n'avons pas détecté de PC alors que PI et PG (PE n'est pas présente sur la plaque de CCM 2D) sont les phospholipides majeurs chez *T. lutea*. Cinq bêtaïne lipides différents ont été mis en évidence, comprenant DGCC, DGTA, DGTS et 2 bêtaïne lipides putatifs : tBLx1 et tBLx2.

Chez *D. lutheri*, 5 glycolipides ont été révélés, SQDG, DGDG et MGDG sont les composés principaux. PG est le seul phospholipide détecté. Les bêtaïne lipides : DGCC, DGTA, ainsi que la diacylglycérilglucuronide (DGGA) sont les lipides principaux dans la membrane non-plastidiale, ce résultat est en adéquation avec la littérature (Eichenberger et Gripi, 1997; Kato *et al.*, 1996).

III.3.1.3 Classes des lipides polaires

La composition des lipides polaires varie selon les espèces et les conditions de culture. L'analyse en composantes principales (ACP) d'échantillons de microalgues cultivées dans les trois conditions différentes en utilisant toutes les classes lipidiques rapportées au C comme variables descripteurs reflète la variabilité de la composition lipidique chez les espèces étudiées (Figure III-3-4A). Dim 1 indique la principale source de variation chez les trois espèces. Il est négativement corrélé au contenu en phospholipides (PL). *T. lutea* et *D. lutheri* possèdent un score plus ou moins positif sur Dim 1 en raison d'une faible teneur en PL, tandis que les résultats pour *P. tricornutum* se répartissent en deux groupes. Le premier groupe de *P. tricornutum* possède la corrélation négative la plus forte avec Dim 1, il s'agit des cellules cultivées en condition témoin et en limitation azotée, avec la teneur en PL la plus élevée. L'autre groupe de *P. tricornutum* présente une corrélation positive avec Dim 1, il s'agit des cellules cultivées en condition de limitation en P, les PL sont fortement réduits et remplacés par les bêtaïne lipides (BL) et / ou glycolipides (GL). La répartition extrême de *P. tricornutum* sur Dim 1 révèle que cette espèce est celle qui s'adapte le plus aux variations de teneur en P.

Dim 2 est moins représentatif, *T. lutea* est placée du côté négatif de l'axe en raison de la corrélation plus élevée avec la teneur en BL tandis que *D. lutheri* est située du côté positif sur Dim 2, suggérant que la teneur en GL et / ou lipides neutres est plus élevée.

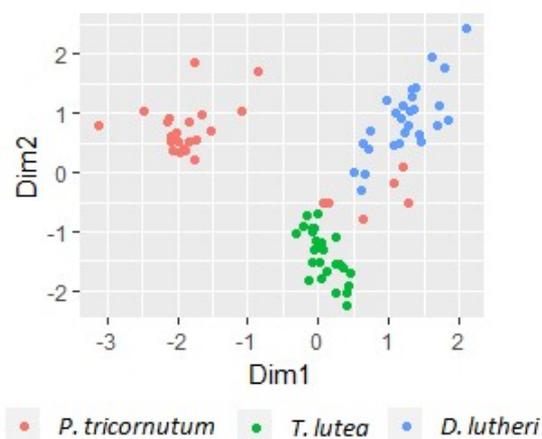
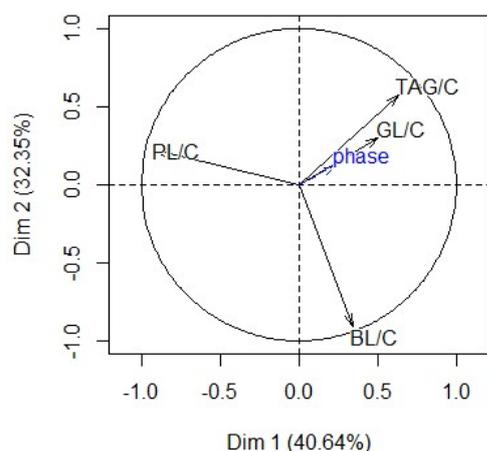
L'ACP réalisée sur chaque espèce nous permet de mieux comprendre la variabilité de la composition des différentes classes lipidiques en fonction de la limitation nutritive. Chez *P. tricornutum* (Figure III-3-4B), Dim 1 représente 54,6 % de la variation totale avec les PL et BL situés des deux côtés. Cela signifie une forte corrélation négative entre les deux classes lipidiques. Le nuage de points correspondant aux cultures P- est statistiquement distinct des autres conditions, suggérant une forte modification des lipides polaires à savoir une augmentation des teneurs en BL et GL au détriment des PL. Le nuage de points correspondant aux cultures N- chevauche partiellement celui des cultures témoins.

Chez *T. lutea* (Figure III-3-4C), les PL sont moins corrélés avec les BL mais ils sont fortement corrélés positivement avec les GL, tandis que les lipides neutres sont positionnés à l'opposé des GL et PL. Les nuages de points correspondant aux trois conditions sont superposés, ce qui signifie que la composition des lipides polaires varie peu en fonction de la limitation nutritive.

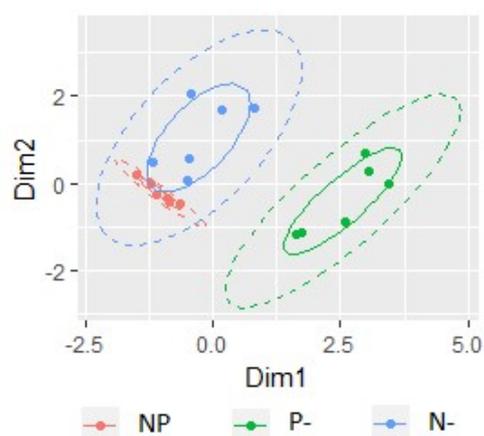
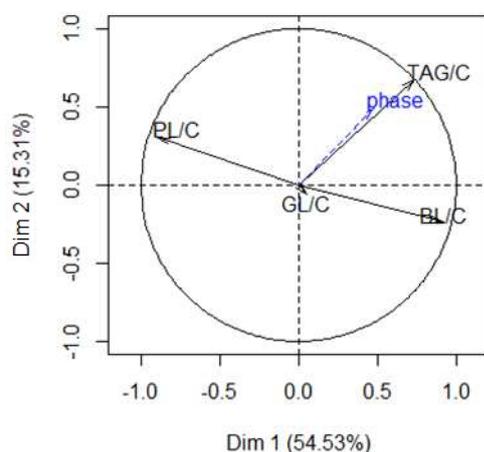
En ce qui concerne *D. lutheri* (Figure III-3-4D), les PL sont corrélés positivement avec les BL et GL. Les lipides polaires sont positionnés à l'opposé de l'accumulation des lipides neutres. La limitation nutritive a tendance à diminuer la teneur en lipides polaires et à stimuler l'accumulation des lipides neutres. Le nuage de points correspondant aux cultures P- chevauche partiellement celui des cultures N-, cela pourrait être lié à l'épuisement de NO_3^- dans les milieux P- dès l'apparition de la carence.

Les limitations en P et en N ont tendance à induire des modifications dans la composition des lipides polaires chez les microalgues étudiées qui conduisent à un remodelage au niveau des membranes des thylacoïdes et / ou de la membrane non-plastidiale.

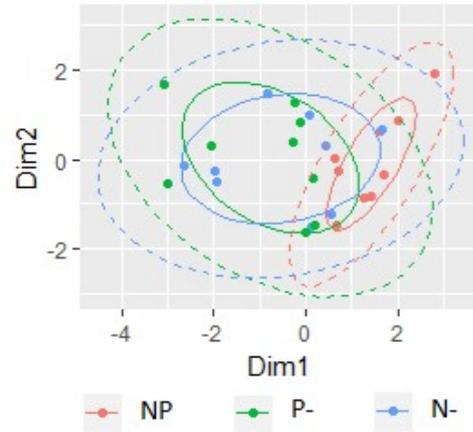
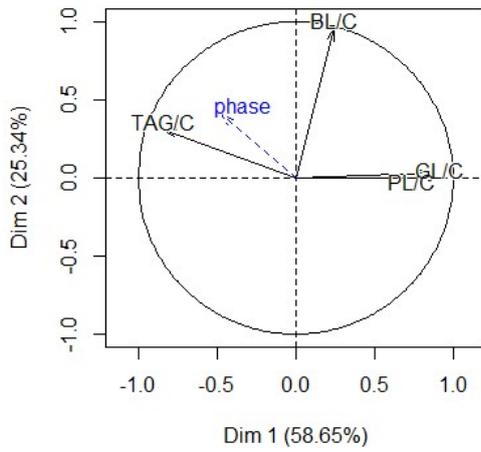
A



B

P. tricornutum

C

T. lutea

D

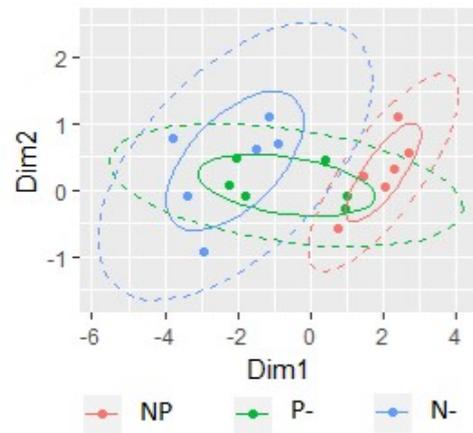
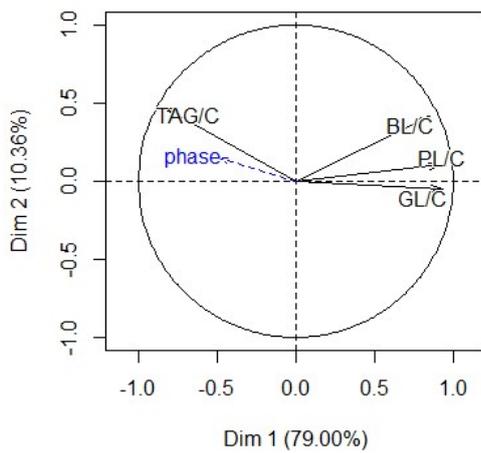
D. lutheri

Figure III-3-4 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée avec les classes lipidiques rapportées au C comme variables chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). (A) En fonction des espèces, (B) *P. tricornutum*, (C) *T. lutea*, (D) *D. lutheri* en fonction de la limitation nutritive. Les nuages de points reliés par une ligne continue et une ligne pointillée indiquent la zone de confiance à 68% et 95%, respectivement.

III.3.2 Impacts d'une limitation en P ou en N sur le remodelage des lipides plastidiaux

La composition lipidique des membranes thylacoïdales est unique et hautement conservée chez les organismes réalisant la photosynthèse oxygénée. Les glycolipides ainsi que le PG sont les lipides majeurs dans ces membranes (Kobayashi *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2010). La limitation en P ou en N induit le remodelage des lipides plastidiaux.

III.3.2.1 Remodelage des lipides plastidiaux chez *P. tricornutum*

La teneur en lipides plastidiaux totaux reste stable en condition NP (voir Annexe 5 Figure A-9A). En condition de limitation en N, la teneur en lipides plastidiaux totaux a diminué de 22 % au début de la phase stationnaire (J4) par rapport aux cellules témoins au J2, et elle continue de diminuer au cours de la phase stationnaire. Cette diminution est principalement due à la baisse de teneur en phGLx1 tandis que les autres lipides sont restés relativement constants (voir Annexe 5 Figure A-9A). Le phGLx1 est le glycolipide le plus abondant chez *P. tricornutum*, il s'agit probablement d'un dérivé du MGDG, l'ensemble constitue la majeure partie de la bicouche lipidique des membranes thylacoïdales. Étant donné que le MGDG (phGLx1) est important dans la photoprotection en favorisant le cycle des xanthophylles (Aronsson *et al.*, 2008; Jahns *et al.*, 2009; Lepetit *et al.*, 2012; Wilhelm *et al.*, 2014), la diminution de teneur en MGDG (phGLx1) pourrait aussi être liée au NPQ moins élevé mesuré en condition de limitation en N (voir chapitre 1).

La composition des membranes thylacoïdales a 23 % de dissemblance au début de la phase stationnaire avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 1$, $p = 0,001$) et 33 % de dissemblance dès qu'il y a carence (phase stationnaire + 3J) avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 1$, $p = 0,001$) comparée aux cellules au J2. La diminution de la teneur en MGDG (phGLx1) a contribué pour plus de 45 % à la dissemblance totale (Figure III-3-5). Selon Boudière *et al.* (2014), la désorganisation des membranes thylacoïdales engendre souvent une altération de la photosynthèse (voir chapitre 1).

La teneur en lipides plastidiaux totaux est maintenue sous limitation en P. Cependant, la teneur en PG est fortement diminuée : 81 et 86 % de réduction au J4 et J7 respectivement par rapport aux cellules témoins au J2. Des augmentations de la teneur en SQDG sont observées (voir Annexe 5 Figure A-9A), en accord avec des études antérieures (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2017b; Shemi *et al.*, 2016), elles pourraient compenser en partie l'absence de PG (Jouhet *et*

al., 2009). En raison de l'accumulation du C cellulaire, cette augmentation de teneur en SQDG rapportée au C ne montre aucune différence significative par rapport aux cellules témoins (données non présentées). Cañavate *et al.* (2017b) suggèrent que le remplacement de PG par SQDG ne devrait pas être considéré comme un processus important de remodelage des lipides impliqué dans la réponse à la pénurie de P chez les microalgues.

La composition des membranes thylacoïdales présente 20 % de dissemblance au début de la phase stationnaire avec une forte différence globale (ANOSIM R = 0,963, p = 0,001) et 26 % de dissemblance dès qu'il y a carence (phase stationnaire + 3J) avec une différence globale plus importante (ANOSIM R = 1, p = 0,001), comparée aux cellules au J2. Malgré tout, une augmentation significative de la proportion en SQDG dans les lipides plastidiaux totaux est observée (Figure III-3-5). Cette substitution de PG par SQDG a contribué pour plus de 45 % à la dissemblance totale. Cela permettrait au chloroplaste de maintenir la teneur globale en lipides chargés négativement à un niveau constant (Sato *et al.*, 2000).

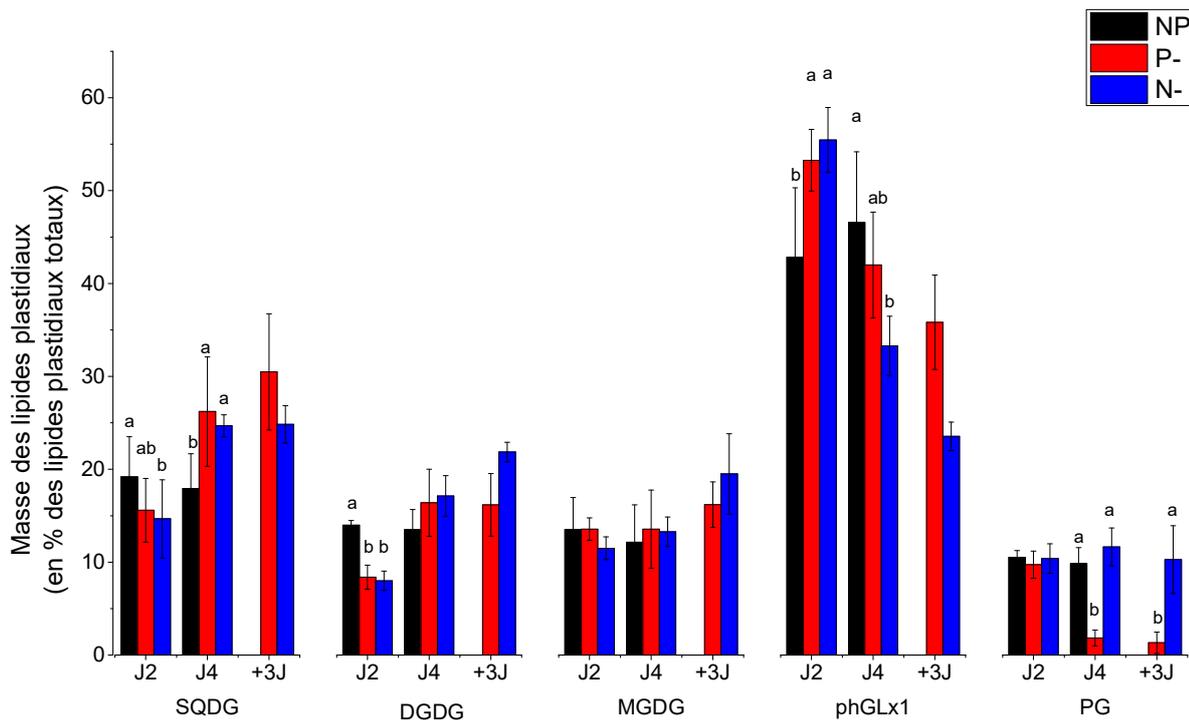


Figure III-3-5 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes thylacoïdales chez *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne ± S.D. (n = 3). J2 : phase exponentielle, J4 : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire + 3 jours.

III.3.2.2 Remodelage des lipides plastidiaux chez *T. lutea*

La limitation en N provoque une désorganisation des membranes thylacoïdales : 10 % de dissemblance au début de la phase stationnaire avec une différence globale nulle (ANOSIM $R = 0$, $p = 0,006$) et 22 % de dissemblance après 3 jours en phase stationnaire avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,9259$, $p = 0,001$), comparé aux cellules NP au J2 (Figure III-3-6). Cette désorganisation est principalement due à la diminution de la teneur du SQDG (contribuant pour environ 50 % de la dissemblance totale dès qu'il y a carence), la teneur en SQDG a diminué de 68 % au J7 par rapport aux cellules au J2 (voir Annexe 5 Figure A-10A). SQDG est un glycolipide anionique avec une charge négative sur la tête hydrophile qui est important pour le fonctionnement et la structure du chloroplaste (Kobayashi *et al.*, 2016; Yu et Benning, 2003). Le déficit en SQDG pourrait diminuer l'efficacité du transport d'électrons, compromettant ainsi l'activité du PSII (Minoda *et al.*, 2003). Les teneurs cellulaires en DGDG, MGDG et PG sont restées relativement constantes au cours de culture (voir Annexe 5 Figure A-10A).

Par ailleurs, le SQDG est le glycolipide le plus abondant chez *T. lutea*. Il pourrait inhiber fortement la dé-époxydation de la diadinoxanthine (Dd) (Goss *et al.*, 2009; Lepetit *et al.*, 2012; Wilhelm *et al.*, 2014). La forte teneur en SQDG est à mettre en relation avec le faible NPQ mesuré chez cette espèce (voir chapitre 1).

La composition des membranes thylacoïdales est moins affectée par la limitation en P : 5 % de dissemblance seulement au début de la phase stationnaire avec une différence globale nulle (ANOSIM $R = -0,222$, $p = 0,009$) et 7 % de dissemblance après 3 jours en phase stationnaire avec une très faible différence globale (ANOSIM $R = 0,2593$, $p = 0,002$), comparée aux cellules NP au J2 (Figure III-3-6). Le maintien de la composition lipidique des membranes des thylacoïdes pourrait contribuer à conserver une forte capacité photochimique en condition de limitation en P (voir chapitre 1). Il est intéressant de noter que les teneurs cellulaires en DGDG, MGDG et PG ont augmenté en condition de limitation en P (voir Annexe 5 Figure A-10A), tandis que leurs teneurs rapportées au C ont tendance à diminuer pendant la phase stationnaire (données non présentées). L'orientation du flux de carbone vers la synthèse de lipides polaires plastidiaux est très limitée sous condition nutritive limitante.

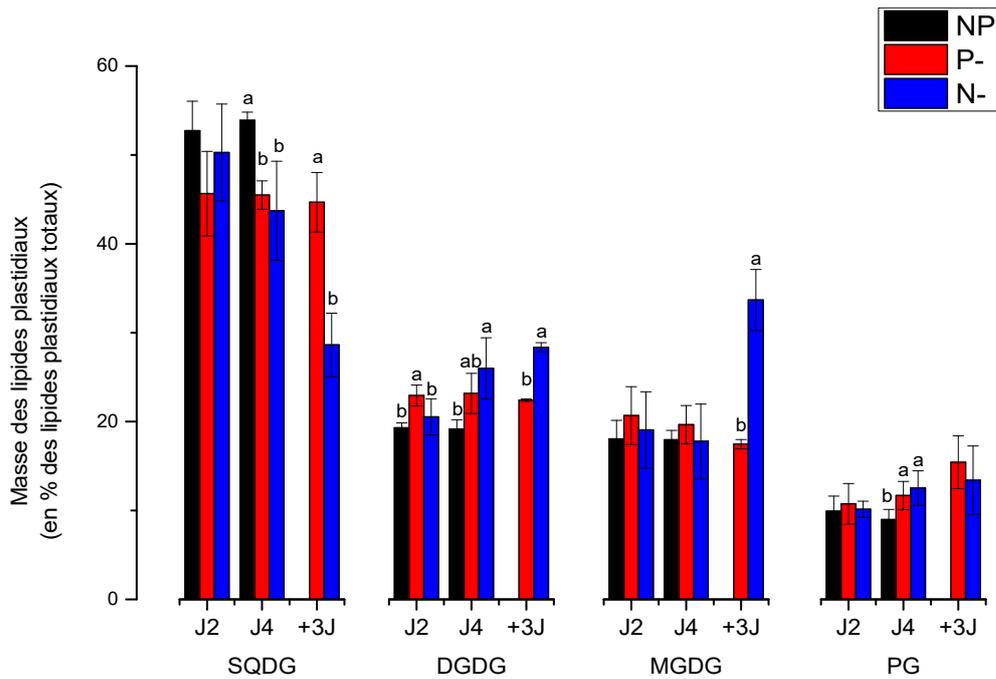


Figure III-3-6 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes thylacoïdales chez *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). J2 : phase exponentielle, J4 : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire + 3 jours.

III.3.2.3 Remodelage des lipides plastidiaux chez *D. lutheri*

La teneur en lipides plastidiaux totaux a fortement diminué en condition de limitation en N. Les lipides les plus présents, MGDG, DGDG, SQDG et PG, ont tous leur teneur significativement diminuée pendant la phase stationnaire (J7) (voir Annexe 5 Figure A-11A). Le SQDG semble plus sensible à la limitation en N, sa teneur cellulaire est plus faible par rapport à celle des cellules NP à partir de la phase exponentielle (J4). La composition des membranes thylacoïdales présente 14 % de dissemblance au début de la phase stationnaire avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,8519$, $p = 0,001$), comparée aux cellules témoins au J4 (Figure III-3-7).

La limitation en P a tendance à maintenir les teneurs en lipides plastidiaux mais la teneur en PG est significativement abaissée au J7 (voir Annexe 5 Figure A-11A). Toutefois, cette baisse de la teneur en PG représente seulement 1,5 % de dissemblance au J7, comparée aux cellules NP au J4, sans différence globale (ANOSIM $R = -0,0741$, $p = 0,006$) (Figure III-3-7). Néanmoins, dès le début de la phase stationnaire, les teneurs en glycolipides (MGDG, DGDG, SQDG) sont fortement diminuées, ce qui a provoqué une désorganisation des membranes thylacoïdales plus

importante : 11 % de dissemblance avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,8519$, $p = 0,001$), comparée aux cellules témoins au J4 ; mais très proche de la mono-limitation en N : 8 % de dissemblance avec une différence globale faible (ANOSIM $R = 0,3333$, $p = 0,002$), comparée aux cellules N- au J7 (Figure III-3-7).

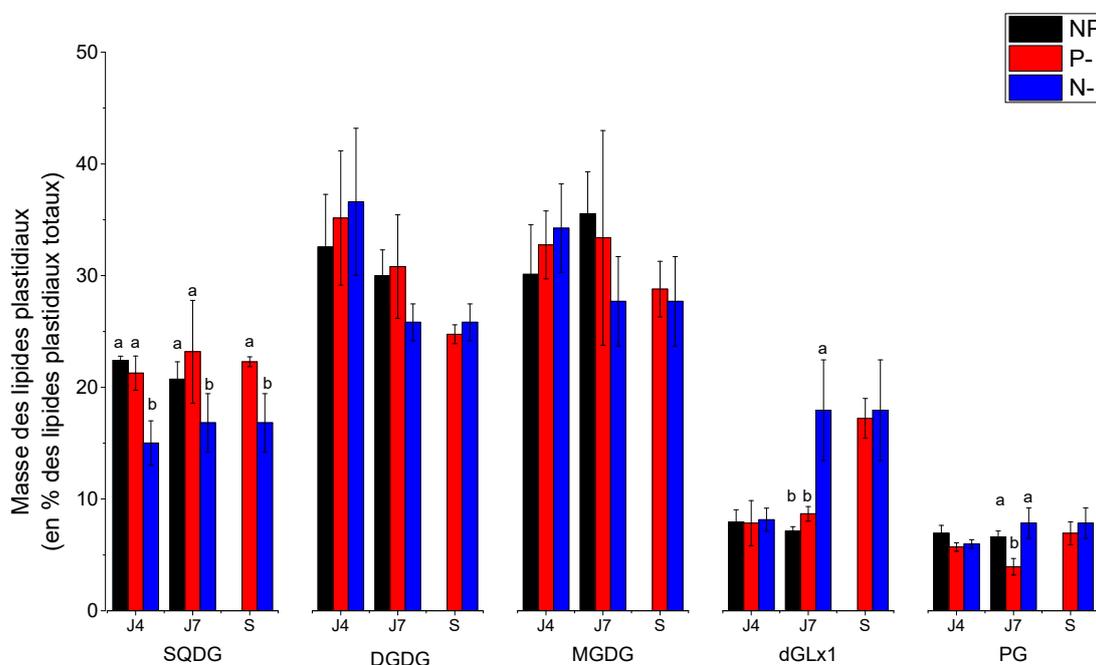


Figure III-3-7 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes thylacoïdales chez *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). J4 : phase exponentielle, S : début de la phase stationnaire.

III.3.3 Impacts d'une limitation en P ou en N sur le remodelage des lipides non-plastidiaux

La composition en lipides non-plastidiaux varie selon les espèces. En général, les phospholipides constituent la composante principale des lipides des membranes non-plastidiales, notamment dans les conditions de culture habituelle, tandis que les bétaine lipides ne sont présents que chez certaines espèces. La composition lipidique de la membrane non-plastidiales est affectée par la limitation en P ou en N.

III.3.3.1 Remodelage des lipides non-plastidiaux chez *P. tricornutum*

Les lipides non-plastidiaux chez *P. tricornutum* sont constitués de PL et BL. En général, la teneur cellulaire en PL est moins affectée en condition de limitation en N, même si elle a

tendance à diminuer au cours de la phase stationnaire. Cette diminution se traduit principalement par la baisse de la teneur en PI au début de la phase stationnaire (-39 % par rapport aux cellules témoins au J2), puis par celle de la teneur en lyso-PC dès qu'il y a carence sévère (phase stationnaire + 3J) (-81 % par rapport aux cellules témoins au J2), tandis que la teneur cellulaire en PC demeure constante (voir Annexe 5 Figure A-9B). Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude précédente (Popko *et al.*, 2016), la diminution des lyso-PC a probablement contribué à l'accumulation de TAG. Les bêtaine lipides sont considérés comme les principaux composés remplaçant des PL dans les membranes non plastidiales (Abida *et al.*, 2015; Cañavate *et al.*, 2016, 2017b, 2017a). Les teneurs en DGTA et en lyso-BL n'ont pas varié par rapport à celles des cultures NP. La teneur en DGTS est plus élevée pendant la phase exponentielle, mais fortement abaissée au cours de la phase stationnaire (voir Annexe 5 Figure A-9B). Selon Popko *et al.* (2016), la DGTS pourrait être une source majeure pour la synthèse de TAG.

La composition des lipides non-plastidiaux montre 19 % de dissemblance avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,9259$, $p = 0,001$) au début de la phase stationnaire et 32 % de dissemblance dès l'apparition de la carence (phase stationnaire + 3J) avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,8519$, $p = 0,001$), comparée aux cellules témoins au J2 (Figure III-3-8).

Comme attendu, la limitation en P entraîne une disparition presque complète des PL chez *P. tricornutum*. La teneur en PL baisse de 91 % au début de la phase stationnaire (PC : -98 %, Lyso-PC : -90 %, PI : -97 %, PE : -81 %) et continue de diminuer à -95 % au J7 (PC : non détecté, Lyso-PC : non détecté, PI : -98 %, PE : -86 %), comparée aux cellules témoins au J2 (voir Annexe 5 Figure A-9B). La teneur en BL compense la diminution des PL. La teneur cellulaire en DGTA a augmenté 1,2 fois au J2, 17,4 fois au début de phase stationnaire (J4) et 22,1 fois en situation de carence (J7, phase stationnaire + 3J). La teneur cellulaire en Lyso-BL a aussi augmenté 2,6 fois au J2, 6,6 fois au J4 et 6,4 fois au J7 respectivement (voir Annexe 5 Figure A-9B). L'augmentation concomitante de la DGTA et la diminution des PL sont en accord avec les études de Abida *et al.* (2015) et Cañavate *et al.* (2017b), suggérant que le remplacement des PL par la DGTA est une réorientation métabolique essentielle chez *P. tricornutum* face à la limitation en P. La dégradation des PL permet aux cellules de séquestrer suffisamment de P pour survivre et même se développer dans des conditions de faible disponibilité en P.

La composition des lipides non-plastidiaux présente 75 % de dissemblance au début de la phase stationnaire avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 1$, $p = 0,001$) et 70 % de dissemblance dès qu'il y a carence (phase stationnaire + 3J) avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 1$, $p = 0,001$), comparée aux cellules témoins à J2 (Figure III-3-8).

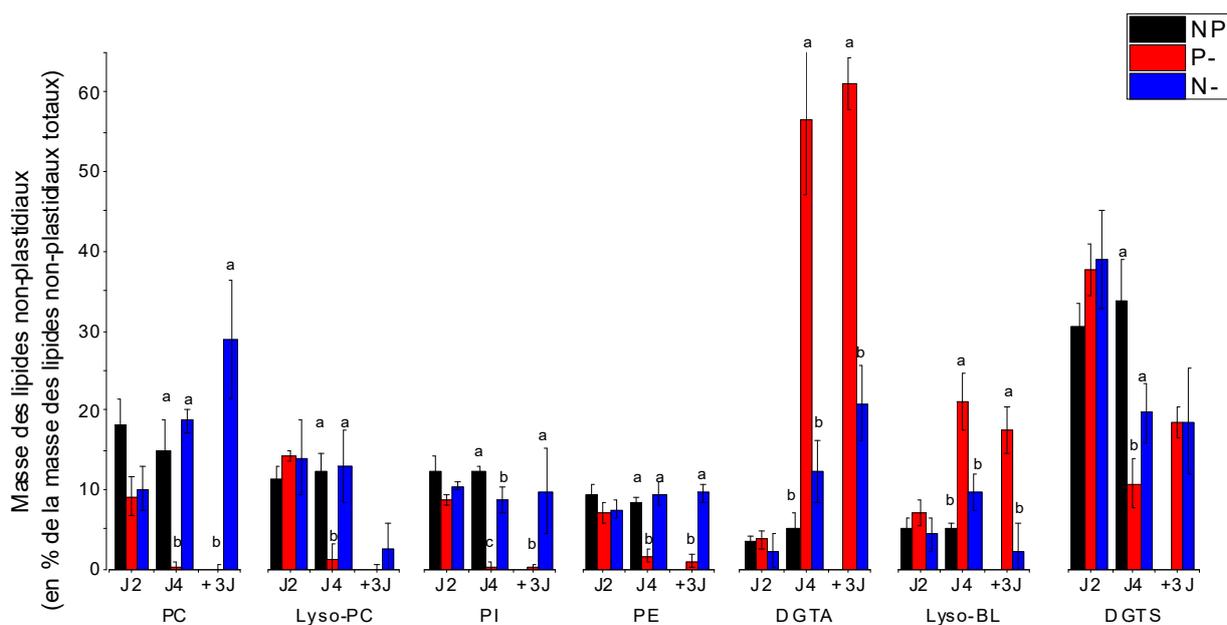


Figure III-3-8 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes non-plastidiales chez *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). J2 : phase exponentielle, J4 : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire + 3 jours.

III.3.3.2 Remodelage des lipides non-plastidiaux chez *T. lutea*

Les bêtaïne lipides constituent les principaux lipides des membranes non-plastidiales chez *T. lutea*, la DGCC est le lipide majeur et représente 24 à 34 % des lipides non-plastidiaux totaux dans toutes les conditions expérimentales tandis que les phospholipides restent à un niveau très bas.

En condition de limitation en N, la composition de la membrane non-plastidiale a montré 16 % de dissemblance au début de la phase stationnaire (J4) sans différence globale (ANOSIM $R = -0,1481$, $p = 0,007$) et 17 % de dissemblance en cas de carence (J7) avec une différence globale modérée (ANOSIM $R = 0,4815$, $p = 0,001$), comparée aux cellules au J2 (Figure III-3-9). La proportion de BL n'a pas été modifiée par rapport à celle des cellules NP. Cette dissemblance accrue est principalement due à l'augmentation de DGTS (contribuant pour plus de 40 % de dissemblance totale), la teneur cellulaire en DGTS a augmenté 2,3 et 1,9 fois au J4 et J7 respectivement par rapport aux cultures témoins au J2. Chez *Chlamydomonas* comme chez *P. tricornutum*, la DGTS est considérée comme une source majeure d'acides gras pour la synthèse des TAG (Popko *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). L'augmentation de DGTS pourrait être liée à

l'accumulation des TAG. La teneur en PI est restée inchangée pendant la limitation en N (voir Annexe 5 Figure A-10B).

Comme attendu, la limitation en P a fortement réduit la teneur en PI (- 33 % au J2, -59 % au J4 et -63 % au J7). En revanche, les cellules présentent une augmentation significative de la teneur cellulaire en BL (voir Annexe 5 Figure A-10B), tandis que les teneurs rapportées au C demeurent souvent constantes ou diminuées (données non présentées). La composition de la membrane non-plastidiale montre une dissemblance de 15 % au début de la phase stationnaire avec une différence globale modérée (ANOSIM R = 0,4815, p = 0,001) et 18 % de dissemblance au jour 7 avec une forte différence globale (ANOSIM R = 0,8148, p = 0,001), comparée aux cellules au J2. Comme nous l'avons observé dans les cultures N-limitées, la forte différence globale est principalement due à l'augmentation de DGTS, contribuant pour 38 et 44 % de dissemblance totale au J4 et J7, alors que la diminution de PI n'a contribué que pour 23 et 21 % de la dissemblance au J4 et J7, respectivement (Figure III-3-9).

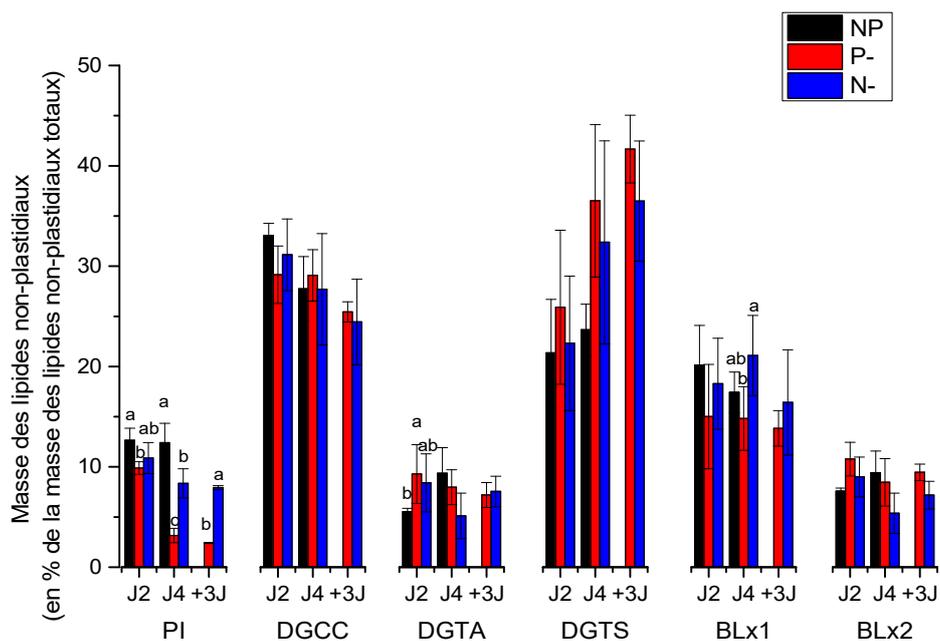


Figure III-3-9 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes non-plastidiales chez *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). J2 : phase exponentielle, J4 : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire+3J.

Par ailleurs, bien que la teneur en PL totaux rapportée au C soit diminuée compte tenu de l'accumulation du C cellulaire, la limitation en P ne réduit pas la teneur cellulaire totale en PL chez *T. lutea* (données non présentées). Comme nous l'avons mentionné précédemment, la diminution de PI dans la membrane non-plastidiale et l'augmentation de la teneur en PG dans la membrane thylacoïdale, l'ensemble suggère un transfert de P de la membrane non-plastidiale au chloroplaste. Ceci permettrait de maintenir une composition lipidique stable dans les membranes thylakoïdales et une capacité photosynthétique relativement élevée sous la limitation en P (voir chapitre 1). Nos résultats confirment l'hypothèse de Cañavate *et al.* (2017b, 2017a) : étant donné les niveaux extrêmement bas des PL constitutifs, ces derniers pourraient ne pas être impliqués dans la régulation du stockage du P. Le faible besoin de P pour le métabolisme lipidique pourrait être un mécanisme d'optimisation de l'adaptation évolutive à la limitation en P, permettant d'allouer le P à d'autres fonctions physiologiques essentielles (Lin *et al.*, 2016; Raven, 2013).

III.3.3.3 Remodelage des lipides non-plastidiaux chez *D. lutheri*

Les membranes non-plastidiales de *D. lutheri* contiennent la DGCC et la DGTA. La DGCC représente le lipide le plus abondant, soit 62 à 78 % des lipides non-plastidiaux totaux dans toutes les conditions expérimentales (Figure III-3-10).

En condition de limitation en N, la teneur en DGCC a tendance à rester plus faible par rapport à celle des cellules témoins dès la phase de croissance exponentielle (J4) (voir Annexe 5 Figure A-11B). La composition des membranes non-plastidiales a montré 10 % de dissemblance au début de la phase stationnaire avec une différence globale modérée (ANOSIM $R = 0,6667$, $p = 0,001$), comparativement aux cellules témoins au J4 (Figure III-3-10).

En condition de limitation en P, les lipides non-plastidiaux ont répondu de la même façon à la limitation en N. La teneur cellulaire en DGCC a tendance à diminuer au J7 (voir Annexe 5 Figure A-11B). Ceci pourrait être dû à la réduction du volume cellulaire car aucune diminution significative rapportée au C n'est observée (données non présentées). La composition lipidique des membranes non-plastidiales reste relativement stable au cours de la limitation en P. Dès le début de la phase stationnaire (J11), elle montre 7 % de dissemblance avec une différence globale modérée (ANOSIM $R = 0,6296$, $p = 0,001$), comparée aux cellules témoins au J4 ; elle est très proche de la limitation en N : 3 % de dissemblance sans différence globale (ANOSIM $R = 0,03704$, $p = 0,004$), comparée aux cellules N- au J7 (Figure III-3-10).

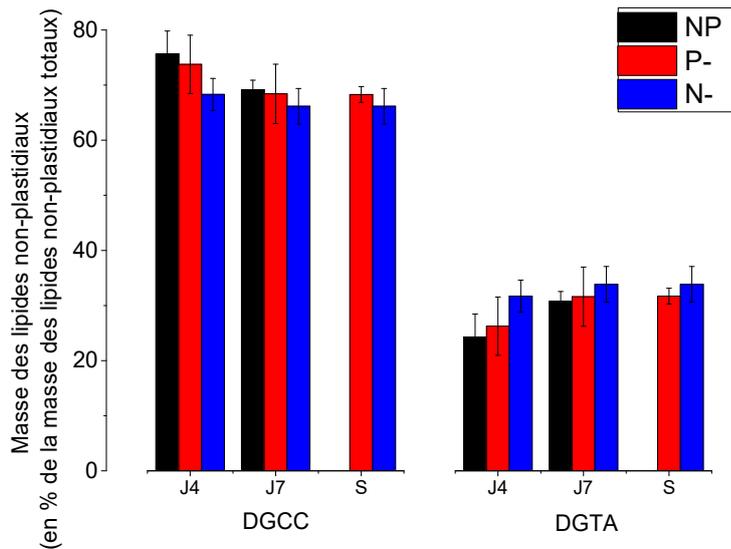


Figure III-3-10 : Distribution et proportion massique des lipides dans les membranes non-plastidiales chez *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). J4 : phase exponentielle, S : début de la phase stationnaire.

III.3.4 Conclusion

La présente étude fournit un profil lipidique global des microalgues marines étudiées. Les limitations nutritives en P et en N induisent un remodelage des lipides membranaires. En général, les membranes des thylacoïdes sont plus affectées par la limitation en N, tandis que la limitation en P joue un rôle plus important sur le remodelage des membranes non-plastidiales (Figure III-3-11).

La substitution des PL par des lipides non-phosphorés semble être une stratégie d'acclimatation spécifique à la limitation en P. Chez *P. tricorutum*, la substitution de PG par SQDG est observée dans les chloroplastes, tandis que la BL de type DGTA remplace de façon concomitante les PL dans les membranes non-plastidiales. Cette dynamique élevée entre les PL et les lipides non-phosphorés pourrait conférer une compétitivité accrue de ces microalgues dans les milieux à faible disponibilité en P.

Chez les Haptophytes (*T. lutea* et *D. lutheri*), en raison du niveau extrêmement bas des PL constitutifs, ceux-ci pourraient ne pas être impliqués dans la régulation du stockage du P. Ce faible besoin de P pour le métabolisme lipidique pourrait être un mécanisme d'optimisation de l'adaptation évolutive à la carence en P.

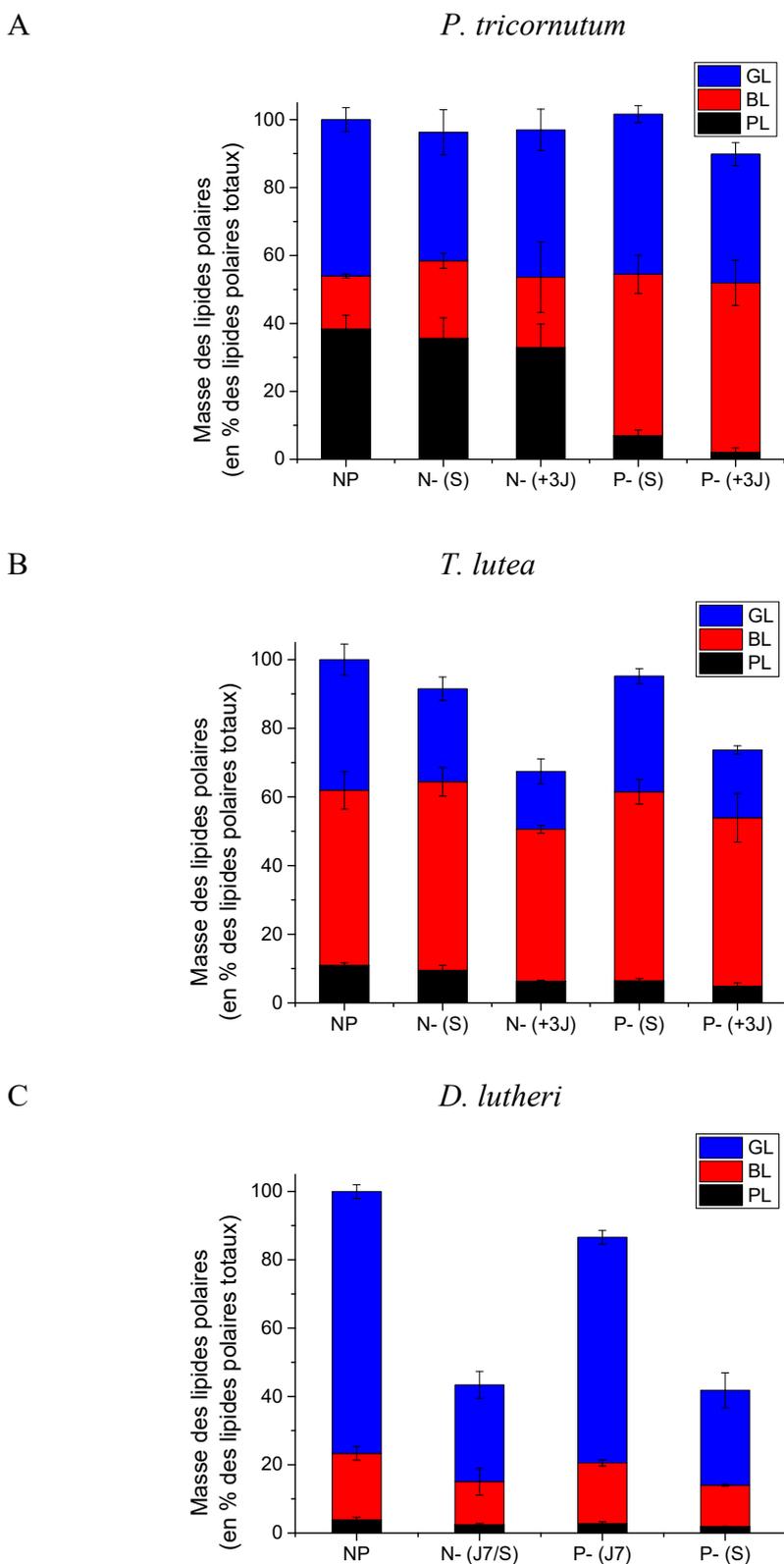


Figure III-3-11 : Proportion massique des classes lipidiques dans les membranes chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) (=100 %) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) rapportée à celle de la condition NP. Ces représentations reposent sur les teneurs relatives rapportées au C. Moyenne \pm S.D. (n = 3). S : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire + 3 jours. (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Chapitre 4

Expression des gènes d'intérêt

III.4 REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DU METABOLISME LIPIDIQUE EN REPONSE A UNE LIMITATION NUTRITIVE EN PHOSPHORE OU EN AZOTE

La limitation nutritive provoque une réorientation du métabolisme lipidique, ce qui se traduit principalement par l'accumulation de lipides neutres et le remodelage des lipides polaires. Pour mieux comprendre cette réorientation métabolique, l'expression des gènes codant 10 enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des TAG et des lipides membranes a été suivie au cours de la croissance de *P. tricornutum* et *T. lutea*. En ce qui concerne *D. lutheri*, dont le génome n'a pas été totalement séquencé, la recherche de gènes d'intérêt de cette espèce n'a pas été entreprise dans le cadre de ce travail.

III.4.1 Expression des gènes d'intérêt chez *P. tricornutum*

III.4.1.1 Choix des gènes d'intérêt

Les gènes codant pour les enzymes candidates du métabolisme des acyl-lipides (voir synthèse bibliographique) ont été recherchés dans les banques de données génomiques disponibles telles que JGI et KEGG (voir matériels et méthodes).

En ce qui concerne la bêtaïne lipide synthase (BTA), une enzyme candidate de *P. tricornutum* Phatr2_42872 (XP_002176772.1) a été choisie grâce à la similarité avec des bêtaïne lipide synthases déjà identifiées chez 8 microalgues et 34 champignons (Figure III-4-1). La Phatr2_42872 est une protéine de 808 acides aminés avec une masse moléculaire estimée à 92 kDa. Elle possède les domaines BtaA-like (DUF3419) et BtaB-like (Méthyltransf), cependant l'ordre des domaines entre Phatr2_42872 et BTA1_{Cr} de *Chlamydomonas reinhardtii* (Riekhof *et al.*, 2005) est inversé. Cette enzyme pourrait être impliquée dans la synthèse de DGTA (Abida *et al.*, 2015; Brembu *et al.*, 2017; Cruz de Carvalho *et al.*, 2016).

Un ensemble de 28 gènes / isogènes (sans compter les gènes de ménage) codant 10 enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des lipides a été sélectionné (voir matériels et méthodes). Selon l'index Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), 5 gènes de ménage (phActin12, phActin16, phTBP, phRPS et phHist4) ont été utilisés pour normaliser les calculs d'expression relative des gènes d'intérêt.

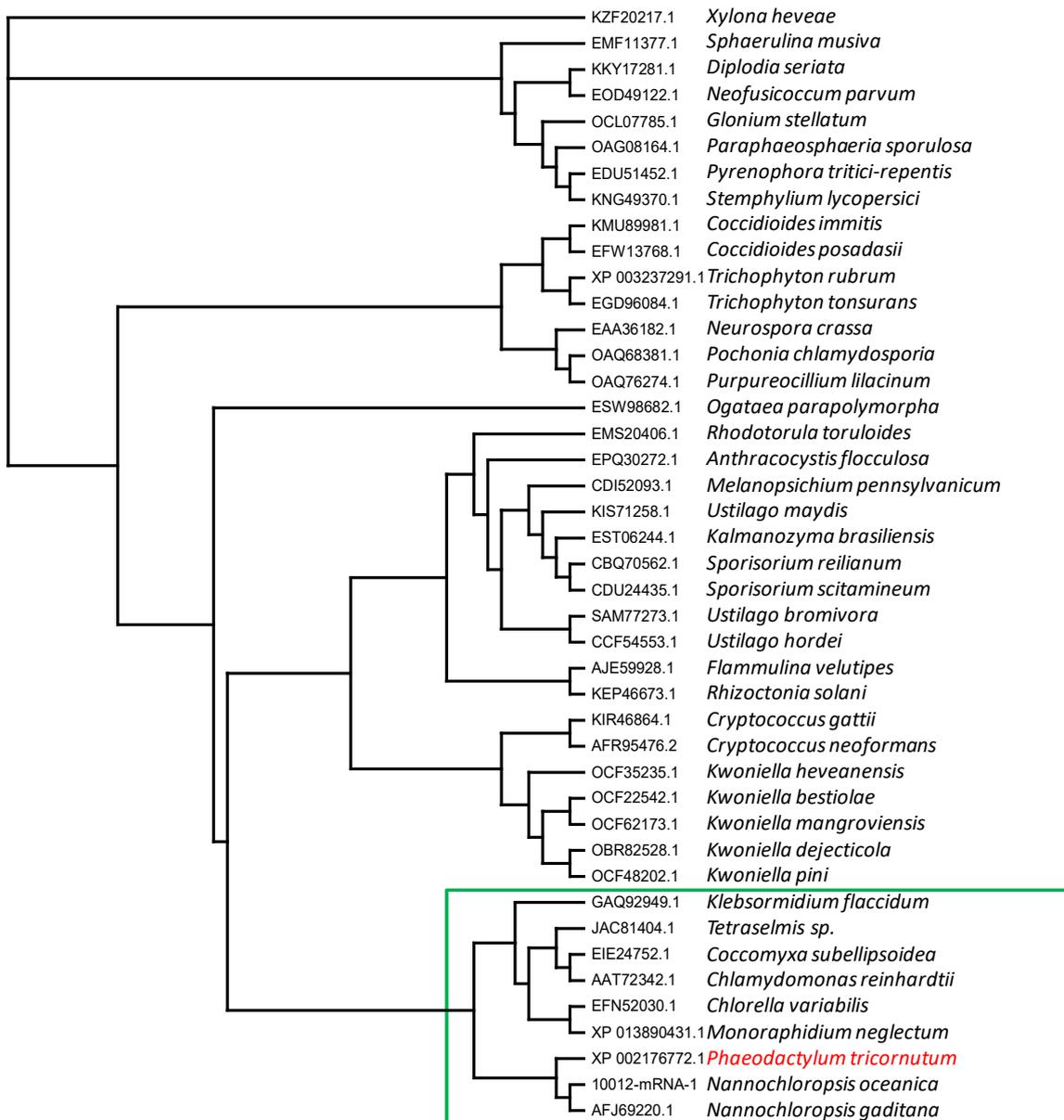
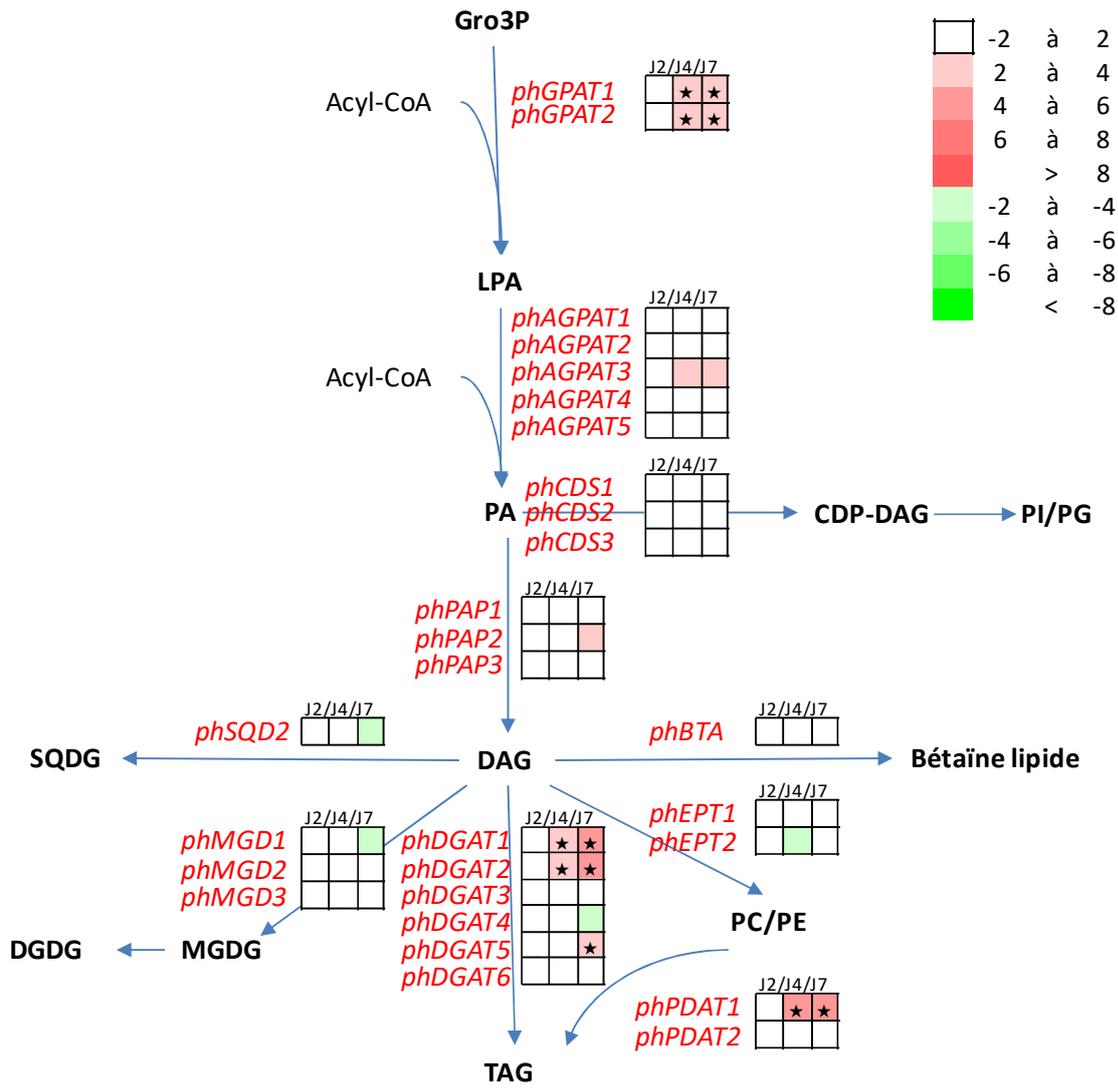


Figure III-4-1 : Analyses phylogénétique des séquences protéiques de bêtaïne lipide synthase (BTA) chez les eucaryotes. L'arbre phylogénétique a été généré en utilisant des paramètres bootstrap par défaut (1000 répétitions et 111 générateurs de graines) à l'aide de ClustalX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Le cadre vert indique les espèces de microalgues.

III.4.1.2 Variations de l'expression des gènes d'intérêt

Les diatomées cultivées en condition témoin pendant la phase de croissance exponentielle (J2) ont été considérées comme références. Ainsi, toutes les données d'expression de gènes sont exprimées par rapport à ces échantillons témoins (Figure III-4-2).

A (N-)



B (P-)

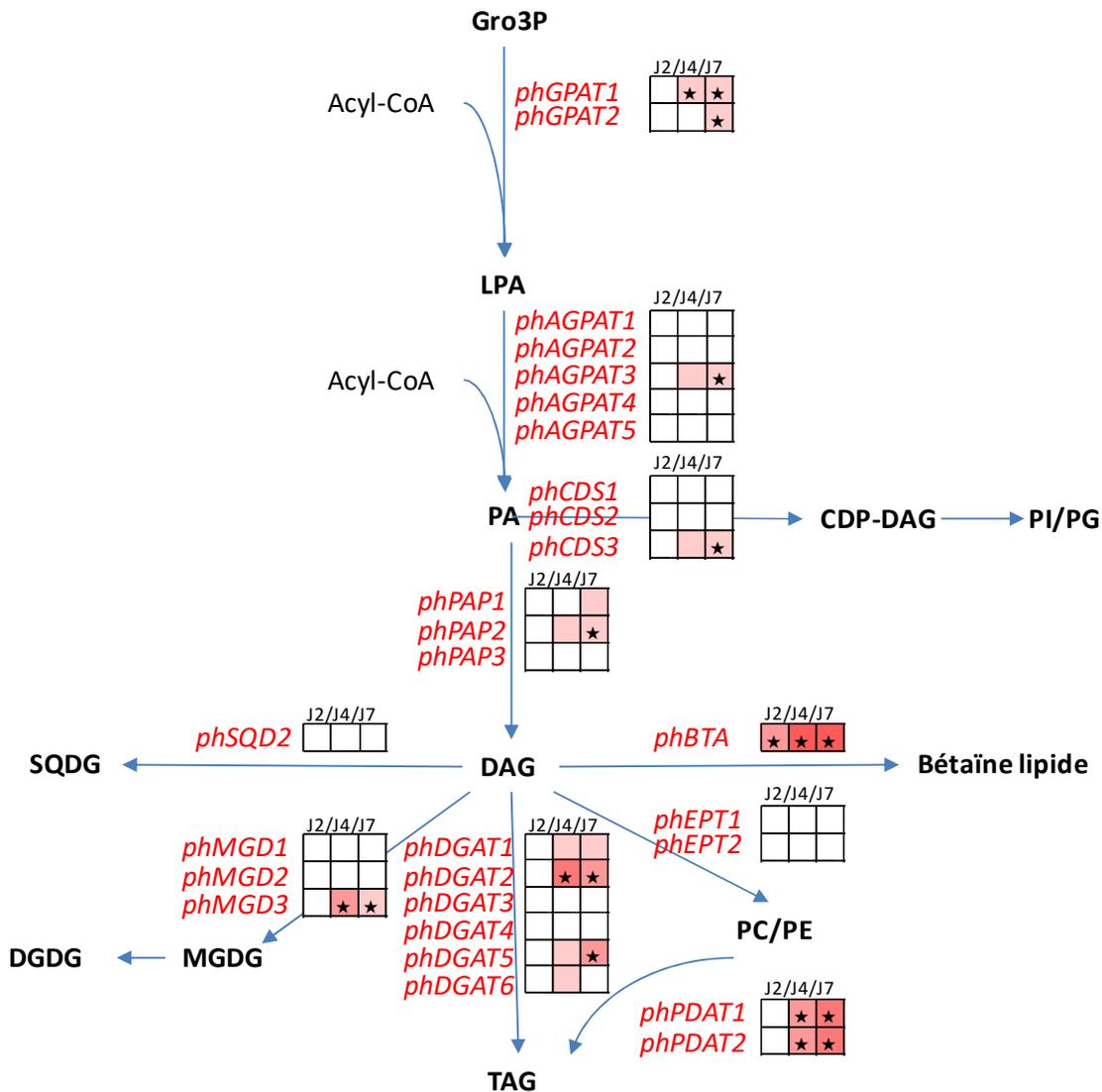


Figure III-4-2 : Expression des gènes d'intérêt codant pour 10 enzymes impliquées dans la synthèse des TAG et les voies de biosynthèse des lipides membranaires chez *P. tricornutum* cultivée en condition limitante (A) en N (N-) ou (B) en P (P-), (n=3). Les carrés colorés indiquent le type de régulation au J2 (phase exponentielle), J4 (début de la phase stationnaire) et J7 (+3 jours) (rouge = surexpression, vert = répression, les valeurs indiquent le facteur multiplicateur de l'expression). Dans les conditions N- et P-, les cellules témoins (NP) au J2 sont utilisées comme références. Les astérisques indiquent une régulation significativement différente par rapport aux cultures NP au J2 ($p < 0,01$ et $[\log_2(ER) > 1$ ou $\log_2(ER) < -1]$ ou $p < 0,05$ et $[\log_2(ER) > 2$ ou $\log_2(ER) < -2]$). La correspondance entre les abréviations de gènes et l'identification des protéines est indiquée dans Matériels et méthodes.

Nos résultats révèlent de faibles augmentations de l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans l'assemblage des glycérolipides dans les cultures limitées en P ou en N. Les gènes codant la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) ont été légèrement surexprimés : le gène codant phGPAT1 située dans le réticulum endoplasmique (RE) a été surexprimé 2,6 et 2,7 fois au J4 et J7 en condition de limitation en N, ainsi que 2,6 et 3,8 fois au J4 et J7 en condition de limitation en P, respectivement ; le gène codant phGPAT2 située dans le chloroplaste a aussi été surexprimé 2,5 et 3,9 fois au J4 et J7 en N-, 1,8 et 2,8 fois au J4 et J7 en P-, respectivement. Seulement un des cinq isogènes codant la 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT, autrement dit LPAT) a été surexprimé (phAGPAT3: 2,1 et 2 fois au J4 et J7 en N-, 2,4 et 2,7 fois au J4 et J7 en P-, respectivement). Ces deux enzymes transfèrent deux acyl-CoA au glycérol-3-phosphate pour former l'acide phosphatidique (PA) qui est ensuite déphosphorylé par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP) en diacylglycérol (DAG) (Klok *et al.*, 2014; Zienkiewicz *et al.*, 2016). Un des isogènes putatifs codants PAP (phPAP2) a été surexprimé 2,7 fois au J7 dans les cultures limitées en N, tandis que deux isogènes ont présenté une augmentation de leurs ARNm dans les cultures limitées en P (phPAP1: 2,4 fois au J7, phPAP2: 2,7 et 3,7 fois au J4 et J7 respectivement). Le DAG et le PA sont les deux molécules carrefours importantes des différentes voies de biosynthèse des lipides. Les différentes enzymes catalysant les voies en aval conduiront alors soit à la synthèse des lipides neutres (TAG) soit à la synthèse des lipides membranaires (Sayanova *et al.*, 2017).

Synthèse des triacylglycérols (TAG)

La dernière étape de la biosynthèse de TAG est catalysée par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) qui transfère le troisième acyl-CoA au DAG (Lung et Weselake, 2006). Six isoformes des gènes DGAT ont été analysées, la phDGAT1 fait partie du groupe DGAT de type 1, alors que les phDGAT2 - 6 appartiennent au groupe DGAT de type 2. Pendant la limitation en N, l'expression de trois des isogènes DGAT a été régulée à la hausse (phDGAT1 : 3,9 et 4,9 fois au J4 et J7, phDGAT2 : 3,8 et 4,2 au J4 et J7, phDGAT5 : 3,1 fois au J7). De même, pendant la limitation en P, quatre des différents isogènes DGAT ont été surexprimés (phDGAT1 : 2,6 et 3,3 fois au J4 et J7, phDGAT2 : 6,0 et 5,4 fois au J4 et J7, phDGAT5 : 2,2 et 4,3 fois au J4 et J7, phDGAT6 : 2,4 fois au J4). L'augmentation de l'expression de ces gènes suggère que le flux de C s'oriente vers la synthèse des TAG (voir chapitre 2).

La synthèse de TAG pourrait également utiliser des phospholipides en tant que donneurs d'acyl grâce à la phospholipide diacylglycérol acyltransférase (PDAT) (Alipanah *et al.*, 2015; Cruz de Carvalho *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2012). Un seul des deux isogènes putatifs codant PDAT a été induit dans les cultures N- (phPDAT1: 4,1 et 4,3 fois au J4 et J7 respectivement), tandis que l'expression des deux isogènes a fortement augmenté dans les cultures limitées en P, en particulier dès l'apparition de la carence (phPDAT1: 5,2 et 6,3 fois au J4 et J7, phPDAT2: 4,9 et 6,1 fois au J4 et J7 respectivement), ce qui pourrait favoriser la production de TAG *via* le remaniement des PL pendant la carence en P (voir chapitre 5).

Synthèse des glycolipides (GL)

Dans les chloroplastes, les glycolipides sont synthétisés en transférant des fragments de glucose ou de galactose sur le DAG. Pendant la limitation en N, un gène prédit pour coder la MGDG synthase (phMGD1) a été réprimé -1,6 et -3,1 fois au J4 et J7 et l'expression du gène codant la SQDG synthase 2 (phSQD2) a également été régulée à la baisse -1,7 et -3.9 fois au J4 et J7 respectivement. Ces régulations à la baisse sont cohérentes avec la faible teneur en glycolipides mesurée (voir chapitre 3).

En condition de limitation en P, la plupart des gènes impliqués dans la synthèse des glycolipides n'ont pas montré d'expression différentielle par rapport à la condition témoin NP, la composition des membranes thylacoïdales a été maintenue. Nous n'avons pas observé de surexpression du gène phSQD2, cependant un gène putatif codant la MGDG synthase (phMGD3) a été particulièrement surexprimé (4,4 et 2,4 fois au J4 et J7 respectivement). Ce gène code une protéine dont la localisation subcellulaire n'a pas encore été prédite avec les outils bioinformatiques disponibles à ce jour (Petroutsos *et al.*, 2014).

Synthèse des phosphoglycérides (PL)

La biosynthèse de PC et PE est réalisée à partir du DAG. L'enzyme choline phosphotransférase (CPT) n'a pas été trouvée chez *P. tricornutum*, tandis que chez les plantes, les éthanoline phosphotransférases (EPT) (ou aminoalcoolphosphotransférases) pourraient jouer un double rôle de CPT et EPT (Dewey *et al.*, 1994). En condition de limitation en N, l'expression des gènes codant EPT a tendance à diminuer : phEPT2 a été légèrement sous-exprimé -2,2 et -2 fois au J4 et J7 respectivement. Ces résultats montrent la même tendance que

de la teneur en PE tandis que la teneur en PC reste constante (voir chapitre 3). Les gènes codant les phosphatidate cytidylyltransférases (CDS) ont été peu affectés par la limitation en N.

En condition de limitation en P, même si les teneurs en PL ont été fortement réduites (voir chapitre 3), il est intéressant de noter qu'aucune répression significative des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des PL n'a été observée. Au contraire, l'expression d'un des gènes codant CDS a été régulée à la hausse (phCDS3 : 2,0 et 3,2 fois au J4 et J7 respectivement) pendant la limitation en P. Des résultats similaires ont été rapportés chez *Nannochloropsis oceanica*, suggérant que les PL pourraient être synthétisés en continu sous limitation en P (Mühlroth *et al.*, 2017). La formation des PL sous P limitant n'est pas utilisée dans la synthèse des lipides membranaires mais contribue directement aux mécanismes de remaniement des lipides par une dégradation active et un remplacement par des lipides non-phosphorés.

Synthèse des bétaine lipides (BL)

L'expression du gène codant la bétaine lipide synthase (BTA) n'a montré aucune différence par rapport aux cultures témoins au J2 en condition de N limitant. Le résultat est en accord avec la teneur en DGTA mesurée (voir chapitre 3).

En condition de limitation en P, l'analyse transcriptomique indique une surexpression forte et rapide de phBTA : 4,2 fois au J2, 9,6 fois au J4 et 8,2 fois au J7. Une régulation positive similaire a déjà été signalée chez une souche de *P. tricornutum* en condition de limitation en P (Alipanah *et al.*, 2018). De plus, Cruz de Carvalho *et al.* (2016) ont remarqué une surexpression beaucoup plus importante chez une autre souche (Pt1). Le moment exact du déclenchement du remodelage des lipides pourrait être assez précoce (pendant la phase de croissance exponentielle), lorsque la teneur en P est encore à un haut niveau pouvant soutenir un taux de croissance élevé (voir chapitre 1). Par conséquent, nos résultats suggèrent que la synthèse de DGTA chez *P. tricornutum* pourrait être étroitement régulée par la concentration en P externe.

III.4.2 Expression des gènes d'intérêt chez *T. lutea*

III.4.2.1 Choix des gènes d'intérêt

Les gènes / isogènes de *T. lutea* ont été recherchés, par analyse BLASTp (Altschul et al., 1990, 1997), en utilisant les données protéomiques de *P. tricornutum* et de l'Haptophyte *Emiliana huxleyi* (Read et al., 2013) disponibles dans JGI contre les bases de données protéomiques et génomiques de *T. lutea* disponibles au centre IFREMER-Nantes.

Deux enzymes candidates pour la bétaine lipide synthase : Tiso_17669 (tiBTA1) et Tiso_31533 (tiBTA2) ont été identifiées (Figure III-4-3). Tiso_17669 est une protéine de 644 acides aminés et sa masse moléculaire est estimée à 71 kDa. Elle possède un domaine BtaA-like (DUF3419). Tiso_31533 est une protéine de 269 acides aminés et sa masse moléculaire est estimée à 30 kDa. Elle possède le domaine BtaB-like, de la superfamille des «S- adénosylméthionine-dépendente méthyltransférases». Ces 2 enzymes pourraient être impliquées dans la synthèse des bétaine lipides.

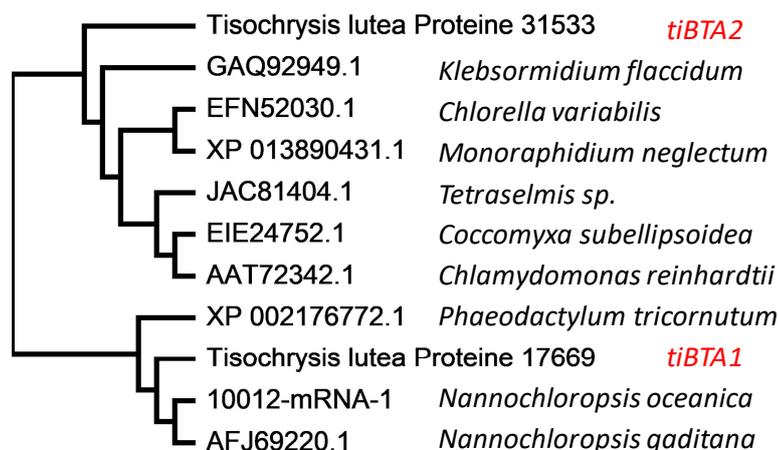


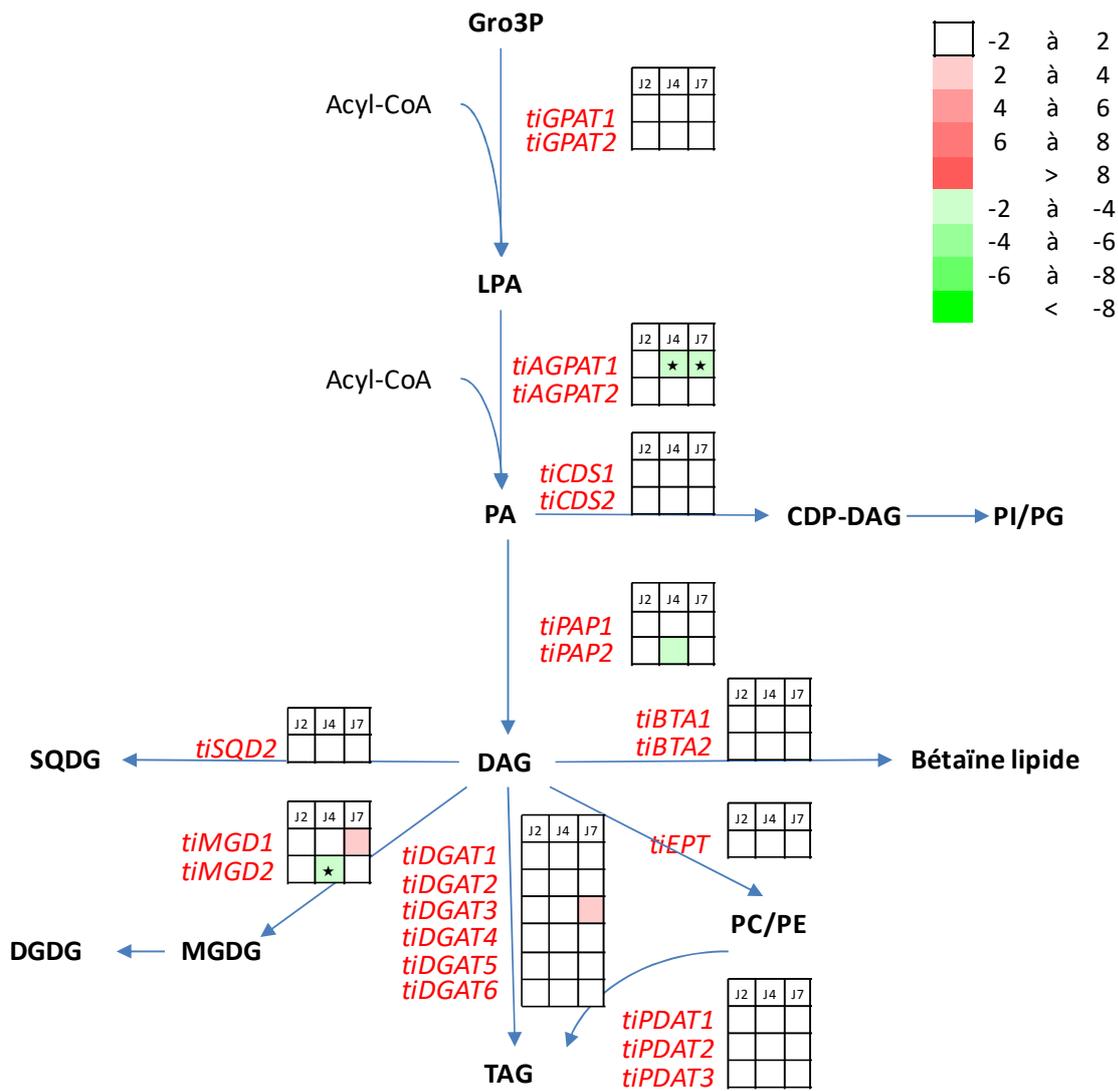
Figure III-4-3 : Analyses phylogénétique des séquences protéiques de bétaine lipide synthase (BTA) chez les microalgues. L'arbre phylogénétique a été généré en utilisant des paramètres bootstrap par défaut (1000 répétitions et 111 générateurs de graines) à l'aide de ClustalX 2.1 (Larkin et al., 2007).

Un ensemble de 23 gènes / isogènes (sans compter les gènes de ménage) codant 10 enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des lipides a été déterminé (voir matériels et méthodes). Selon l'index Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004), 4 gènes de ménage (tiTub β , tiUBI, tiEF1 α et tiHist4) ont été choisis pour normaliser les calculs d'expression relative des gènes d'intérêt.

III.4.2.2 Variations de l'expression des gènes d'intérêt

Les cellules cultivées en condition témoin pendant la phase de croissance exponentielle (J2) ont été considérées comme références. Ainsi, toutes les données d'expression de gènes sont exprimées par rapport à ces échantillons témoins (Figure III-4-4).

A (N-)



B (P-)

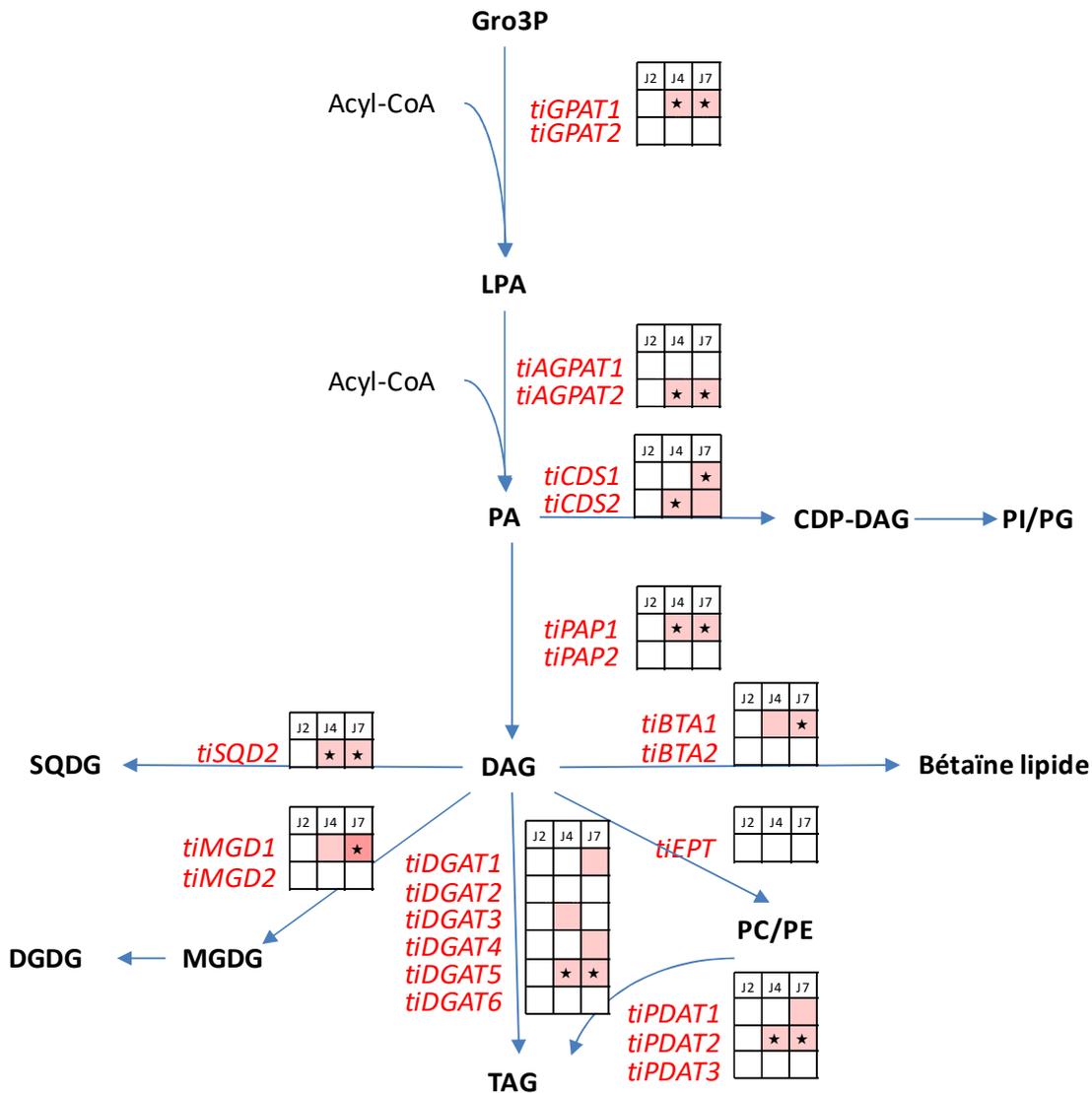


Figure III-4-4 : Expression des gènes d'intérêt codant pour 10 enzymes impliquées dans la synthèse des TAG et les voies de biosynthèse des lipides membranaires chez *T. lutea* cultivée en condition limitante (A) en N (N-) ou (B) en P (P-), (n=3). Les carrés colorés indiquent le type de régulation au J2 (phase exponentielle), J4 (début de la phase stationnaire) et J7 (+3 jours) (rouge = surexpression, vert = répression, les valeurs indiquent le facteur multiplicateur de l'expression). Dans les conditions N- et P-, les cellules témoins (NP) au J2 sont utilisées comme références. Les astérisques indiquent une régulation significativement différente par rapport aux cultures NP au J2 ($p < 0,01$ et $[\log_2(ER) > 1$ ou $\log_2(ER) < -1]$ ou $p < 0,05$ et $[\log_2(ER) > 2$ ou $\log_2(ER) < -2]$). La correspondance entre les abréviations des gènes et l'identification des protéines est mentionnée dans Matériels et méthodes.

Synthèse des triacylglycérols (TAG)

En condition de limitation en N, ni la voie de Kennedy (Kennedy, 1956; Li-Beisson *et al.*, 2015) (comprenant les quatre enzymes principales impliquées : GPAT, AGPAT, PAP et DGAT) ni les mécanismes de remaniement des phospholipides par PDAT (Li-Beisson *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2012), qui sont les deux voies principales de biosynthèse des TAG, n'ont été induites. Nous avons enregistré une expression à la baisse du gène codant pour AGPAT (tiAGPAT1 : -3,3 et -3,4 fois au J4 et J7 respectivement), ce qui est en accord avec l'analyse protéomique effectuée précédemment chez cette espèce (Garnier *et al.*, 2016). Nos résultats suggèrent une faible synthèse de TAG pendant la limitation en N (voir chapitre 2). Garnier *et al.* (2016) ont observé une conversion des lipides membranaires en lipides de stockage après des changements de disponibilité en N chez *T. lutea*, sans activer la synthèse *de novo* de TAG, suggérant que les TAG sont principalement synthétisés à partir de l'hydrolyse des lipides membranaires. Les alcénones pourraient être les principaux lipides neutres de réserve dans les cultures N- comme mentionné par Da Costa *et al.* (2017).

Au contraire, dans les cultures P-, le niveau des transcrits impliqués dans la voie de biosynthèse des TAG a augmenté. La voie Kennedy et les mécanismes de remaniement des PL ont été légèrement régulés à la hausse (tiGPAT1 : 2,2 et 2,2 fois au J4 et J7 ; tiAGPAT2 : 2,2 et 3,6 fois au J4 et J7 ; tiPAP1 : 3,6 et 3,9 fois au J4 et J7 ; tiDGAT5 : 2,5 et 2,6 fois au J4 et J7 ; tiPDAT2 : 2 et 2,8 fois au J4 et J7, respectivement), suggérant la production de TAG. Ces régulations à la hausse sont en accord avec la teneur cellulaire élevée en lipides neutres. Les TAG pourraient devenir les principaux lipides neutres de réserve dans les cultures P-.

Synthèse des glycérides (GL)

Dans les chloroplastes, la limitation en N a induit une désorganisation des membranes thylacoïdales, ce qui se traduit principalement par la réduction du SQDG (voir chapitre 3). Cependant, aucune sous-expression du gène tiSQD2 codant la SQDG synthase n'a été observée. Les deux gènes codant la MGDG synthase réagissent différemment face à la limitation en N.

En condition de limitation en P, l'expression du gène tiSQD2 a été régulée particulièrement à la hausse (2,3 et 2,5 fois au J4 et J7, respectivement) malgré la teneur en SQDG qui est restée constante (voir chapitre 3). Un gène putatif codant la MGDG synthase (tiMGD1) a été surexprimé (2,9 et 4,4 fois au J4 et J7, respectivement), ce qui est en accord avec l'augmentation de la teneur en MDGD et DGDG (voir chapitre 3). La surexpression des gènes

impliqués dans la synthèse des glycolipides suggère une maintenance de la structure des membranes thylacoïdales, ce qui contribue à maintenir une forte capacité photochimique en condition de limitation en P comme nous l'avons mesurée (voir chapitre 1).

Synthèse des phosphoglycérides (PL)

Un gène putatif codant l'enzyme éthanolamine phosphotransférase (tiEPT) a été identifié, il pourrait être impliqué dans la synthèse de PE. Cependant, la littérature ne fait pas mention de la présence de PE chez *T. lutea*. De même, nous ne pouvons pas confirmer la présence de PE dans cette espèce (voir chapitre 3). En condition de limitation en N, aucun changement significatif de l'expression de tiEPT n'est observé. Les gènes codant la CDS ont été peu affectés par la limitation en N.

En condition de limitation en P, aucun changement dans l'expression de tiEPT n'a été observé. En revanche, l'expression des gènes codant la CDS a été augmentée (tiCDS1 : 2,0 et 2,3 fois au J4 et J7 ; tiCDS2 : 3,0 et 2,2 fois au J4 et J7, respectivement). L'enzyme CDS est impliquée dans la biosynthèse de PI et PG. Comme mentionné précédemment, une diminution des teneurs en PI a lieu dans les membranes non-plastidiales tandis qu'une augmentation des teneurs en PG est observée dans les membranes thylacoïdales en condition P- (voir chapitre 3). L'augmentation de l'expression de tiCDS1 et 2 pourrait partiellement contribuer à la synthèse de PG. De futures études fonctionnelles devraient aider à déterminer lequel de ces deux gènes est spécifique à la synthèse de précurseurs de PI / PG.

Synthèse des bétaine lipides (BL)

L'expression des gènes codant la bétaine lipide synthase (BTA) n'a montré aucune différence par rapport aux cultures témoins au J2 en condition N limitant.

En revanche, en condition de limitation en P, tiBTA1 est surexprimé 2,9 et 3,2 fois au J4 et J7 respectivement tandis que tiBTA2 est moins impliqué. L'augmentation de l'expression de BTA apparaît en accord avec l'augmentation de la teneur cellulaire en bétaine lipides, tandis que les teneurs rapportées au C demeurent souvent constantes ou réduites (voir chapitre 3). La limitation en P pourrait favoriser la synthèse des bétaine lipides chez *T. lutea*, permettant la formation de membranes plasmiques et RE, ainsi que l'augmentation de taille des cellules (voir chapitre 1).

III.4.3 Conclusion

L'étude au niveau transcriptionnel a mis en lumière des réorientations du métabolisme lipidique en réponse à une limitation nutritive.

Chez *P. tricornutum*, la régulation à la hausse de l'expression des gènes sous conditions de limitations en P et en N semble conduire davantage le flux de C vers la production de TAG. Les PL pourraient être synthétisés en continu sous limitation en P, cependant, ils ne sont pas utilisés dans la synthèse des lipides membranaires mais contribuent directement aux mécanismes de remaniement des lipides qui impliquent leur dégradation et leur remplacement par des lipides non-phosphorés, tels que les TAG et les bêtaïne lipides. La surexpression de la bêtaïne lipide synthase semble être spécifique à la limitation en P. Vu le temps de réponse (J2), la synthèse de DGTA chez *P. tricornutum* pourrait être étroitement régulée par la concentration en P externe.

Chez *T. lutea*, la limitation en P favorise la production de TAG. La synthèse des PL n'est pas inhibée, la régulation à la hausse de CDS pourrait partiellement contribuer à la synthèse de PG mais aussi aux mécanismes de remaniement des lipides. La surexpression de la bêtaïne lipide synthase est aussi observée sous limitation en P, cependant, la sensibilité et l'intensité de cette réponse sont beaucoup plus faibles que celles de *P. tricornutum*. La surexpression de la bêtaïne lipide synthase chez *T. lutea* n'est peut-être pas directement liée à la limitation en P externe mais pourrait être en lien avec certaines réponses tardives restant à élucider.

Les résultats révèlent des régulations différentes chez *P. tricornutum* et *T. lutea* en réponse à une limitation nutritive en P ou en N (voir chapitre 3). Des études complémentaires au niveau des protéines et de leur activité enzymatique permettraient de conforter les résultats obtenus.

Chapitre 5

Composition en acides gras

III.5 MODIFICATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS EN RÉPONSE À UNE LIMITATION NUTRITIVE EN PHOSPHORE OU EN AZOTE

La limitation nutritive provoque une réorientation du métabolisme, des modifications sont observées non seulement au niveau des classes lipidiques mais aussi de la composition en acides gras (AG). Reitan *et al.* (1994) ont signalé des teneurs relatives en acide palmitique (C16:0) et en acide oléique (C18:1n-9) plus élevées en raison de la limitation nutritive chez *P. tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *T. lutea*, *D. lutheri* et *Tetraselmis* sp. Rasdi et Qin (2015) ont aussi remarqué que la limitation en N ou en P tend à réduire les teneurs relatives en acides gras polyinsaturés (AGPI) chez les microalgues. Pour mieux comprendre cette réorientation métabolique, les compositions en AG de chaque fraction lipidique majeure des 3 microalgues cultivées dans les conditions de limitation en P ou en N (*P. tricornutum* et *T. lutea* au J4, *D. lutheri* au J7) ont été étudiées.

Par ailleurs, des recherches ont montré que les AGPI de la série n-6 pouvaient contribuer à la survenue de maladies vasculaires telles que l'athérome et le thrombus, au développement de troubles allergiques et inflammatoires. En revanche, des taux accrus d'AGPI de la série n-3 pourraient exercer un effet préventif (Dubois *et al.*, 2007; Simopoulos, 2002). Une attention particulière a été portée aux acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de la série n-3, tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3). En effet, ces 2 AGPI peuvent être utilisés en tant que compléments alimentaires et présentent de nombreux avantages en santé humaine notamment dans le cadre de la prévention vis-à-vis des maladies cardiovasculaires et des cancers (Doughman *et al.*, 2007; Mimouni *et al.*, 2012). L'étude de la composition en AG constitue une étape importante à réaliser avant d'envisager une valorisation des espèces étudiées.

III.5.1 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la composition en AG des lipides neutres

Les lipides neutres constituent les principaux lipides chez la plupart des microalgues. Chez *P. tricornutum*, les lipides neutres représentent 63,8 % et 75,7 % des lipides totaux en conditions d'abondance en N et limitante en N, respectivement (Gao *et al.*, 2017). Chez *D. lutheri* cultivée en mode semi-continu, 57 % des AG se trouvent dans les lipides neutres (Meireles *et al.*, 2003). Etant donné que la synthèse et l'accumulation des lipides neutres sont fortement liées à la réorientation du métabolisme carboné, toute modification dans la

composition en AG des lipides neutres reflète directement l'état du métabolisme lipidique issu de cette réorientation, y compris la synthèse *de novo* et le remaniement des lipides polaires.

III.5.1.1 Composition en AG des lipides neutres chez *P. tricornutum*

Les AG majeurs des lipides neutres chez *P. tricornutum* sont C16:0, l'acide palmitoléique (C16:1n-7) et EPA, représentant 73-83 % des AG totaux dans les lipides neutres, quelles que soient les conditions expérimentales. De faibles proportions (1-2%) de DHA ont été mesurées dans cette fraction de lipides neutres (Figure III-5-1). Ce profil en AG des lipides neutres est conforme aux travaux publiés par d'autres auteurs (Remmers *et al.*, 2017; Villanova *et al.*, 2017). Les AG C16:0 et C16:1n-7 sont normalement des AG synthétisés *de novo*, ils interviennent dans la synthèse des TAG *via* la voie de Kennedy. En ce qui concerne l'EPA, il provient généralement du recyclage des lipides membranaires contenant des AG polyinsaturés à longue chaîne carbonée.

En condition de limitation nutritive, les modifications observées dans la composition en AG des lipides neutres ont été principalement associées aux C16:0, C16:1n-7, à l'EPA et à l'acide oléique (C18:1n-9) : 24 % et 22 % de dissemblance avec une forte différence globale (ANOSIM R = 0,9259 et 0,8889, p = 0,001) en condition P- et N-, respectivement par comparaison à la condition témoin. La différence est principalement due à l'augmentation de la proportion de C16 (contribuant à plus de 46 % de la dissemblance totale) tandis que la dissemblance de composition en AG entre la limitation en P et en N reste mineure : 7 % de dissemblance sans différence globale (ANOSIM R = 0,037, p = 0,005) (Figure III-5-1).

Cette augmentation des proportions en C16:0 et C16:1n-7 suggère que l'accumulation des lipides neutres dans les conditions de limitation nutritive proviendrait principalement de la voie de synthèse *de novo*, comme mentionné précédemment dans d'autres travaux (Abida *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2014; Simionato *et al.*, 2013). Dolch et Maréchal (2015) ont indiqué que l'acyl-ACP désaturase de *P. tricornutum* agit principalement sur C16:0. La légère augmentation de C16:1n-7 par rapport à C16:0 en condition de limitation en P (Figure III-5-1) suggère une activité de $\Delta 9$ désaturation plus élevée. Par ailleurs, la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) de *P. tricornutum* dans le chloroplaste pourrait avoir une affinité plus faible pour les substrats en C18 (Abida *et al.*, 2015). Par conséquent, en conditions limitantes en P et en N, sont observées des proportions en C16 plus élevées dans les lipides neutres qui induisent dans ces derniers une diminution des proportions de C18 et EPA (Figure III-5-1). La diminution de la proportion en

EPA dans cette fraction est probablement une des principales différences avec la souche Pt1 de *Phaeodactylum* (Popko *et al.*, 2016). Chez Pt1, la proportion en EPA augmente dans les TAG en condition de limitations en P et en N (Abida *et al.*, 2015).

A l'échelle cellulaire, la teneur en EPA dans les lipides neutres a augmenté 1,6 fois en condition de limitation en P par rapport à la condition témoin (voir Annexe 6 Figure A-12). Des résultats similaires ont été rapportés par Abida *et al.* (2015). Aucune variation significative n'a été observée dans les cultures limitées en N. Les teneurs en AGPI-LC tels que l'acide stéaridonique (C18:4n-3), l'acide eicosadiénoïque (C20:2n-6), l'acide arachidonique (AA, C20:4n-6), l'acide docosapentaénoïque (C22:5n-3) et le DHA se sont révélées significativement augmentées en condition de limitation en P par rapport aux cultures NP et N-limitantes (voir Annexe 6 Figure A-12). Ces AGPI-LC présents dans les lipides neutres pourraient principalement provenir du recyclage des lipides polaires membranaires (Mühlroth *et al.*, 2013; Mus *et al.*, 2013; Remmers *et al.*, 2017). Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le remaniement des lipides polaires vers la synthèse des TAG pendant la privation en P (voir chapitre 4).

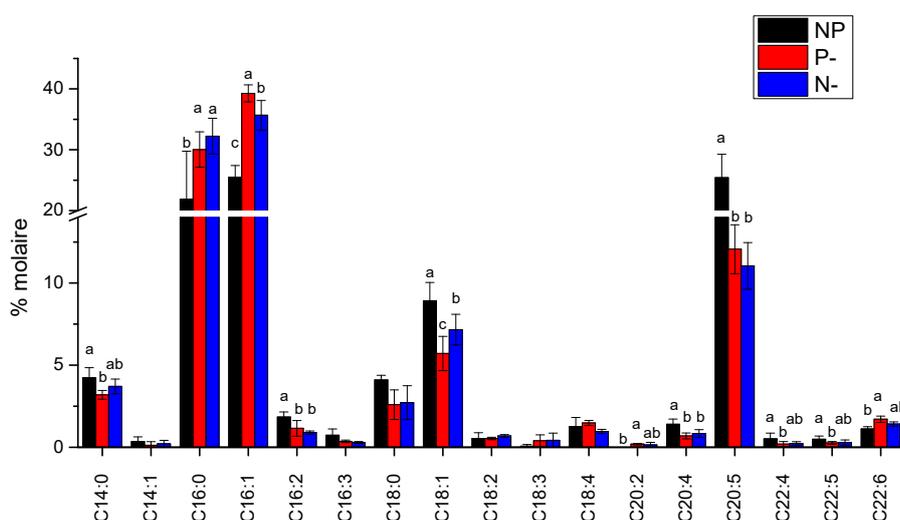


Figure III-5-1 : Composition en acides gras des lipides neutres (exprimée en % molaire) extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

Tableau III-5-1 : Composition en acides gras (% molaire) dans les lipides neutres extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. (n = 3).

	NP	P-	N-
Σ AGS	30,25 \pm 7,72 ^b	35,83 \pm 3,85 ^a	38,65 \pm 4,41 ^a
Σ AGMI	36,38 \pm 4,00 ^b	45,10 \pm 2,24 ^a	44,13 \pm 4,11 ^a
Σ AGPI	33,37 \pm 3,76 ^a	19,06 \pm 1,80 ^b	17,22 \pm 1,27 ^b
Σ n-6	4,02 \pm 0,29 ^a	2,20 \pm 0,14 ^b	2,34 \pm 0,23 ^b
Σ n-3	29,09 \pm 3,98 ^a	16,29 \pm 1,83 ^b	14,42 \pm 1,24 ^b
n-6/n-3	0,14 \pm 0,03 ^b	0,14 \pm 0,03 ^b	0,16 \pm 0,02 ^a

Les proportions des acides gras saturés (AGS), acides gras monoinsaturés (AGMI) et AGPI dans les lipides neutres ont été significativement modifiées par la limitation en P ou en N (Tableau III-5-1). Les modifications observées dans les proportions en AG indiquent une augmentation de la synthèse *de novo* des AG mais aussi de faibles activités d'élongation et de désaturation. La limitation en P n'a pas d'effet sur le rapport n-6 / n-3 tandis que la limitation en N a légèrement augmenté ce rapport (Tableau III-5-1). Un faible rapport n-6 / n-3 dans les lipides neutres chez *P. tricornutum* en fait un bon candidat pouvant être utilisé en tant que complément alimentaire et présentant des avantages pour la santé humaine.

III.5.1.2 Composition en AG des lipides neutres chez *T. lutea*

Chez *T. lutea*, les lipides neutres contiennent de fortes teneurs en C18:1n-9. Les autres AG constitutifs des lipides neutres sont les C16:0, C14:0 et le DHA, l'ensemble représente 76-85 % des AG totaux dans les lipides neutres, quelles que soient les conditions expérimentales. Des traces d'EPA ont également été détectées (Figure III-5-2).

La composition en AG des lipides neutres a été affectée par la limitation en N, les modifications portent principalement sur les C14:0, C16:0, C18:1n-9, l'acide linoléique (C18:2n-6), C18:4n-3 et le DHA : 11 % de dissemblance par rapport à la condition témoin avec une différence globale modérée (ANOSIM R = 0,4074, $p = 0,001$). La différence s'est traduite principalement par l'augmentation de la proportion en AGPI-LC, notamment en DHA et C18:4n-3 (Figure III-5-2). A l'échelle cellulaire, les teneurs en DHA et C18:4n-3 dans les lipides neutres ont augmenté significativement de 2,3 et 2,0 fois, respectivement (voir Annexe 6 Figure A-13).

La composition en AG des lipides neutres a aussi été affectée par la limitation en P, les modifications concernent principalement les C16:0, C18:1n-9, C18:2n-6 et le DHA : 11 % de

dissemblance par rapport à la condition témoin avec une différence globale modérée (ANOSIM $R = 0,6296$, $p = 0.001$) (Figure III-5-2). L'augmentation de la proportion en C16:0 a contribué à 36 % de la dissemblance totale. Le C16:0 est habituellement l'AG synthétisé *de novo* dans les chloroplastes (Guihéneuf *et al.*, 2011; Mühlroth *et al.*, 2013), son augmentation dans les lipides neutres suggère une activation de la synthèse *de novo* chez *T. lutea* qui est cohérente avec la sur-expression des gènes impliqués dans la voie de Kennedy (voir chapitre 4). Ces AG nouvellement synthétisés pourraient être directement orientés vers la synthèse des TAG.

L'analyse de la composition en AG met en évidence différents modes d'assemblage des TAG chez *T. lutea* selon le type de limitation nutritive. En condition de limitation en N, l'accumulation de TAG pourrait être principalement due au recyclage des lipides polaires membranaires comme nous l'avons mentionné précédemment, la synthèse *de novo* restant très faible. Nos résultats confirment l'hypothèse de Garnier *et al.* (2016), et sont en accord avec l'expression des gènes (voir chapitre 4). En revanche, en condition de limitation en P, l'accumulation des lipides neutres pourrait être principalement due à des synthèses *de novo*. Les différents modes d'assemblage ont engendré une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,963$, $p = 0.001$) de composition en AG entre les limitations en P et en N.

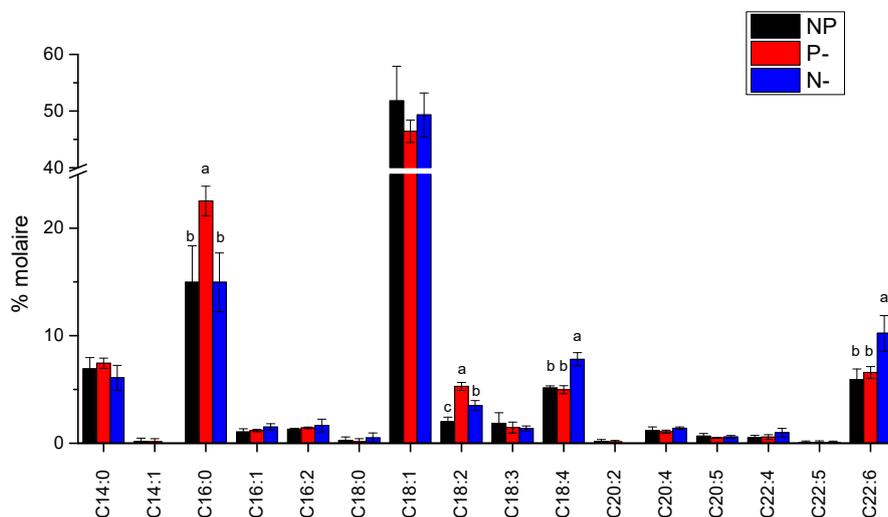


Figure III-5-2 : Composition en acides gras des lipides neutres (exprimée en % molaire) extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

Tableau III-5-2 : Composition en acides gras (% molaire) des lipides neutres extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. (n = 3).

	NP	P-	N-
Σ AGS	22,15 \pm 2,36 ^b	30,13 \pm 2,09 ^a	21,55 \pm 3,45 ^b
Σ AGMI	54,59 \pm 4,22 ^a	47,77 \pm 1,67 ^b	50,84 \pm 3,65 ^{ab}
Σ AGPI	23,26 \pm 2,27 ^{ab}	20,10 \pm 0,53 ^b	27,60 \pm 3,75 ^a
Σ n-6	5,44 \pm 1,21 ^b	7,79 \pm 0,49 ^a	6,71 \pm 1,23 ^{ab}
Σ n-3	15,09 \pm 1,36 ^b	13,60 \pm 0,82 ^b	20,07 \pm 2,23 ^a
n-6/n-3	0,36 \pm 0,06 ^b	0,58 \pm 0,07 ^a	0,33 \pm 0,03 ^b

Les AGMI (notamment le C18:1n-9) sont prédominants dans les lipides neutres, ce qui est bénéfique pour la production de biodiesel de haute qualité, car une teneur élevée en C18:1n-9 peut améliorer la stabilité vis-à-vis de l'oxydation du biodiesel à température ambiante (Knothe, 2009). Les proportions en AGS (C14:0 et C16:0) dans les lipides neutres sont significativement plus élevées en condition de limitation en P au cours de l'accumulation de TAG. Les proportions en AGPI, notamment celle des n-3, ont augmenté en condition de limitation en N grâce au recyclage des lipides polaires membranaires riches en n-3 (DHA). La limitation en N n'a pas d'effet sur le rapport n-6 / n-3 tandis que la limitation en P provoque une augmentation de ce rapport (Tableau III-5-2). L'augmentation du rapport n-6 / n-3 en condition P- est partiellement due au faible recyclage des lipides riches en n-3, mais aussi à la hausse de la proportion en C18:2n-6 dans les lipides neutres qui est probablement à mettre en relation avec la diminution de l'activité de $\Delta 15$ désaturase.

III.5.1.3 Composition en AG des lipides neutres chez *D. lutheri*

Chez *D. lutheri*, les lipides neutres sont principalement constitués d'AG en C16 (C16:0 et C16:1n-7) et C18 (C18:1n-9 et C18:2n-6) représentant 70 à 78 % des AG totaux des lipides neutres dans les trois conditions expérimentales. Les proportions d'EPA et de DHA restent faibles dans cette fraction (Figure III-5-3).

En cas de limitation nutritive, les proportions en AG les plus courts, tels que les C14 et C16, ont fortement augmenté, cela concerne les lipides neutres synthétisés *de novo*. D'autre part, les proportions en AGPI-LC, notamment l'EPA, ont également augmenté, il s'agit des lipides neutres issus d'un remaniement des lipides polaires (Figure III-5-3). Les limitations en P et en N au J7 ont provoqué 36 % et 45 % de dissemblance en ce qui concerne la composition en AG des

lipides neutres respectivement, avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 1$, $p = 0,001$) par rapport à la condition témoin. Les AG les plus affectés sont les C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:2n-6 et l'EPA. Guihéneuf *et al.* (2011) ont proposé deux systèmes d'enzymes distincts impliqués dans la synthèse des AG chez *D. lutheri*, l'un dépendant de la lumière dans le chloroplaste et l'autre, indépendant de la lumière et à l'extérieur du chloroplaste. L'hypothèse proposée par ces auteurs réside dans le fait que la synthèse d'acétyl-CoA à partir de CO_2 est principalement intra-chloroplastique, les principaux AG synthétisés sont alors les C14:0, C16:0, C16:1n-7 et l'EPA tandis que l'acétate situé à l'extérieur du chloroplaste est présumé former de l'acétyl-CoA cytosolique, favorisant la synthèse des AG en C18. En cas de limitation nutritive, la diminution des proportions des AG en C18 suggère une faible synthèse des AG en dehors du chloroplaste, tandis que la synthèse dépendant de la lumière à l'intérieur du chloroplaste demeure prédominante.

Contrairement à l'augmentation de la proportion en EPA dans les lipides neutres sous condition de limitation nutritive, la proportion de DHA est restée relativement stable (Figure III-5-3). Ce résultat suggère que l'EPA et le DHA sont intégrés différemment dans les lipides neutres. L'accumulation d'EPA et de DHA semble être régulée par deux mécanismes différents (Boelen *et al.*, 2017).

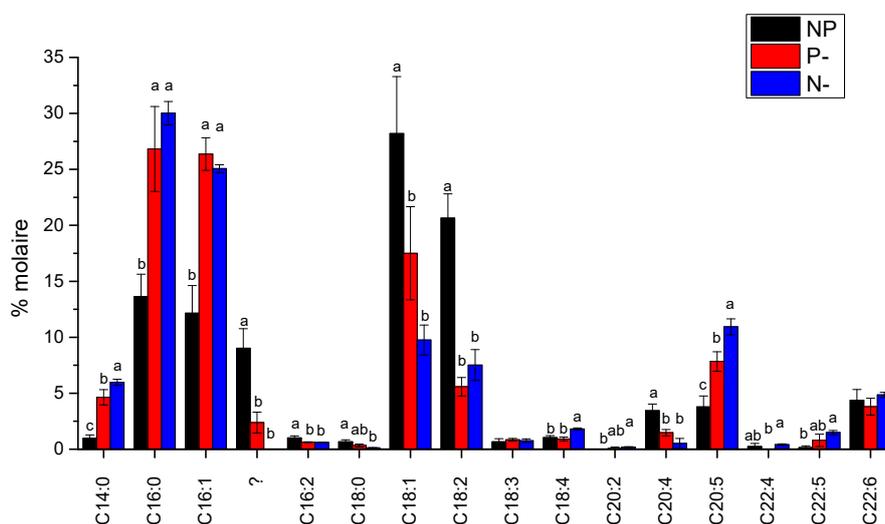


Figure III-5-3 : Composition en acides gras des lipides neutres (exprimée en % molaire) extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

L'impact d'une limitation en P sur la composition en AG des lipides neutres est similaire à celui d'une limitation en N chez *D. lutheri* puisque les cellules ont tendance à subir une privation en N dans les milieux de culture. Il est observé 13 % de dissemblance dans la composition en AG entre la limitation en P et en N, avec une différence globale moins importante (ANOSIM R = 0,7778, p = 0,001). Cette différence est probablement due aux niveaux différents des limitations au J7. Les cultures en condition de limitation en N au J7 sont proches de la phase stationnaire tandis que les cultures en condition de limitation en P au J7 sont encore en phase de croissance linéaire.

Tableau III-5-3 : Composition en acides gras (% molaire) des lipides neutres extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions. Moyenne ± S.D. (n = 3).

	NP	P-	N-
∑ AGS	15,29 ± 1,51 ^b	31,80 ± 3,70 ^a	36,10 ± 0,94 ^a
∑ AGMI	40,34 ± 3,63 ^{ab}	43,87 ± 3,16 ^a	34,82 ± 1,14 ^b
∑ AGPI	44,37 ± 2,19 ^a	24,33 ± 1,18 ^c	29,08 ± 0,75 ^b
∑ n-6	24,83 ± 2,37 ^a	7,45 ± 0,86 ^b	8,93 ± 0,83 ^b
∑ n-3	10,01 ± 1,61 ^c	14,19 ± 1,84 ^b	19,84 ± 0,89 ^a
n-6/n-3	2,50 ± 0,16 ^a	0,54 ± 0,13 ^b	0,45 ± 0,06 ^b

Les proportions des AGS (C14:0 et C16:0) dans les lipides neutres sont significativement augmentées en conditions de limitations en P et en N tandis que les proportions des AGMI ne montrent aucune différence significative par rapport aux cellules témoins (Tableau III-5-3) en raison d'une compensation entre l'augmentation du C16:1n-7 et la diminution du C18:1n-9. Même si les proportions des AGPI sont plus faibles en condition de limitation nutritive, les AGPI de la série des n-3 sont devenus beaucoup plus prépondérants grâce au recyclage massif des lipides polaires riches en n-3 (en particulier l'EPA). En conséquence, le rapport n-6 / n-3 a diminué en conditions de limitations en P et en N.

III.5.2 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la composition en AG des glycolipides

Selon la longueur de la chaîne, les AG entrant dans la constitution des glycolipides sont soit synthétisés *de novo* dans les chloroplastes soit importés du réticulum endoplasmique (RE) (Thompson, 1996). La fluidité des membranes thylacoïdales est fortement dépendante de la composition en AG des glycolipides et cette fluidité membranaire conditionne fortement l'activité photosynthétique car cette dernière repose sur le repliement correct des complexes protéiques qui forment la chaîne de transport des électrons (Morgan-Kiss *et al.*, 2006).

III.5.2.1 Composition en AG des glycolipides chez *P. tricornutum*

Les AG des glycolipides chez *P. tricornutum* sont majoritairement les C18:1n-9, C16:0, C16:1n-7 et l'EPA, représentant 70 à 76 % des AG totaux des glycolipides dans les trois conditions expérimentales (Figure III-5-4). Selon la littérature, l'EPA est préférentiellement incorporé dans les glycolipides plastidiaux, l'EPA étant détecté dans 20-50 % des MGDG chez *P. tricornutum* (Abida *et al.*, 2015; Dolch et Maréchal, 2015) alors que la proportion en DHA reste faible dans les glycolipides.

En condition de limitation en N, bien que la quantité de glycolipides chloroplastiques soit fortement diminuée (voir chapitre 3), leur composition en AG a été moins affectée : 12 % de dissemblance avec une faible différence globale (ANOSIM R = 0,3704, p = 0,002), par rapport à la condition témoin. La diminution de la proportion de C16:3n-3 a contribué majoritairement à la dissemblance (Figure III-5-4). Chez les plantes, les MGDG contenant le C16:3n-3 restent sous forme MGDG alors que les MGDG renfermant le C16:0 peuvent être utilisés comme substrat par les DGDG synthèses (Boudière *et al.*, 2012). De même, le C16:3n-3 est l'AG le plus commun dans les MGDG chez *P. tricornutum* (Abida *et al.*, 2015; Dolch et Maréchal, 2015). La baisse de la proportion de C16:3n-3 est probablement due à la diminution des MGDG (phGLx1) sous condition N limitant (voir chapitre 3).

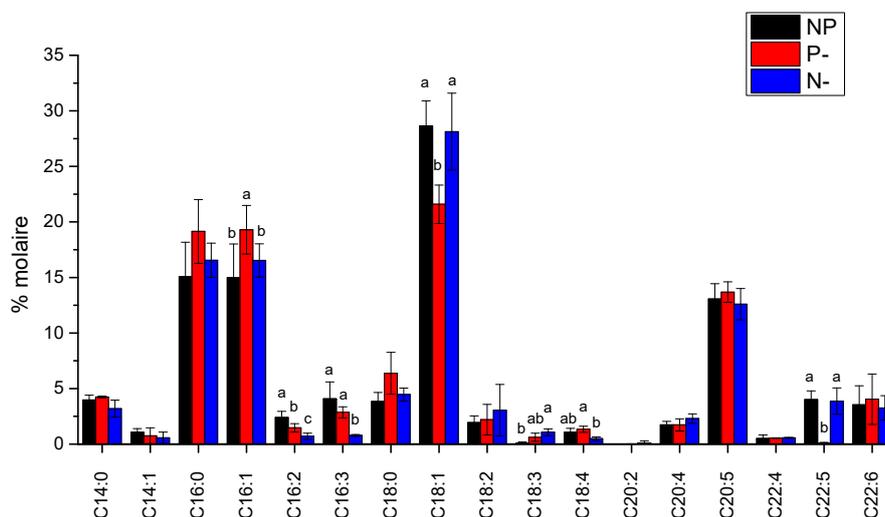


Figure III-5-4 : Composition en acides gras des glycolipides (exprimée en % molaire) extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions Moyenne ± S.D. (n = 3).

En revanche, la composition en AG des glycolipides est très affectée sous condition de limitation en P : 14 % de dissemblance avec une forte différence globale (ANOSIM R = 0,7778, p = 0,001) par rapport à la condition témoin. Les modifications de composition en AG des glycolipides sont principalement associées aux C16:0, C16:1n-7, C18:0 et C18:1n-9. Ces quatre AG ont contribué à plus de 67 % de la dissemblance totale (Figure III-5-4). La hausse de la proportion en C16 est probablement due à l'augmentation de la synthèse *de novo* des AG qui intègrent la molécule de SQDG dont la teneur augmente et qui se substitue à PG (voir chapitre 3).

Tableau III-5-4 : Composition en acides gras (% molaire) des glycolipides extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions. Moyenne ± S.D. (n = 3).

	NP	P-	N-
∑ AGS	22,88 ± 2,98	29,77 ± 4,73	24,21 ± 2,52
∑ AGMI	44,71 ± 3,16	41,64 ± 0,52	45,23 ± 1,50
∑ AGPI	32,41 ± 0,27	28,59 ± 4,21	30,56 ± 1,11
∑ n-6	5,61 ± 0,21	5,23 ± 1,38	6,37 ± 1,38
∑ n-3	25,84 ± 0,70 ^a	22,63 ± 2,72 ^{ab}	22,06 ± 1,68 ^b
n-6/n-3	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,29 ± 0,07

Les AGMI sont prédominants dans les glycolipides. Les deux limitations nutritives n'ont aucun effet significatif sur les proportions des AGS, AGMI et AGPI (Tableau III-5-4). Cette stabilité de la composition en AG des glycolipides pourrait contribuer à maintenir une activité photosynthétique efficace.

III.5.2.2 Composition en AG des glycolipides chez *T. lutea*

Les principaux AG des glycolipides sont C18:1n-9, C16:0, C14:0 et C18:4n-3, représentant 75-82 % des AG dans les trois conditions expérimentales (Figure III-5-5). Le principal AGPI présent dans la classe des glycolipides est le C18:4n-3, tandis que la proportion de DHA reste faible (Marchetti *et al.*, 2018; Nalder *et al.*, 2015).

La composition en glycolipides chloroplastiques a été modifiée par les limitations nutritives, notamment en condition de limitation en N, la teneur en SQDG est fortement abaissée (voir chapitre 3). Chez l'espèce proche *I. galbana*, les SQDG sont riches en C14:0, C16:0 et C16:1n-7 qui représentent 70 % des AG totaux de cette classe (Alonso *et al.*, 1998). La

diminution de la teneur en SQDG (voir chapitre 3) a entraîné une baisse des proportions de C14:0, C16:0 et C16:1n-7 dans cette fraction en condition limitante en N (Figure III-5-5). Néanmoins, la composition en AG des glycolipides totaux semble être inchangée dans les conditions limitantes en N et en P par rapport à la condition témoin (ANOSIM R = 0,1852, p = 0,002 en condition de limitation en N ; ANOSIM R = -0,1852, p = 0,009 en condition de limitation en P).

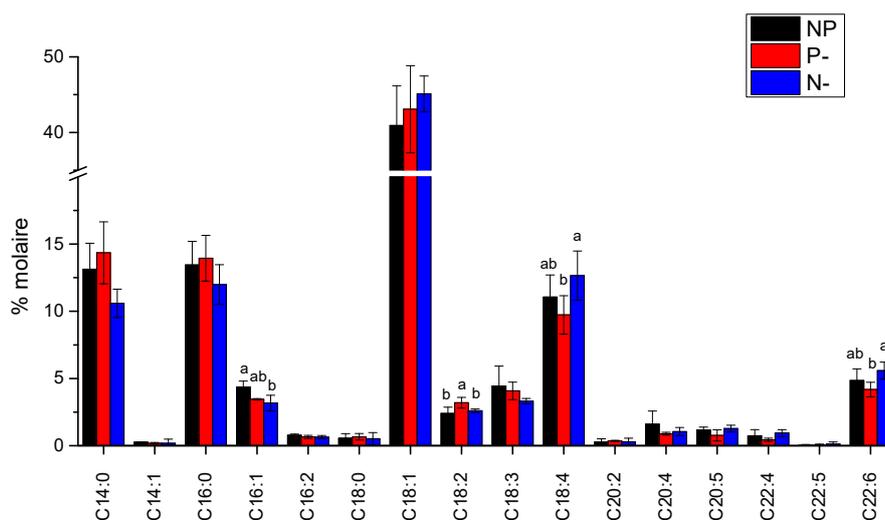


Figure III-5-5 : Composition en acides gras des glycolipides (exprimée en % molaire) extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

Tableau III-5-5 : Composition en acides gras (% molaire) des glycolipides extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

	NP	P-	N-
\sum AGS	27,13 \pm 1,97	28,96 \pm 3,85	23,09 \pm 1,03
\sum AGMI	45,55 \pm 5,03	46,70 \pm 5,73	48,45 \pm 2,35
\sum AGPI	27,33 \pm 3,97	24,35 \pm 1,89	28,46 \pm 1,86
\sum n-6	5,39 \pm 1,62	5,21 \pm 0,38	5,19 \pm 0,40
\sum n-3	16,01 \pm 1,59 ^c	18,81 \pm 1,45 ^b	22,95 \pm 1,75 ^a
n-6/n-3	0,29 \pm 0,01 ^a	0,28 \pm 0,00 ^a	0,23 \pm 0,02 ^b

Les AGMI sont prédominants dans les glycolipides. Les limitations nutritives n'ont aucun effet significatif sur les proportions en AGS, AGMI et AGPI (Tableau III-5-5). Cela pourrait contribuer à maintenir une activité photosynthétique efficace. Il est à remarquer que les limitations nutritives ont augmenté la proportion des n-3, notamment la limitation en N.

III.5.2.3 Composition en AG des glycolipides chez *D. lutheri*

Chez *D. lutheri*, les AG majoritaires sont les C16 (C16:0 et C16:1n-7), C18 (C18:1n-9) et l'EPA, représentant 70-76 % des AG totaux des glycolipides dans les trois conditions expérimentales (Figure III-5-6). D'après la littérature, les AG majeurs de MGDG et DGDG sont l'EPA et le C18:4n-3. SQDG contient principalement des AGS (C16:0 et C14:0) tandis que le DHA, particulièrement présent dans le DGGA, est difficilement détectable dans MGDG, DGDG et SQDG (Kalisch *et al.*, 2016).

En condition de limitation en N, bien que la quantité de glycolipides chloroplastiques soit fortement diminuée (voir chapitre 3), leur composition en AG reste stable : 7 % de dissemblance avec une différence globale nulle (ANOSIM R = - 0,03704, p = 0,005), par rapport à la condition témoin. Néanmoins, les proportions de C18:4n-3 et d'EPA ont tendance à diminuer (Figure III-5-6). Ces deux AG pourraient contribuer à la constitution de TAG (Guihéneuf et Stengel, 2017).

Sous limitation en P (J7), les cellules continuent à se diviser, les synthèses de glycolipides dans les cellules filles sont fortement affectées par l'augmentation des AG tels que les C14:0, C16:0 et C16:1n-7 (Figure III-5-6) synthétisés *de novo* dans les chloroplastes. Par conséquent, la composition en AG est fortement affectée : 11 % de dissemblance avec une forte différence globale (ANOSIM R = 0,8148, p = 0,001), par rapport à la condition témoin.

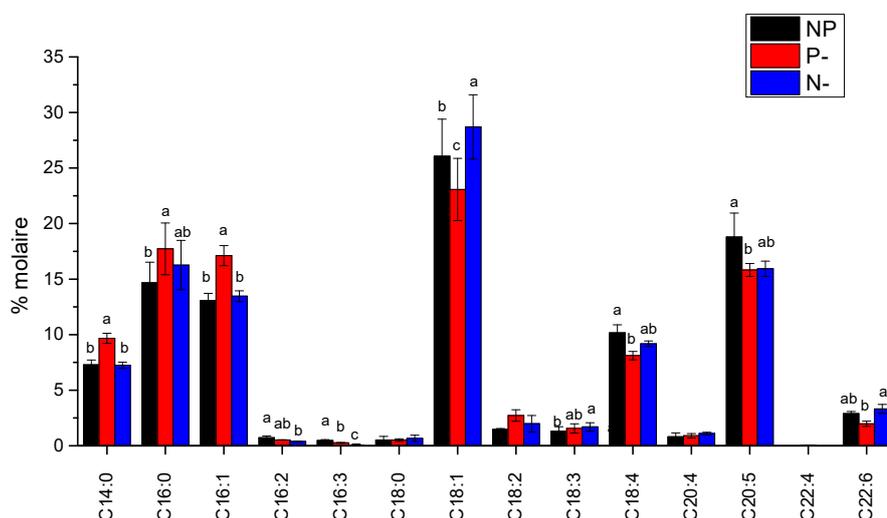


Figure III-5-6 : Composition en acides gras des glycolipides (exprimée en % molaire) extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions. Moyenne ± S.D. (n = 3).

Tableau III-5-6 : Composition en acides gras (% molaire) des glycolipides extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

	NP	P-	N-
\sum AGS	22,47 \pm 1,51 ^b	27,91 \pm 2,14 ^a	24,19 \pm 2,09 ^b
\sum AGMI	39,15 \pm 3,74 ^b	40,18 \pm 2,16 ^{ab}	42,16 \pm 3,24 ^a
\sum AGPI	38,38 \pm 2,99 ^a	31,91 \pm 0,32 ^b	33,66 \pm 1,67 ^b
\sum n-6	2,64 \pm 0,40 ^b	3,90 \pm 0,71 ^a	3,00 \pm 0,31 ^b
\sum n-3	33,61 \pm 3,51 ^a	27,74 \pm 0,38 ^b	30,19 \pm 0,88 ^{ab}
n-6/n-3	0,08 \pm 0,01 ^b	0,14 \pm 0,03 ^a	0,10 \pm 0,01 ^b

Les proportions des AGS (C14:0 et C16:0) dans les glycolipides ont significativement augmenté en condition de limitation en P en raison de l'augmentation des AG synthétisés *de novo* dans les chloroplastes, ces AGS ont participé aux synthèses des glycolipides (surtout SQDG) chez *D. lutheri*. Les proportions des AGPI sont diminuées sous limitation nutritive, ce qui pourrait être dû en partie au recyclage des lipides membranaires qui contribue à la constitution des lipides neutres, notamment en cas de limitation en N.

III.5.3 Impacts d'une limitation en P ou en N sur la composition en AG des phospholipides et des bêtaïne lipides

Les phospholipides et les bêtaïne lipides sont des constituants des membranes non-plastidiales. Certains d'entre eux sont considérés comme les premiers accepteurs d'AG synthétisés *de novo* et impliqués dans les réactions de désaturation, d'élongation et de redistribution (Bigogno *et al.*, 2002; Khozin-Goldberg *et al.*, 2002).

III.5.3.1 Composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides chez *P. tricornutum*

Les AG majeurs des PL et BL chez *P. tricornutum* sont les C16:0, C18:1n-9, l'EPA et le DHA, représentant 60 à 72 % des AG totaux dans cette fraction dans les trois conditions expérimentales (Figure III-5-7). Dans cette étude, les PL et BL présentent un profil d'AG unique caractérisé par des niveaux élevés de DHA. Ce résultat diffère des principaux AGPI mis en évidence dans d'autres études (Abida *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2017) qui indiquent un contenu en EPA plus élevé dans les PL et BL que celui en DHA. Cependant, un autre travail a montré que l'éclairage continu, comme dans notre étude, pourrait potentiellement augmenter la production de DHA (Hamilton *et al.*, 2015).

En condition de limitation nutritive, les modifications de la composition en AG des PL et BL sont principalement associés aux C16:0, C18:1n-9, à l'EPA et au DHA (Figure III-5-7), représentant 20 % et 16 % de dissemblance avec une forte différence globale (ANOSIM $R = 0,9259$ et $1, p = 0,001$) en condition P- et N-, respectivement par rapport à la condition témoin. La proportion en EPA dans cette fraction a tendance à augmenter dans les deux conditions limitantes. Des résultats similaires ont été rapportés chez la même espèce en condition de limitation en N (Alonso *et al.*, 2000; Popko *et al.*, 2016). Cela indique que la limitation nutritive pourrait favoriser la production d'EPA. La production d'EPA au niveau du RE pourrait bénéficier de la hausse de la dégradation de la chrysolaminarine en condition de limitation nutritive (voir chapitre 2) qui fournit l'acétyl-CoA cytosolique et favorise la synthèse des AGPI-LC. Popko *et al.* (2016) ont suggéré que l'EPA pourrait être transféré des glycolipides vers les PL et BL. Au contraire, une diminution de la proportion des C22 a été remarquée, en particulier de DHA, sa proportion a diminué de façon significative. Des résultats similaires ont été rapportés par Alonso *et al.* (2000). Cette diminution de C22 pourrait partiellement contribuer à la synthèse de TAG comme nous l'avons mentionné précédemment, ou être due à l'activité plus faible de la $\Delta 5$ -élongase, une enzyme clé qui permet de convertir l'EPA en AG à chaîne plus longue (Hamilton *et al.*, 2014).

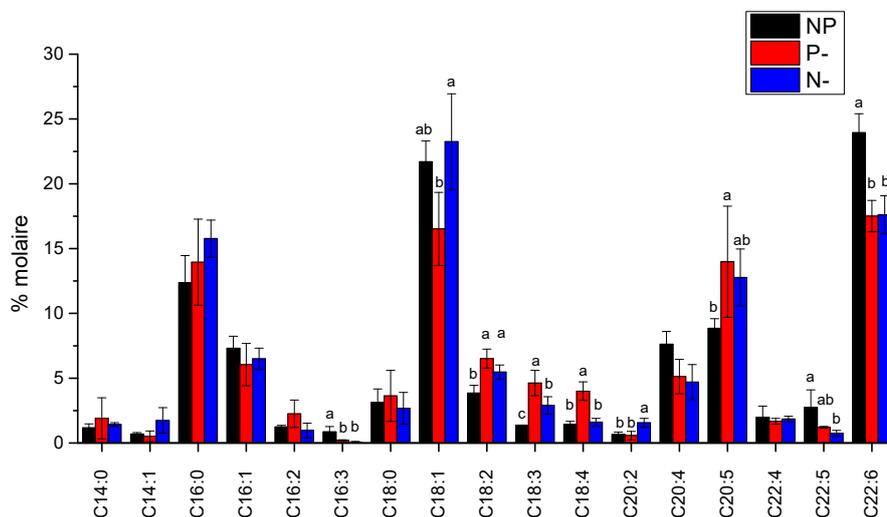


Figure III-5-7 : Composition en acides gras des phospholipides et bétaine lipides (exprimée en % molaire) extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

De plus, le remplacement des PL par les BL (DGTA) sous condition P- a entraîné une diminution concomitante de C18:1n-9 avec une augmentation de C18:2n-6, C18:3n-3 et C18:4n-3 (Figure III-5-7), suggérant une activité de désaturation accrue des AG, probablement liée à l'accumulation cellulaire de NAD(P)H.

Tableau III-5-7 : Composition en acides gras (% molaire) des phospholipides et bêtaïne lipides extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

	NP	P-	N-
\sum AGS	16,67 \pm 3,19	19,48 \pm 3,76	19,21 \pm 1,38
\sum AGMI	29,47 \pm 0,88 ^a	22,90 \pm 1,04 ^b	31,48 \pm 3,18 ^a
\sum AGPI	53,85 \pm 3,01 ^{ab}	57,61 \pm 3,77 ^a	49,31 \pm 2,73 ^b
\sum n-6	13,42 \pm 1,96	15,01 \pm 1,27	14,06 \pm 2,01
\sum n-3	39,17 \pm 2,13	41,47 \pm 4,58	35,67 \pm 1,68
n-6/n-3	0,34 \pm 0,04	0,37 \pm 0,07	0,39 \pm 0,05

Les AGPI sont prédominants dans les PL et BL (Tableau III-5-7), ils jouent un rôle important pour le maintien de la fluidité de la membrane non-plastidiale. Les proportions des AGPI ont tendance à augmenter sous condition de limitation en P suggérant une activité de désaturation accrue. Le rapport n-6 / n-3 n'est pas affecté par les deux limitations nutritives.

III.5.3.2 Composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides chez *T. lutea*

Dans les PL et BL, les principaux AG sont les C16:0, C18:1n-9 et le DHA, représentant 75 à 91 % des AG dans les trois conditions expérimentales (Figure III-5-8). Le DHA est principalement associé aux PL et BL chez *T. lutea* (Marchetti *et al.*, 2018; Nalder *et al.*, 2015).

La composition en AG des PL et BL montre une forte différence globale sous limitation en N (ANOSIM globale $R = 1$, $p = 0,001$). Les principaux changements du profil en AG sont associés à l'augmentation de C18:1n-9 et à des diminutions concomitantes de DHA, C16:0, C14:0 et C16:1n-7 : 33 % de dissemblance par rapport à la culture NP (Figure III-5-8). L'accumulation de C18:1n-9 dans cette fraction est probablement liée à une activité de $\Delta 12$ désaturation et d'élongation plus faible dans le cytoplasme. La proportion de DHA passe de 35 % à 15 %. Des études antérieures ont montré que la proportion d'AG à longue chaîne diminue sous limitation de N (Breuer *et al.*, 2012; Rasdi et Qin, 2015; Sukenik et Wahnon, 1991). La diminution de DHA et d'autres AG à C20 ~ 22 dans la fraction PL et BL pourrait aussi être due en partie à leur incorporation dans les TAG comme nous l'avons mentionné précédemment.

Au contraire, la composition en AG des PL et BL ne montre aucune différence sous limitation en P par rapport aux cellules témoins (12 % de dissemblance, ANOSIM R = -0,3333, p = 0,01). Les cellules P- ont gardé une proportion de DHA élevée de 35 % (Figure III-5-8). Compte tenu de l'augmentation des teneurs cellulaires en BL (voir chapitre 3), la teneur en DHA à l'échelle cellulaire a augmenté d'environ 1,9 fois par rapport à celle des cultures NP.

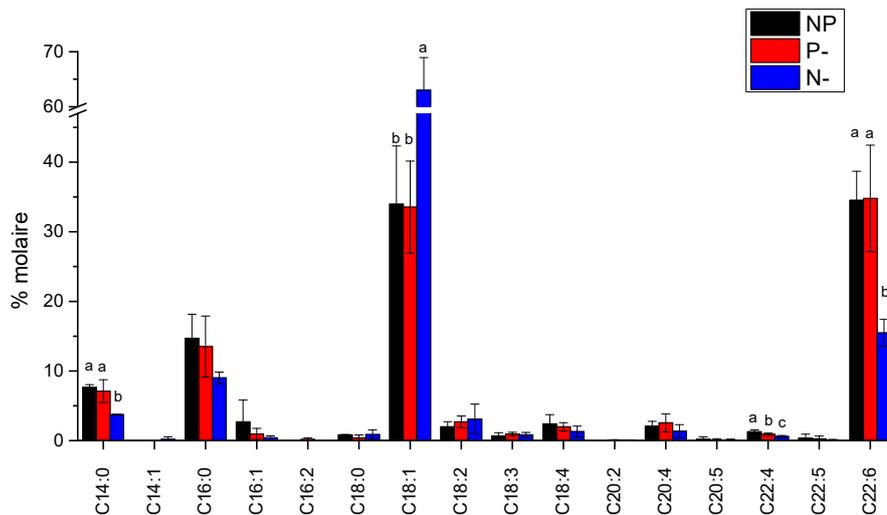


Figure III-5-8 : Composition en acides gras des phospholipides et bétaine lipides (exprimée en % molaire) extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

Tableau III-5-8 : Composition en acides gras (% molaire) des phospholipides et bétaine lipides extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

	NP	P-	N-
\sum AGS	24,48 \pm 3,31 ^a	21,01 \pm 4,02 ^a	13,61 \pm 0,34 ^b
\sum AGMI	35,76 \pm 5,64 ^b	34,49 \pm 5,87 ^b	63,60 \pm 6,14 ^a
\sum AGPI	41,35 \pm 2,24 ^a	44,50 \pm 9,75 ^a	22,80 \pm 5,85 ^b
\sum n-6	5,35 \pm 0,81	6,32 \pm 2,02	4,25 \pm 1,54
\sum n-3	36,93 \pm 3,90 ^a	38,05 \pm 8,05 ^a	17,73 \pm 3,02 ^b
n-6/n-3	0,15 \pm 0,03	0,17 \pm 0,04	0,23 \pm 0,05

L'analyse de la composition en AG des PL et BL confirme que le métabolisme de *T. lutea* est modifié différemment selon le type de limitation nutritive. En condition de limitation en N, les proportions en AGPI (en particulier en DHA) sont fortement réduites dans les lipides polaires membranaires (Tableau III-5-8), suggérant que cette limitation inhibe la synthèse de DHA

et / ou stimule le recyclage des DHA vers les TAG. En revanche, la limitation en P active la synthèse *de novo* des AG au niveau des chloroplastes mais n'a pas d'effet sur les activités de désaturation et d'élongation des AG au niveau des lipides polaires membranaires.

III.5.3.3 Composition en AG des phospholipides et bêtaïne lipides chez *D. lutheri*

Chez *D. lutheri*, les PL et BL sont principalement constitués des C16:0 et C18:1n-9, d'EPA et de DHA, représentant 84 à 90 % des AG totaux des lipides polaires dans les trois conditions expérimentales (Figure III-5-9). Il est à noter que les deux derniers AG sont en fortes proportions. Tatsuzawa et Takizawa (1995) ont suggéré que l'EPA et le DHA sont à des niveaux maximum dans les BL, ils jouent un rôle majeur dans l'acclimatation aux basses températures.

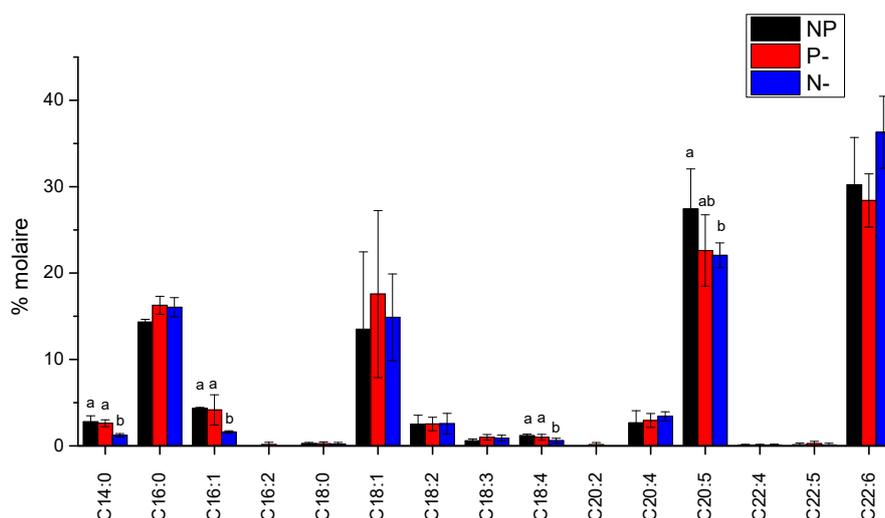


Figure III-5-9 : Composition en acides gras des phospholipides et bêtaïne lipides (exprimée en % molaire) extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

La composition en AG des PL et BL varie peu en condition de limitation nutritive par rapport au témoin (ANOSIM $R = 0,1852$, $p = 0,003$ en condition de limitation en N ; ANOSIM $R = -0,03704$, $p = 0,005$ en condition de limitation en P). La proportion d'EPA a tendance à diminuer, il pourrait être transféré vers les lipides neutres (Guihéneuf et Stengel, 2017). La proportion de DHA reste relativement stable, il ne semble donc pas y avoir de transfert massif du DHA entre les fractions lipidiques.

Tableau III-5-9 Composition en acides gras (% molaire) des phospholipides et bétaine lipides extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. (n = 3).

	NP	P-	N-
Σ AGS	17,57 \pm 0,75	21,26 \pm 4,48	17,81 \pm 1,48
Σ AGMI	16,72 \pm 10,13	21,40 \pm 8,58	14,94 \pm 7,38
Σ AGPI	65,71 \pm 10,70	57,34 \pm 4,12	67,25 \pm 6,07
Σ n-6	5,35 \pm 1,40	5,63 \pm 1,10	6,15 \pm 1,14
Σ n-3	60,36 \pm 10,71	51,63 \pm 4,87	61,10 \pm 6,77
n-6/n-3	0,09 \pm 0,03	0,11 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03

Les AGPI sont prédominants dans les PL et BL. La limitation nutritive n'a pas d'effet significatif sur les proportions des AGS, AGMI et AGPI. Guihéneuf *et al.* (2011) ont suggéré que la voie de synthèse des AG de la série n-3 est prédominante chez *D. lutheri*. Nos résultats confirment cette hypothèse, le rapport n-6 / n-3 reste très faible, quel que soit le milieu de culture.

III.5.4 Conclusion

La présente étude fournit le profil lipidique de *P. tricornutum*, *T. lutea* et *D. lutheri*. Globalement, les AGS et AGMI sont prédominants dans les lipides neutres, tandis que les AGPI sont le plus souvent associés aux lipides polaires des membranes dont ils assurent la fluidité.

En général, les limitations nutritives inhibent la synthèse des AGPI chez les microalgues par rapport aux conditions favorables de croissance. Cependant, l'accumulation de C en excès sous forme d'acétyl-CoA et une production élevée de pouvoir réducteur favorisent la synthèse *de novo* des AG, surtout du C16. Cette modification du métabolisme carboné provoque des modifications de la composition en AG notamment au niveau des lipides neutres. Nos résultats permettent de mieux comprendre cette réorientation métabolique des lipides au niveau des AG sous conditions de limitation en P ou en N, il s'agit de la synthèse *de novo* des AG et de la répartition des AGPI de la famille des n-3 entre les différentes fractions lipidiques.

En ce qui concerne la production des AGPI-LC de la série n-3, chez *P. tricornutum*, la limitation en P induit, au niveau cellulaire, une augmentation des teneurs en EPA dans les lipides neutres et membranaires, alors que celle en EPA est peu affectée par la limitation en N.

Chez *T. lutea*, la limitation en P maintient une proportion élevée de DHA dans la fraction

des phospholipides et bétaine lipides, tandis que la limitation en N favorise la distribution de DHA dans les TAG.

En ce qui concerne *D. lutheri*, la limitation nutritive, notamment celle en N, favorise l'incorporation de l'EPA dans les TAG, alors que le DHA est moins affecté. Nous avons observé une augmentation de la proportion en EPA dans les lipides neutres sous conditions limitantes en P et en N. Selon Guihéneuf et Stengel (2013), malgré les moindres proportions d'EPA et de DHA (en % molaire d'AG totaux) sous limitation en N, les teneurs en EPA et DHA rapportées à un biovolume et à la cellule augmentent.

Conclusion et Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De façon générale, l'effet du phosphore sur le métabolisme du carbone des microalgues reste encore peu étudié. Les différentes approches pluridisciplinaires mises en œuvre dans ce travail ont permis d'appréhender la réorientation métabolique des lipides, en particulier des lipides polaires, en réponse à une limitation en P ou en N chez les trois espèces de microalgues marines : *P. tricornutum*, *T. lutea* et *D. lutheri*. Une meilleure connaissance de cette réorientation métabolique permettra de sélectionner les espèces d'intérêt et d'améliorer leur valorisation.

Dans nos travaux, l'impact d'une limitation en P a été comparé à celui obtenu avec une limitation en N ainsi qu'avec des témoins cultivés en condition non-limitante. L'activité photosynthétique des microalgues, les concentrations résiduelles de P et de N dans les milieux de culture et les différentes réponses biochimiques et transcriptionnelles ont été mesurées tout au long de la durée des cultures réalisées en conditions contrôlées.

Nos résultats ont montré que la croissance de *P. tricornutum* est plus sensible vis-à-vis de la limitation en P que celle des Haptophytes, notamment *D. lutheri*, qui nécessitent moins de P. La limitation nutritive en P ou en N affecte différemment le métabolisme du carbone selon les espèces microalgales.

Les limitations en P et en N réduisent fortement l'intensité photosynthétique chez les trois espèces, malgré que les teneurs en pigments soient moins affectées dans les cultures P-. En raison de la faible respiration, l'efficacité de la fixation du C devient alors importante dans la condition de limitation en P, et favorise l'accumulation du C à l'échelle cellulaire chez *P. tricornutum* et *T. lutea* (Tableau C&P-1). Un des éléments nouveaux apportés par nos travaux, concerne l'analyse de la relaxation du quenching non photochimique. Chez *P. tricornutum*, l'augmentation de qN_i en condition de limitation en P indique une hausse de la dissipation d'énergie en excès sous forme de chaleur (via NPQ), tandis que l'augmentation de qN_s sous limitation en N montre une forte photo-inhibition de PSII. Chez les Haptophytes, notamment *T. lutea*, le NPQ est moins important que chez *P. tricornutum*, l'augmentation significative de qN_s indique une forte photo-inhibition de PSII dans les conditions de limitation en P et en N.

Sous conditions de limitations nutritives, le flux de C est orienté principalement vers la biosynthèse des lipides neutres et / ou des glucides (Tableau C&P-1). Les teneurs rapportées à la quantité de C pourront refléter de façon plus précise la réorientation métabolique en réponse à la limitation nutritive. Nos résultats ont montré que les glucides sont probablement le stockage primaire d'énergie chez *P. tricornutum* et *T. lutea* tandis que la limitation en P favorise le

passage d'un métabolisme gluconéogénique à un métabolisme glycolytique, le flux de C se réoriente alors vers la biosynthèse des lipides neutres en particulier pendant la phase stationnaire. Ces résultats ont montré que la limitation en P joue un rôle similaire à la limitation en N sur l'allocation du C vers les lipides neutres. L'accumulation des lipides neutres dépend de l'accumulation du C cellulaire et de la phase de croissance.

En tant que puits de carbone possible, l'analyse de la production de polysaccharides extracellulaires (ECPS) serait très intéressante pour mieux comprendre le flux de C dans les cellules. Par ailleurs, pour *T. lutea*, le dosage des teneurs en alcénones serait nécessaire pour compléter nos connaissances sur l'accumulation des lipides neutres sous condition de limitation.

En ce qui concerne les lipides polaires, généralement les membranes des thylacoïdes sont plus affectées par la limitation en N, tandis que la limitation en P joue un rôle plus important sur le remodelage des membranes non-plastidiales. Chez *P. tricornutum*, la substitution de PG par SQDG est observé dans les chloroplastes, tandis que la BL de type DGTA remplace de façon concomitante les PL dans les membranes non-plastidiales. Cette dynamique élevée entre les PL et les lipides non-phosphorés pourrait conférer une compétitivité accrue de ces microalgues dans les milieux à faible disponibilité en P. L'analyse au niveau transcriptionnel nous permet d'apporter de nouveaux éléments de connaissance sur la réorientation métabolique lipidique en réponse à une limitation nutritive. Nos résultats ont montré que les PL pourraient être synthétisés en continu sous limitation en P ; cependant, ils ne sont pas utilisés dans la synthèse des lipides membranaires mais contribuent directement aux mécanismes de remaniement des lipides qui impliquent leur dégradation et leur remplacement par des lipides non-phosphorés, tels que les TAG et les BL. La surexpression de la bêtaïne lipide synthase semble être spécifique à la limitation en P. Etant donné le temps de réponse court, la synthèse de DGTA chez *P. tricornutum* pourrait être étroitement régulée par la concentration en P externe.

En revanche, chez les Haptophytes (*T. lutea* et *D. lutheri*), en raison du niveau extrêmement bas des PL constitutifs, la substitution des PL pourrait ne pas être impliquée dans la régulation du stockage du P. Ce faible besoin de P pour le métabolisme lipidique pourrait être un mécanisme d'optimisation de l'adaptation évolutive à la carence en P. Chez *T. lutea*, la surexpression de la bêtaïne lipide synthase est aussi observée sous limitation en P, cependant, la sensibilité et l'intensité de cette réponse sont beaucoup plus faibles que celles obtenues chez *P. tricornutum*. La surexpression de la bêtaïne lipide synthase chez *T. lutea* n'est peut-être pas directement liée à la limitation en P externe mais pourrait être en lien avec certaines réponses tardives restant à élucider.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement aux voies de biosynthèse des lipides. Une étude de la dégradation et/ou de l'oxydation des lipides au cours des stress P- et N- serait nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu au cours des différentes variations observées au niveau des lipides. Par ailleurs, des mesures d'activités enzymatiques de biosynthèse mais aussi de dégradation des lipides permettraient de conforter les résultats obtenus.

Dans notre étude, chez *D. lutheri*, la condition de limitation en P s'accompagne d'une privation en N, ce qui conduit à des réponses très similaires à la seule limitation en N. Pour mieux comprendre l'impact de la seule limitation en P chez *D. lutheri*, un rapport N : P beaucoup plus élevé est nécessaire. Par ailleurs, la recherche des gènes d'intérêt chez cette espèce mériterait d'être entreprise.

Avec la méthode utilisée, nous n'avons pas séparé et identifié tous les lipides chez les microalgues étudiées. Une identification structurale SM/SM (spectrométrie de masse en tandem) est toujours nécessaire pour distinguer d'autres classes de lipides. En ce qui concerne la quantification des lipides polaires, en raison de l'absence des standards, certains lipides ont été quantifiés par comparaison au standard le plus proche. La quantification basée sur CCM-MALDI-SM (coupage CCM à la spectrométrie de masse à désorption-ionisation laser assistée par matrice) ou CCM-CPG-FID (CCM couplée avec chromatographie en phase gazeuse et détection à ionisation de flamme) est encore nécessaire pour vérifier les résultats obtenus.

Enfin, une étude particulièrement intéressante à mener consiste à déterminer les compositions en AG dans les différentes fractions lipidiques. L'étude des profils en AG constitue en effet une étape importante à réaliser avant d'envisager une valorisation des espèces étudiées. Ceci permettra également de contribuer à une meilleure connaissance concernant le trafic d'AG au cours d'une limitation en P ou en N. Nos résultats ont montré la synthèse *de novo* des AG et la répartition des AGPI de la famille des $\omega 3$. Une attention particulière a été portée à l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 $\omega 3$) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 $\omega 3$) dont les proportions varient en fonction de l'élément limitant, de l'espèce et de la classe lipidique. En général, l'EPA est préférentiellement incorporé dans les glycolipides plastidiaux tandis que le DHA est principalement associé aux PL et BL. Les limitations nutritives ne favorisent pas la synthèse des AGPI chez les microalgues par rapport aux conditions favorables de croissance. L'activation du recyclage des lipides polaires entraîne la migration des AGPI vers les lipides neutres. Pour mieux comprendre le trafic d'AG impliqué dans le remaniement des lipides, l'analyse SM / SM est encore nécessaire pour chaque classe lipidique.

Chez *P. tricornutum*, la limitation en P induit, à l'échelle cellulaire, une augmentation des teneurs en EPA dans les lipides neutres, alors qu'elle est peu affectée par la limitation en N. En revanche, chez *T. lutea*, c'est la limitation en N qui favorise la distribution de DHA dans les lipides neutres. En ce qui concerne *D. lutheri*, la limitation nutritive, notamment celle en N, favorise l'incorporation de l'EPA dans les lipides neutres, alors que le DHA est moins affecté (Tableau C&P-1). Il serait nécessaire d'effectuer une étude complémentaire en grand volume (m³) afin de vérifier la stabilité des résultats obtenus et calculer la productivité des cultures avant d'envisager une valorisation des AGPI.

Tableau C&P-1 : Tableau résumant certains résultats obtenus chez les trois microalgues cultivées en batch en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) en comparaison avec les cellules non-limitées. n.d.= non détecté, ± =stable, ±/+ = tendance à augmenter, ±/- = tendance à diminuer.

	<i>P. tricornutum</i>		<i>T. lutea</i>		<i>D. lutheri</i>	
	P-	N-	P-	N-	P-	N-
Densité cellulaire	—	—	—	—	—	—
Volume cellulaire	+	—	+	±/+	±/+	±/+
Pigment (Chl <i>a</i>) / C	±	—	±/-	—	±/-	—
Fv/Fm	—	—	±	—	—	—
Photosynthèse / C	—	—	—	—	—	—
Respiration / C	—	±/-	—	±/-	—	—
C cellulaire	+	—	+	±/+	+	+
Protéines solubles / C	—	—	±/-	—	—	—
Glucides solubles / C	+	+	+	+	—	—
Lipides neutres / C	+	+	+	+	+	+
Glycolipides / C	±/-	±/-	—	—	—	—
Phospholipides / C	—	±	—	±/-	—	—
Bétaïne lipides / C	+	±	±	±	—	—
EPA teneur cellulaire	+	±	n.d.	n.d.	+	+
DHA teneur cellulaire	±/+	±	±/+	±/+	±/+	±/+

Bibliographie

A

- Abdullahi, A. S., Underwood, G. J. C. et Gretz, M. R. (2006). Extracellular matrix assembly in diatoms (bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Phycology*, 42(2), 363-378.
- Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M. A., ... Maréchal, E. (2015). Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, 167(1), 118-136.
- Ågren, G. I. (2004). The C:N:P stoichiometry of autotrophs – theory and observations. *Ecology Letters*, 7(3), 185-191.
- Ai, X.-X., Liang, J.-R., Gao, Y.-H., Lo, S. C.-L., Lee, F. W.-F., Chen, C.-P., ... Du, C. (2015). MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 673-684.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., ... Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (3rd éd.). (s. l.) : Garland Science.
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M. et Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 66(20), 6281-6296.
- Alipanah, L., Winge, P., Rohloff, J., Najafi, J., Brembu, T. et Bones, A. M. (2018). Molecular adaptations to phosphorus deprivation and comparison with nitrogen deprivation responses in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One*, 13(2), e0193335.
- Allen, A. E., Dupont, C. L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J. P., ... Bowler, C. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 473(7346), 203-207.
- Allen, J. W., DiRusso, C. C. et Black, P. N. (2015). Triacylglycerol synthesis during nitrogen stress involves the prokaryotic lipid synthesis pathway and acyl chain remodeling in the microalgae *Coccomyxa subellipsoidea*. *Algal Research*, 10, 110-120.
- Alonso, D. L., Belarbi, E.-H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J. et Grima, E. M. (2000). Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 54(5), 461-471.
- Alonso, D. L., Belarbi, E.-H., Rodríguez-Ruiz, J., Segura, C. I. et Giménez, A. (1998). Acyl lipids of three microalgae. *Phytochemistry*, 47(8), 1473-1481.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- American Public Health Association. (1992). *APHA method 4500-NO3: standard methods for the examination of water and wastewater*. [APHA Method 4500-NO3].
- Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C. et Sandelius, A. S. (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Letters*, 537(1), 128-132.

Armada, I., Hachero-Cruzado, I., Mazuelos, N., Ríos, J. L., Manchado, M. et Cañavate, J. P. (2013). Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry*, 95, 224-233.

Aronsson, H., Schöttler, M. A., Kelly, A. A., Sundqvist, C., Dörmann, P., Karim, S. et Jarvis, P. (2008). Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant Physiology*, 148(1), 580-592.

B

Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroustos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., ... Finazzi, G. (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature*, 524(7565), 366-369.

Banskota, A. H., Stefanova, R., Sperker, S. et McGinn, P. J. (2013). New diacylglyceryltrimethylhomoserines from the marine microalga *Nannochloropsis granulata* and their nitric oxide inhibitory activity. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1513-1521.

Batan, L., Quinn, J., Willson, B. et Bradley, T. (2010). Net energy and greenhouse gas emission evaluation of biodiesel derived from microalgae. *Environmental Science & Technology*, 44(20), 7975-7980.

Battye, W., Aneja, V. P. et Schlesinger, W. H. (2017). Is nitrogen the next carbon? *Earth's Future*, 5(9), 894-904.

Beale, S. I. et Appleman, D. (1971). Chlorophyll synthesis in *Chlorella*: Regulation by degree of light limitation of growth. *Plant Physiology*, 47(2), 230-235.

Bendif, E. M., Probert, I., Hervé, A., Billard, C., Goux, D., Lelong, C., ... Véron, B. (2011). Integrative taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): A reassessment. *Protist*, 162(5), 738-761.

Bendif, E. M., Probert, I., Schroeder, D. C. et Vargas, C. de. (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(6), 1763-1776.

Benning, C., Beatty, J. T., Prince, R. C. et Somerville, C. R. (1993). The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1561-1565.

Benning, C., Huang, Z. H. et Gage, D. A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(1), 103-111.

Benvenuti, G., Bosma, R., Cuaresma, M., Janssen, M., Barbosa, M. J. et Wijffels, R. H. (2015). Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1425-1431.

Berdalet, E., Latasa, M. et Estrada, M. (1994). Effects of nitrogen and phosphorus starvation on nucleic acid and protein content of *Heterocapsa* sp. *Journal of Plankton Research*, 16(4), 303-316.

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. et Stryer, L. (2002). There are three common types of membrane lipids. Dans *Biochemistry, Fifth Edition* (p. 1088). W.H. Freeman.
- Bertrand, M., Schoefs, B., Siffel, P., Rohacek, K. et Molnar, I. (2001). Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin to diadinoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *FEBS Letters*, 508(1), 153-156.
- Beszteri, S., Yang, I., Jaeckisch, N., Tillmann, U., Frickenhaus, S., Glöckner, G., ... John, U. (2012). Transcriptomic response of the toxic prymnesiophyte *Prymnesium parvum* (N. Carter) to phosphorus and nitrogen starvation. *Harmful Algae*, 18, 1-15.
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D. et Cohen, Z. (2002). Biosynthesis of arachidonic acid in the oleaginous microalga *Parietochloris incisa* (Chlorophyceae): radiolabeling studies. *Lipids*, 37(2), 209-216.
- Blank, L. M. (2012). The cell and P: from cellular function to biotechnological application. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 846-851.
- Bligh, E. G. et Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J. et Douce, R. (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(21), 13281-13286.
- Boelen, P., Mastriqt, A. van, Bovenkamp, H. H. van de, Heeres, H. J. et Buma, A. G. J. (2017). Growth phase significantly decreases the DHA-to-EPA ratio in marine microalgae. *Aquaculture International*, 25(2), 577-587.
- Boitt, G. (2017). *Phosphorus legacy: role of long-term soil phosphorus accumulation in the sustainable management of intensive agroecosystems*. (Thèse de doctorat). New Zealand: Lincoln University.
- Borowitzka, M. A. et Volcani, B. E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. *Journal of Phycology*, 14(1), 10-21.
- Boudière, L., Botté, C. Y., Saidani, N., Lajoie, M., Marion, J., Bréhélin, L., ... Maréchal, E. (2012). Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Molecular bioSystems*, 8(8), 2023-2035, 2014.
- Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., ... Maréchal, E. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 470-480.
- Bougaran, G. (2014). *Laco-limitation par l'azote et le phosphore : étude des mécanismes chez la microalgue *Tisochrysis lutea**. (Thèse de doctorat). France: Université de Nantes.
- Bougaran, G., Bernard, O. et Sciandra, A. (2010). Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*, 265(3), 443-454.
- 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), 2737-2745.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., ... Grigoriev, I. V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L. et Bones, A. M. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philosophical transactions of the royal society B*, 372(1728), 20160406.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. et Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217-226.
- Bristow, L. A., Mohr, W., Ahmerkamp, S. et Kuypers, M. M. M. (2017). Nutrients that limit growth in the ocean. *Current Biology*, 27(11), R474-R478.
- Brooks, A. (1986). Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some calvin-cycle metabolites in spinach leaves. *Functional Plant Biology*, 13(2), 221-237.
- Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S. W., Jameson, I. D. et Leroi, J. M. (1993). The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5(3), 285-296.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. et Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1), 315-331.
- Brzezinski, M., Olson, R. et Chisholm, S. (1990). Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, 67, 83-96.
- Büchel, C. (2015). Evolution and function of light harvesting proteins. *Journal of Plant Physiology*, 172, 62-75.
- Burrows, E. H., Bennette, N. B., Carrieri, D., Dixon, J. L., Brinker, A., Frada, M., ... Dismukes, G. C. (2012). Dynamics of lipid biosynthesis and redistribution in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrate deprivation. *BioEnergy Research*, 5(4), 876-885.
- Burson, A., Stomp, M., Akil, L., Brussaard, C. P. D. et Huisman, J. (2016). Unbalanced reduction of nutrient loads has created an offshore gradient from phosphorus to nitrogen limitation in the North Sea. *Limnology and Oceanography*, 61(3), 869-888.

C

- Campbell, P. K., Beer, T. et Batten, D. (2011). Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds. *Bioresource Technology*, 102(1), 50-56.
- Cañavate, J. P., Armada, I. et Hachero-Cruzado, I. (2017a). Aspects of phosphorus physiology associated with phosphate-induced polar lipid remodelling in marine microalgae. *Journal of Plant Physiology*, 214, 28-38.
- Cañavate, J. P., Armada, I. et Hachero-Cruzado, I. (2017b). Interspecific variability in phosphorus-induced lipid remodelling among marine eukaryotic phytoplankton. *New Phytologist*, 213(2), 700-713.
- Cañavate, J. P., Armada, I., Ríos, J. L. et Hachero-Cruzado, I. (2016). Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry*, 124, 68-78.

- Carrier, G., Baroukh, C., Rouxel, C., Duboscq-Bidot, L., Schreiber, N. et Bougaran, G. (2018). Draft genomes and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. Toward the production of domesticated strains with high added value. *Algal Research*, 29, 1-11.
- Cembella, A. D., Antia, N. J. et Harrison, P. J. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Critical Reviews in Microbiology*, 10(4), 317-391.
- Chapman, M. G. et Underwood, A. J. (1999). Ecological patterns in multivariate assemblages: information and interpretation of negative values in ANOSIM tests. *Marine Ecology Progress Series*, 180, 257-265.
- Charpin, M. et Devaux, J. (1998). Les principales voies enzymatiques de l'assimilation de l'azote chez les microalgues eucaryotes. *L'Année Biologique*, 37(1), 1-9.
- Charrier, A., Bérard, J.-B., Bougaran, G., Carrier, G., Lukomska, E., Schreiber, N., ... Saint-Jean, B. (2015). High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (Nrt2) in *Tisochrysis lutea*: identification and expression analyses reveal some interesting specificities of Haptophyta microalgae. *Physiologia Plantarum*, 154(4), 572-590.
- Chauton, M. S., Winge, P., Brembu, T., Vadstein, O. et Bones, A. M. (2013). Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. *Plant Physiology*, 161(2), 1034-1048.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. et Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41-47.
- Chung, C.-C., Hwang, S.-P. L. et Chang, J. (2003). Identification of a high-affinity phosphate transporter gene in a prasinophyte alga, *Tetraselmis chui*, and its expression under nutrient limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 754-759.
- Chylla, R. A. et Whitmarsh, J. (1989). Inactive photosystem II complexes in leaves : turnover rate and quantitation. *Plant Physiology*, 90(2), 765-772.
- Colette, C. et Monnier, L. (2011). Acides gras : classification, fonction et équilibre entre les différentes familles: Fatty acids: Classification, function and balance between the different families. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 5(3), 237-245.
- Conte, M. H., Thompson, A., Eglinton, G. et Green, J. C. (1995). Lipid biomarker diversity in the coccolithophorid *Emiliana Huxleyi*(prymnesiophyceae) and the Related Species *Gephyrocapsa Oceanica*. *Journal of Phycology*, 31(2), 272-282.
- Cooper, G. M. (2000). *The cell: A molecular approach*. [The Cell]. ASM Press.
- Cordell, D., Drangert, J.-O. et White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305.
- Cordell, D. et White, S. (2011). Peak phosphorus: Clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustainability*, 3(10), 2027-2049.
- Coutteau, P. et Sorgeloos, P. (1992). The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: An international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11(2), 467-476.

Crawford, N. M. et Glass, A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3(10), 389-395.

Cruz de Carvalho, M. H., Sun, H.-X., Bowler, C. et Chua, N.-H. (2016). Noncoding and coding transcriptome responses of a marine diatom to phosphate fluctuations. *New Phytologist*, 210(2), 497-510.

Curtis, B. A., Tanifuji, G., Burki, F., Gruber, A., Irimia, M., Maruyama, S., ... Archibald, J. M. (2012). Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*, 492(7427), 59.

D

Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., ... Duchateau, P. (2014). Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nature Communications*, 5, 3831.

Da Costa, F., Le Grand, F., Quéré, C., Bougaran, G., Cadoret, J. P., Robert, R. et Soudant, P. (2017). Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*. *Algal Research*, 27, 177-189.

De Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K. et Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43(5), 992-1009.

De Mazancourt, C. et Schwartz, M. W. (2012). Starve a competitor: evolution of luxury consumption as a competitive strategy. *Theoretical Ecology*, 5(1), 37-49.

Dembitsky, V. M. (1996). Betaine ether-linked glycerolipids: Chemistry and biology. *Progress in Lipid Research*, 35(1), 1-51.

Demé, B., Cataye, C., Block, M. A., Maréchal, E. et Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(8), 3373-3383.

Dewey, R. E., Wilson, R. F., Novitzky, W. P. et Goode, J. H. (1994). The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. *The Plant Cell*, 6(10), 1495-1507.

Dick, C. F., Dos-Santos, A. L. A. et Meyer-Fernandes, J. R. (2014). Inorganic phosphate uptake in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(7), 2123-2127.

Din, J. N., Harding, S. A., Valerio, C. J., Sarma, J., Lyall, K., Riemersma, R. A., ... Flapan, A. D. (2008). Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis*, 197(1), 290-296.

Dittmer, J. C. et Lester, R. L. (1964). A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research*, 5, 126-127.

Di Valentin, M., Büchel, C., Giacometti, G. M. et Carbonera, D. (2012). Chlorophyll triplet quenching by fucoxanthin in the fucoxanthin-chlorophyll protein from the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(3), 637-641.

Dolch, L.-J. et Maréchal, E. (2015). Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs*, 13(3), 1317-1339.

- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P. G., ... Heinz, E. (2003). New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases. *Plant Physiology*, 131(4), 1648-1660.
- Doughman, S. D., Krupanidhi, S. et Sanjeevi, C. B. (2007). Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Current Diabetes Reviews*, 3(3), 198-203.
- Droop, M. R. (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology*, 9(3), 264-272.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167.
- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J. et Parmentier, M. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), 710-732.
- Duff, S. M., Moorhead, G. B., Lefebvre, D. D. et Plaxton, W. C. (1989). Phosphate starvation inducible « bypasses » of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology*, 90(4), 1275-1278.
- Durkin, C. A., Mock, T. et Armbrust, E. V. (2009). Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryotic Cell*, 8(7), 1038-1050.
- Dyhrman, S. T. (2016). Nutrients and their acquisition: Phosphorus physiology in microalgae. [Nutrients and Their Acquisition]. Dans *The Physiology of Microalgae* (p. 155-183). Springer, Cham.
- Dyhrman, S. T., Haley, S. T., Birkeland, S. R., Wurch, L. L., Cipriano, M. J. et McArthur, A. G. (2006). Long serial analysis of gene expression for gene discovery and transcriptome profiling in the widespread marine coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 252-260.
- Dyhrman, S. T., Jenkins, B. D., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Mercier, M. L., Alexander, H., ... Heithoff, A. (2012). The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS One*, 7(3), e33768.
- Dyhrman, S. T. et Ruttenberg, K. C. (2006). Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1381-1390.

E

- Eichenberger, W. et Gribi, C. (1997). Lipids of *Pavlova lutheri*: Cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry*, 45(8), 1561-1567.
- Elgavish, A., Halmann, M. et Berman, T. (1982). A comparative study of phosphorus utilization and storage in batch cultures of *Peridinium cinctum*, *Pediastrum duplex* and *Cosmarium* sp., from Lake Kinneret (Israel). *Phycologia*, 21(1), 47-54.
- Elrifi, I. R. et Turpin, D. H. (1985). Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios: a study with phosphate and nitrate limited *selenastrum minutum* (chlorophyta). *Journal of Phycology*, 21(4), 592-602.

Elser, J. J. (2012). Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Current Opinion in Biotechnology*, 23(6), 833-838.

El-Sheek, M. M. et Rady, A. A. (1995). Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Phyton (Horn)*, 35(1), 139-151.

F

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., ... Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S9-14.

Fairbridge, R. W. (1972). Climatology of a glacial cycle. *Quaternary Research*, 2(3), 283-302.

Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O. et Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682), 354-360.

Falkowski, P. G. et Raven, J. A. (2007). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.

Fan, J., Andre, C. et Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS letters*, 585(12), 1985-1991.

Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J. et Xu, C. (2012). Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & Cell Physiology*, 53(8), 1380-1390.

Feng, T.-Y., Yang, Z.-K., Zheng, J.-W., Xie, Y., Li, D.-W., Murugan, S. B., ... Li, H.-Y. (2015). Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Scientific Reports*, 5, 10373.

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. et Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281(5374), 237-240.

Flügge, U.I., Häusler, R. E., Ludewig, F. et Fischer, K. (2003). Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. *Physiologia Plantarum*, 118(4), 475-482.

Forde, B. G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1), 219-235.

Fu, Mei, Song, X., Yu, Z. et Liu, Y. (2013). Responses of phosphate transporter gene and alkaline phosphatase in *Thalassiosira pseudonana* to phosphine. *PLoS One*, 8(3), e59770.

Fu, Mingzhu, Wang, Z., Pu, X., Xu, Z. et Zhu, M. (2012). Changes of nutrient concentrations and N:P:Si ratios and their possible impacts on the Huanghai Sea ecosystem. *Acta Oceanologica Sinica*, 31(4), 101-112.

Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M. et Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2754-2774.

G

- Gao, B., Chen, A., Zhang, W., Li, A. et Zhang, C. (2017). Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions. *Journal of Ocean University of China*, 16(5), 916-924.
- Galbraith, E. D. et Martiny, A. C. (2015). A simple nutrient-dependence mechanism for predicting the stoichiometry of marine ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), 8199-8204.
- Galvan, A. et Fernández, E. (2001). Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 58(2), 225-233.
- Ganf, G. G., Stone, S. J. L. et Oliver, R. L. (1986). Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, 37(2), 183-197.
- Gargouri, M., Park, J.-J., Holguin, F. O., Kim, M.-J., Wang, H., Deshpande, R. R., ... Gang, D. R. (2015). Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4551-4566.
- Garnier, M., Carrier, G., Rogniaux, H., Nicolau, E., Bougaran, G., Saint-Jean, B. et Cadoret, J. P. (2014). Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *Journal of Proteomics*, 105, 107-120.
- Garnier, M., Bougaran, G., Pavlovic, M., Berard, J.-B., Carrier, G., Charrier, A., ... Saint-Jean, B. (2016). Use of a lipid rich strain reveals mechanisms of nitrogen limitation and carbon partitioning in the haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Algal Research*, 20, 229-248.
- Ge, F., Huang, W., Chen, Z., Zhang, C., Xiong, Q., Bowler, C., ... Hu, H. (2014). Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *The Plant Cell*, 26(4), 1681-1697.
- Geider, R. J. (1987). Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton. *New Phytologist*, 106(1), 1-34.
- Geider, R. et La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1-17.
- Geider, R. J., La Roche, J., Greene, R. M. et Olaizola, M. (1993). Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *Journal of Phycology*, 29(6), 755-766.
- Ginzberg, M. B., Kafri, R. et Kirschner, M. (2015). On being the right (cell) size. *Science*, 348(6236), 1245075.
- Giroud, C., Gerber, A. et Eichenberger, W. (1988). Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site(s) of biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 29(4), 587-595.
- Gniazdowska, A., Mikulska, M. et Rychter, A. M. (1998). Growth, nitrate uptake and respiration rate in bean roots under phosphate deficiency. *Biologia Plantarum*, 41(2), 217-226.
- Goldman, J. C. (1986). On phytoplankton growth rates and particulate C: N: P ratios at low light. *Limnology and Oceanography*, 31(6), 1358-1363.

- Gong, Y., Guo, X., Wan, X., Liang, Z. et Jiang, M. (2011). Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Basic Microbiology*, 51(6), 666-672.
- Gong, Y., Guo, X., Wan, X., Liang, Z. et Jiang, M. (2013). Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages. *Journal of Basic Microbiology*, 53(1), 29-36.
- González-Gil, S., Keafer, B., Jovine, R., Aguilera, A., Lu, S. et Anderson, D. (1998). Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 164, 21-35.
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G. et Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Reports*, 34(4), 545-555.
- Goss, R., Nerlich, J., Lepetit, B., Schaller, S., Vieler, A. et Wilhelm, C. (2009). The lipid dependence of diadinoxanthin de-epoxidation presents new evidence for a macrodomain organization of the diatom thylakoid membrane. *Journal of Plant Physiology*, 166(17), 1839-1854.
- Guarnieri, M. T., Nag, A., Smolinski, S. L., Darzins, A., Seibert, M. et Pienkos, P. T. (2011). Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. *PLoS One*, 6(10), e25851.
- Guesnet, P., Alessandri, J.-M., Astorg, P., Pifferi, F. et Lavialle, M. (2005). Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12(5-6), 333-343.
- Guidi, L., Chaffron, S., Bittner, L., Eveillard, D., Larhlimi, A., Roux, S., ... Gorsky, G. (2016). Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature*, 532(7600), 465-470.
- Guihéneuf, F. (2008). Régulation par des facteurs environnementaux de la synthèse des acides gras à longue chaîne de différentes espèces de microalgues marines: effets combinés de l'éclaircissement et de la nature de la source carbonée sur l'optimisation de la synthèse de l'EPA et du DHA : intérêts nutritionnels. (Thèse de doctorat). France: Université du Maine.
- Guihéneuf, F. et Stengel, D. B. (2013). LC-PUFA-enriched oil production by microalgae: accumulation of lipid and triacylglycerols containing n-3 LC-PUFA is triggered by nitrogen limitation and inorganic carbon availability in the marine Haptophyte *Pavlova lutheri*. *Marine Drugs*, 11(11), 4246-4266.
- Guihéneuf, F. et Stengel, D. B. (2017). Interactive effects of light and temperature on pigments and n-3 LC-PUFA-enriched oil accumulation in batch-cultivated *Pavlova lutheri* using high-bicarbonate supply. *Algal Research*, 23, 113-125.
- Guihéneuf, F., Ulmann, L., Tremblin, G. et Mimouni, V. (2011). Light-dependent utilization of two radiolabelled carbon sources, sodium bicarbonate and sodium acetate, and relationships with long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in the microalga *Pavlova lutheri* (Haptophyta). *European Journal of Phycology*, 46(2), 143-152.
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, 48(5), 1057-1063.
- Guschina, I. A. et Harwood, J. L. (2009). Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. Dans *Lipids in Aquatic Ecosystems* (p. 1-24). Springer, New York, NY.

H

- Haas, E. et Stanley, D. W. (2007). Phospholipases. Dans *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (p. 1-3). New York : Elsevier.
- Halsey, K. H., O'Malley, R. T., Graff, J. R., Milligan, A. J. et Behrenfeld, M. J. (2013). A common partitioning strategy for photosynthetic products in evolutionarily distinct phytoplankton species. *The New Phytologist*, 198(4), 1030-1038.
- Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. A. et Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, 22(100), 3-9.
- Hamilton, M. L., Warwick, J., Terry, A., Allen, M. J., Napier, J. A. et Sayanova, O. (2015). Towards the industrial production of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids from a genetically modified diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One*, 10(12), e0144054.
- Harrison, P. J., Hu, M. H., Yang, Y. P. et Lu, X. (1990). Phosphate limitation in estuarine and coastal waters of China. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 140(1), 79-87.
- Harrison, P. J., Thompson, P. A. et Calderwood, G. S. (1990). Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 2(1), 45-56.
- Harwood, J. L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1301(1), 7-56.
- Harwood, J. L. (1998). Membrane Lipids in Algae. Dans *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (p. 53-64). Springer, Dordrecht.
- Hazahari, N. Y. B., Hosokawa, M. et Miyashita, K. (2018). Comparison of oxidative stability of monogalactosyl diacylglycerol, digalactosyl diacylglycerol, and triacylglycerol containing polyunsaturated fatty acids. *Food and Nutrition Sciences*, 09, 221-234.
- He, Q., Qiao, D., Zhang, Q., Li, Y., Xu, H., Wei, L., ... Cao, Y. (2004). Cloning and expression study of a putative high-affinity nitrate transporter gene from *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 16(5), 395-400.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V. et Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737-1746.
- Herbes, S. E., Allen, H. E. et Mancy, K. H. (1975). Enzymatic Characterization of Soluble Organic Phosphorus in Lake Water. *Science*, 187(4175), 432-434.
- Heydarizadeh, P. (2015). Regulation of secondary compounds synthesis by photosynthetic organisms under stress. (Thèse de doctorat). Université du Maine.
- Heydarizadeh, P., Poirier, I., Loizeau, D., Ulmann, L., Mimouni, V., Schoefs, B. et Bertrand, M. (2013). Plastids of Marine Phytoplankton Produce Bioactive Pigments and Lipids. *Marine Drugs*, 11(9), 3425-3471.
- Hildebrand, M. et Dahlin, K. (2000). Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): mRNA levels controlled by nitrogen source and by the cell cycle. *Journal of Phycology*, 36(4), 702-713.

Hockin, N. L., Mock, T., Mulholland, F., Kopriva, S. et Malin, G. (2012). The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiology*, 158(1), 299-312.

Hoffman, G. E., Sanchez-Puerta, M. V. et Delwiche, C. F. (2011). Evolution of light-harvesting complex proteins from Chl c-containing algae. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 101.

Hofmann, M. et Eichenberger, W. (1996). Biosynthesis of diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence for lipid-linked N methylation. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6140-6144.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. et Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621-639.

Huang, N., Siegel, M. M., Kruppa, G. H. et Laukien, F. H. (1999). Automation of a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for acquisition, analysis, and e-mailing of high-resolution exact-mass electrospray ionization mass spectral data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(11), 1166-1173.

Huang, W. et Daboussi, F. (2017). Genetic and metabolic engineering in diatoms. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372(1728), 20160411.

Hunter, J. E., Brandsma, J., Dymond, M. K., Koster, G., Moore, C. M., Postle, A. D., ... Attard, G. S. (2018). Lipidomics of *Thalassiosira pseudonana* under phosphorus stress reveal underlying phospholipid substitution dynamics and novel diglycosylceramide substitutes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(6), e02034-17.

I

Ivančić, I., Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Djakovac, T., Marić Pfannkuchen, D., Korlević, M., ... Najdek, M. (2016). Alkaline phosphatase activity related to phosphorus stress of microphytoplankton in different trophic conditions. *Progress in Oceanography*, 146, 175-186.

Iwai, M., Hori, K., Sasaki-Sekimoto, Y., Shimojima, M. et Ohta, H. (2015). Manipulation of oil synthesis in *Nannochloropsis* strain NIES-2145 with a phosphorus starvation-inducible promoter from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 912.

Iwai, M., Ikeda, K., Shimojima, M. et Ohta, H. (2014). Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation-inducible promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 808-819.

J

Jacob, J. et Lawlor, D. W. (1993). *In vivo* photosynthetic electron transport does not limit photosynthetic capacity in phosphate-deficient sunflower and maize leaves. *Plant, Cell & Environment*, 16(7), 785-795.

Jahns, P., Latowski, D. et Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(1), 3-14.

Jakob, T., Wagner, H., Stehfest, K. et Wilhelm, C. (2007). A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 2101-2112.

Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. et Wright, S. W. (1997). *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*. Paris : UNESCO Publishing.

Jouhet, J., Dubots, E., Maréchal, E. et Block, M. A. (2009). Lipid trafficking in plant photosynthetic cells. Dans *Lipids in Photosynthesis* (p. 349-372). Springer, Dordrecht.

Jouhet, J., Maréchal, E., Bligny, R., Joyard, J. et Block, M. A. (2003). Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Letters*, 544(1-3), 63-68.

Juergens, M. T., Deshpande, R. R., Lucker, B. F., Park, J.-J., Wang, H., Gargouri, M., ... Shachar-Hill, Y. (2015). The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 167(2), 558-573.

K

Kalisch, B., Dörmann, P. et Hölzl, G. (2016). DGDG and glycolipids in plants and algae. *Sub-Cellular Biochemistry*, 86, 51-83.

Kamalanathan, M., Gleadow, R. et Beardall, J. (2015). Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 12, 191-196.

Karl, D. M. (2014). Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: New views of an old cycle. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 279-337.

Karl, D. M. et Church, M. J. (2017). Ecosystem structure and dynamics in the North Pacific Subtropical Gyre: New views of an old ocean. *Ecosystems*, 20(3), 433-457.

Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. et Stresa Workshop Participants. (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 965-978.

Kato, M., Sakai, M., Adachi, K., Ikemoto, H. et Sano, H. (1996). Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry*, 42(5), 1341-1345.

Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 583-607.

Keeling, P. J. et Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 9(8), 605-618.

Kennedy, E. P. (1956). The biological synthesis of phospholipids. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 34(2), 334-348.

Khozin-Goldberg, I. et Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701.

Khozin-Goldberg, I. et Cohen, Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. *Biochimie*, 93(1), 91-100.

- Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Shayakhmetova, I. et Cohen, Z. (2002). Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater Eustigmatophyte *Monodus Subterraneus* (eustigmatophyceae). *Journal of Phycology*, 38(4), 745-756.
- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U. et Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 905-915.
- Khozin-Goldberg, I., Leu, S. et Boussiba, S. (2016). Microalgae as a source for VLC-PUFA production. Dans *Lipids in Plant and Algae Development* (p. 471-510). Springer, Cham.
- Khozin-Goldberg, I., Shrestha, P. et Cohen, Z. (2005). Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1738(1-3), 63-71.
- Kim, I.-N., Lee, K., Gruber, N., Karl, D. M., Bullister, J. L., Yang, S. et Kim, T.-W. (2014). Increasing anthropogenic nitrogen in the North Pacific Ocean. *Science*, 346(6213), 1102-1106.
- Klok, A. J., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. et Wijffels, R. H. (2014). Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. *Trends in Biotechnology*, 32(10), 521-528.
- Klok, A. J., Martens, D. E., Wijffels, R. H. et Lamers, P. P. (2013). Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresource Technology*, 134, 233-243.
- Klug, R. M. et Benning, C. (2001). Two enzymes of diacylglycerol-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine biosynthesis are encoded by btaA and btaB in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5910-5915.
- Knothe, G. (2009). Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy & Environmental Science*, 2(7), 759-766.
- Kobayashi, K., Endo, K. et Wada, H. (2016). Roles of Lipids in Photosynthesis. Dans *Lipids in Plant and Algae Development* (p. 21-49). Springer, Cham.
- Koller, M., Muhr, A. et Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52-63.
- Koltermann, M., Moroni, A., Gazzarini, S., Nowara, D. et Tischner, R. (2003). Cloning, functional expression and expression studies of the nitrate transporter gene from *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k). *Plant Molecular Biology*, 52(4), 855-864.
- Kornberg, A., Rao, N. N. et Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 89-125.
- Kramer, D. M. et Evans, J. R. (2011). The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiology*, 155(1), 70-78.
- Krishnan, A., Kumaraswamy, G. K., Vinyard, D. J., Gu, H., Ananyev, G., Posewitz, M. C. et Dismukes, G. C. (2015). Metabolic and photosynthetic consequences of blocking starch biosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* *sta6* mutant. *The Plant Journal*, 81(6), 947-960.
- Kroth, P. G. (2002). Protein transport into secondary plastids and the evolution of primary and secondary plastids. Dans *International Review of Cytology*, 221 (p. 191-255). Academic Press. 221 vol.
- Kroth, P. G. (2015). The biodiversity of carbon assimilation. *Journal of Plant Physiology*, 172, 76-81.

Kroth, P. G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M. S., ... Bowler, C. (2008). A Model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS One*, 3(1), e1426.

Kshirsagar, A. (2013). Bioremediation of wastewater by using microalgae: an experimental study. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res*, 02, 339-346.

Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C. R. K. et Jha, B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. Dans H. Domínguez (dir.) *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (p. 87-134). Woodhead Publishing.

Kumari, Puja, Kumar, M., Reddy, C. R. K. et Jha, B. (2014). Nitrate and phosphate regimes induced lipidomic and biochemical changes in the intertidal macroalga *Ulva lactuca* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Plant & Cell Physiology*, 55(1), 52-63.

Künzler, K. et Eichenberger, W. (1997). Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry*, 46(5), 883-892.

Künzler, K., Eichenberger, W. et Radunz, A. (1997). Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 52(7-8), 487-495.

L

Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P. et Bernard, O. (2012). Neutral lipid and carbohydrate productivities as a response to nitrogen status in *Isochrysis* Sp. (t-Iso; Haptophyceae): starvation versus limitation. *Journal of Phycology*, 48(3), 647-656.

Lai, J., Yu, Z., Song, X., Cao, X. et Han, X. (2011). Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 405(1), 6-17.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23, 2947-2948.

Laurent, A., Fennel, K., Hu, J. et Hetland, R. (2012). Simulating the effects of phosphorus limitation in the Mississippi and Atchafalaya River plumes. *Biogeosciences Discussions*, 9, 5625-5657.

Lavaud, J. et Lepetit, B. (2013). An explanation for the inter-species variability of the photoprotective non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(3), 294-302.

Lê, S., Josse, J. et Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18.

Lei, Q.-Y. et Lu, S.-H. (2011). Molecular ecological responses of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* to phosphate stress. *Harmful Algae*, 12, 39-45.

Leblond, J. D., Dahmen, A. S., Dodson, V. J. et Dahmen, J. L. (2013). Characterization of the betaine lipids, diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine (DGTS) and diacylglycerylhydroxymethyl-N,N,N-trimethyl-β-alanine (DGTA), in brown- and green-pigmented raphidophytes. *Algological Studies*, 17-27.

- Leonardos, N. et Geider, R. J. (2004). Effects of nitrate : phosphate supply ratio and irradiance on the C : N : P stoichiometry of *Chaetoceros muelleri*. *European Journal of Phycology*, 39(2), 173-180.
- Lepetit, B., Goss, R., Jakob, T. et Wilhelm, C. (2012). Molecular dynamics of the diatom thylakoid membrane under different light conditions. *Photosynthesis Research*, 111(1-2), 245-257.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D. S., Guerra, L. T., Kim, M. K., ... Falkowski, P. G. (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), 412-417.
- Lewin, J. C., Lewin, R. A. et Philpott, D. E. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricorutum*. *Microbiology*, 18(2), 418-426.
- Li, M., Li, L., Shi, X., Lin, L. et Lin, S. (2015). Effects of phosphorus deficiency and adenosine 5'-triphosphate (ATP) on growth and cell cycle of the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*. *Harmful Algae*, 47, 35-41.
- Li, M., Shi, X., Guo, C. et Lin, S. (2016). Phosphorus deficiency inhibits cell division but not growth in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 826.
- Li, S., Xu, J., Chen, J., Chen, J., Zhou, C. et Yan, X. (2014). The major lipid changes of some important diet microalgae during the entire growth phase. *Aquaculture*, 428-429, 104-110.
- Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., ... Benning, C. (2012). A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(11), 4670-4686.
- Li-Beisson, Y., Beisson, F. et Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82(3), 504-522.
- Li-Beisson, Y., Nakamura, Y. et Harwood, J. (2016). Lipids: From chemical structures, biosynthesis, and analyses to industrial applications. *Sub-Cellular Biochemistry*, 86, 1-18.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., ... Ohlrogge, J. (2010). Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, e0133.
- Lin, H.-Y., Shih, C.-Y., Liu, H.-C., Chang, J., Chen, Y.-L., Chen, Y.-R., ... Lin, H.-J. (2013). Identification and characterization of an extracellular alkaline phosphatase in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Biotechnology*, 15(4), 425-436.
- Lin, Q., Liang, J.-R., Huang, Q.-Q., Luo, C.-S., Anderson, D. M., Bowler, C., ... Gao, Y.-H. (2017). Differential cellular responses associated with oxidative stress and cell fate decision under nitrate and phosphate limitations in *Thalassiosira pseudonana*: Comparative proteomics. *PLoS One*, 12(9), e0184849.
- Lin, S., Litaker, R. W. et Sunda, W. G. (2016). Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 52(1), 10-36.
- Litchman, E. et Klausmeier, C. A. (2008). Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 615-639.
- Litchman, E. et Nguyen, B. L. V. (2008). Alkaline phosphatase activity as a function of internal phosphorus concentration in freshwater phytoplankton. *Journal of Phycology*, 44(6), 1379-1383.
- Liu, B. et Benning, C. (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 300-309.

- Liu, C.-P. et Lin, L.-P. (2001). Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 207-214.
- Liu, S., Guo, Z., Li, T., Huang, H. et Lin, S. (2011). Photosynthetic efficiency, cell volume, and elemental stoichiometric ratios in *Thalassiosira weissflogii* under phosphorus limitation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(5), 1048.
- Liu, Y., Song, X., Cao, X. et Yu, Z. (2013). Responses of photosynthetic characters of *Skeletonema costatum* to different nutrient conditions. *Journal of Plankton Research*, 35(1), 165-176.
- Livak, K. J. et Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lomas, M. W., Burke, A. L., Lomas, D. A., Bell, D. W., Shen, C., Dyhrman, S. T. et Ammerman, J. W. (2010). Sargasso Sea phosphorus biogeochemistry: an important role for dissolved organic phosphorus (DOP). *Biogeosciences*, 7(2), 695-710.
- Lomas, M. W. et Glibert, P. M. (1999). Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. *Limnology and Oceanography*, 44, 556-572.
- Lomas, M. W. et Glibert, P. M. (2000). Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Phycology*, 36(5), 903-913.
- Longworth, J., Wu, D., Huete-Ortega, M., Wright, P. C. et Vaidyanathan, S. (2016). Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. *Algal Research*, 18, 213-224.
- López-Lara, I. M., Gao, J.-L., Soto, M. J., Solares-Pérez, A., Weissenmayer, B., Sohlenkamp, C., ... Geiger, O. (2005). Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 18(9), 973-982.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K. P. et Aidar, E. (2002). Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41(2), 158-168.
- Lu, N., Wei, D., Chen, F. et Yang, S.-T. (2013). Lipidomic profiling reveals lipid regulation in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to nitrate or phosphate deprivation. *Process Biochemistry*, 48(4), 605-613.
- Lung, S.-C. et Weselake, R. J. (2006). Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids*, 41(12), 1073-1088.
- Lysenko, V., Guo, Y. et Chugueva, O. (2017). Cyclic electron transport around photosystem II: Mechanisms and methods of study. *American Journal of Plant Physiology*, 12(1), 1-9.

M

- Maat, D. S., Bale, N. J., Hopmans, E. C., Sinnighe Damsté, J. S., Schouten, S. et Brussaard, C. P. D. (2016). Increasing P limitation and viral infection impact lipid remodeling of the picophytoplankton *Micromonas pusilla*. *Biogeosciences*, 13(5), 1667-1676.

- Maeda, Y., Nojima, D., Yoshino, T. et Tanaka, T. (2017). Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical transactions of the royal society B*, 372(1728), 20160408.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T. et Sciandra, A. (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, 102(1), 142-149.
- Malzahn, A. M., Hantzsche, F., Schoo, K. L., Boersma, M. et Aberle, N. (2010). Differential effects of nutrient-limited primary production on primary, secondary or tertiary consumers. *Oecologia*, 162(1), 35-48.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., ... Cadoret, J. P. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, 326-329, 106-115.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., ... Cadoret, J. P. (2013). Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 109-119.
- Marchetti, J., Costa, F. da, Bougaran, G., Quéré, C., Soudant, P. et Robert, R. (2018). The combined effects of blue light and dilution rate on lipid class and fatty acid composition of *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1483-1494.
- Marlowe, I. T., Green, J. C., Neal, A. C., Brassell, S. C., Eglinton, G. et Course, P. A. (1984). Long chain (n-C37–C39) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. *British Phycological Journal*, 19(3), 203-216.
- Marsh, J. B. et Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7(4), 574-576.
- Martin, G. J. O., Hill, D. R. A., Olmstead, I. L. D., Bergamin, A., Shears, M. J., Dias, D. A., ... Callahan, D. L. (2014). Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLoS One*, 9(8), e103389.
- Martin, P., Van Mooy, B. A., Heithoff, A. et Dyhrman, S. T. (2011). Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *The ISME journal*, 5(6), 1057-1060.
- Martins, D. A., Custódio, L., Barreira, L., Pereira, H., Ben-Hamadou, R., Varela, J. et Abu-Salah, K. M. (2013). Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Marine Drugs*, 11(7), 2259-2281.
- McIntosh, K., Smith, A., Young, L. K., Leitch, M. A., Tiwari, A. K., Reddy, C. M., ... Baki, G. (2018). Alkenones as a promising green alternative for waxes in cosmetics and personal care products. *Cosmetics*, 5(2), 34.
- McLaughlin, K., Sohm, J. A., Cutter, G. A., Lomas, M. W. et Paytan, A. (2013). Phosphorus cycling in the Sargasso Sea: Investigation using the oxygen isotopic composition of phosphate, enzyme-labeled fluorescence, and turnover times. *Global Biogeochemical Cycles*, 27(2), 375-387.
- Meireles, L. A., Guedes, A. C. et Malcata, F. X. (2003). Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2237-2241.

- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., ... Schoefs, B. (2012). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(15), 2733-2750.
- Minnikin, D. E., Abdolrahimzadeh, H. et Baddiley, J. (1974). Replacement of acidic phospholipids by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature*, 249(5454), 268-269.
- Minoda, A., Sonoike, K., Okada, K., Sato, N. et Tsuzuki, M. (2003). Decrease in the efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *FEBS letters*, 553(1-2), 109-112.
- Mizusawa, N. et Wada, H. (2012). The role of lipids in photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1817(1), 194-208.
- Mobin, S. et Alam, F. (2017). Some promising microalgal species for commercial applications: A review. *Energy Procedia*, 110, 510-517.
- Mock, T., Samanta, M. P., Iverson, V., Berthiaume, C., Robison, M., Holtermann, K., ... Armbrust, E. V. (2008). Whole-genome expression profiling of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* identifies genes involved in silicon bioprocesses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1579-1584.
- Monier, A., Welsh, R. M., Gentemann, C., Weinstock, G., Sodergren, E., Armbrust, E. V., ... Worden, A. Z. (2012). Phosphate transporters in marine phytoplankton and their viruses: cross-domain commonalities in viral-host gene exchanges. *Environmental Microbiology*, 14(1), 162-176.
- Moore, C. M., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W., ... Ulloa, O. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geoscience*, 6(9), 701-710.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B. et Worm, B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean? *PLOS Biology*, 9(8), e1001127.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L. et Huner, N. P. A. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 222-252.
- Morot-Gaudry, J.-F. (1997). *Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. [Assimilation de l'azote chez les plantes]. Paris : INRA.
- Morot-Gaudry, J.-F., Orsel, M., Diaz, C., Daniel-Vedele, F. et Masclaux-Daubresse, C. (2006). Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes : intérêt pour le colza. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(6), 393-402.
- Moseley, J. L., Chang, C.-W. et Grossman, A. R. (2006). Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 5(1), 26-44.
- Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M. F., ... Bones, A. M. (2013). Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Marine Drugs*, 11(11), 4662-4697.
- Mühlroth, A., Winge, P., Assimi, A. E., Jouhet, J., Marechal, E., Hohmann-Marriott, M. F., ... Bones, A. M. (2017). Mechanisms of phosphorus acquisition and lipid class remodelling under P limitation in a marine microalga. *Plant Physiology*, 175(4), 1543-1559.

Müller, F. et Frentzen, M. (2001). Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 509(2), 298-302.

Murakami, H., Nobusawa, T., Hori, K., Shimojima, M. et Ohta, H. (2018). Betaine lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiology*, 177(1), 181-193.

Murphy, J. et Riley, J. P. (1958). A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37(1), 9-14.

Mus, F., Toussaint, J.-P., Cooksey, K. E., Fields, M. W., Gerlach, R., Peyton, B. M. et Carlson, R. P. (2013). Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3625-3642.

N

Nakamura, Y. (2013). Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 43-50.

Nalder, T. D., Miller, M. R. et Packer, M. A. (2015). Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis* sp. (T-Iso) grown in batch culture. *Aquaculture International*, 23(5), 1293-1312.

Nguyen-Deroche, T. L. N., Caruso, A., Le, T. T., Bui, T. V., Schoefs, B., Tremblin, G. et Morant-Manceau, A. (2012). Zinc affects differently growth, photosynthesis, antioxidant enzyme activities and phytochelatin synthase expression of four marine diatoms. *The Scientific World Journal*, 2012, 982957.

O

Obata, T., Fernie, A. R. et Nunes-Nesi, A. (2013). The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. *Metabolites*, 3(2), 325-346.

Ohlrogge, J. et Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 957-970.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., ... Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package* (Version 2.4-6).

Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., ... Niemkiewicz, E. (2006). Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *HELCOM Baltic Sea Environment Proceedings*, 106, 144pp.

Ott, null, Clarke, null, Birks, null et Johnson, null. (1999). Regulation of the photosynthetic electron transport chain. *Planta*, 209(2), 250-258.

P

Palmucci, M., Ratti, S. et Giordano, M. (2011). Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: a Fourier transform infrared spectroscopy approach. *Journal of Phycology*, 47(2), 313-323.

- Parkhill, J.-P., Maillet, G. et Cullen, J. J. (2001). Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology*, 37(4), 517-529.
- Parpais, J., Marie, D., Partensky, F., Morin, P. et Vaultot, D. (1996). Effect of phosphorus starvation on the cell cycle of the photosynthetic prokaryote *Prochlorococcus* spp. *Marine Ecology Progress Series*, 132, 265-274.
- Pelley, J. W. (2012). Metabolism of Steroids and Other Lipids. Dans *Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition)* (p. 89-98). Philadelphia : W.B. Saunders.
- Peñuelas, J., Poulter, B., Sardans, J., Ciais, P., Velde, M. van der, Bopp, L., ... Janssens, I. A. (2013). Human-induced nitrogen–phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature Communications*, 4, 2934.
- Peñuelas, J., Sardans, J., Rivas-ubach, A. et Janssens, I. A. (2011). The human-induced imbalance between C, N and P in Earth's life system. *Global Change Biology*, 18(1), 3-6.
- Perry, M. J. (1976). Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific. *Limnology and Oceanography*, 21(1), 88-107.
- Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L.-J., Bastien, O., Rébeillé, F., ... Maréchal, E. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways--from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research*, 54, 68-85.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. et Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509-515.
- Piepho, M., Martin-Creuzburg, D. et Wacker, A. (2010). Simultaneous effects of light intensity and phosphorus supply on the sterol content of phytoplankton. *PLoS One*, 5(12), e15828.
- Ponis, E., Parisi, G., Chini Zittelli, G., Lavista, F., Robert, R. et Tredici, M. R. (2008). *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282(1–4), 97-103.
- Popko, J., Herrfurth, C., Feussner, K., Ischebeck, T., Iven, T., Haslam, R., ... Feussner, I. (2016). Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One*, 11(10), e0164673.
- Pulz, O. et Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Pujo-Pay, M. et Raimbault, P. (1994). Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology Progress Series*, 105(1/2), 203-207.

R

- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A. et Posewitz, M. C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, 9(4), 486-501.
- Rasdi, N. W. et Qin, J. G. (2015). Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2221-2230.

- Raven, J. A. (2013). The evolution of autotrophy in relation to phosphorus requirement. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 4023-4046.
- Raven, J. A. (2015). Interactions between Nitrogen and Phosphorus metabolism. Dans W. C. Plaxton et H. Lambers (dir.) *Annual Plant Reviews Volume 48* (p. 187-214). John Wiley & Sons, Inc.
- Raynal-Ljutovac, K., Bouvier, J., Gayet, C., Simon, N., Joffre, F., Fine, F., ... Genot, C. (2011). Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(6), 324-351.
- Read, B. A., Kegel, J., Klute, M. J., Kuo, A., Lefebvre, S. C., Maumus, F., ... Grigoriev, I. V. (2013). Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution. *Nature*, 499(7457), 209-213.
- Rech, M., Mouget, J-L., Tremblin G. (2003). Modification of the Hansatech FMS fluorometer to facilitate measurements with microalgal cultures. *Aquatic Botany*, 77: 71-80.
- Reddy, V. S., Rao, D. K. V. et Rajasekharan, R. (2010). Functional characterization of lysophosphatidic acid phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1801(4), 455-461.
- Redfield, A. C. (1934). *On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton*. (s. l.) : University Press of Liverpool.
- Redfield, A. C., Ketchum, B. H. et Richards, F. A. (1963). The influence of organisms on the composition of sea-water. *The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas*.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. et Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology*, 30(6), 972-979.
- Remmers, I. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H. et Lamers, P. P. (2017). Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PLoS One*, 12(4), e0175630.
- Rhee, G.-Y. (1974). Phosphate uptake under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. and its ecological implications. *Journal of Phycology*, 10(4), 470-475.
- Riegman, R., Stolte, W., Noordeloos, A. A. M. et Slezak, D. (2000). Nutrient uptake and alkaline phosphatase (ec 3:1:3:1) activity of *emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures. *Journal of Phycology*, 36(1), 87-96.
- Riekhof, W. R., Andre, C. et Benning, C. (2005). Two enzymes, BtaA and BtaB, are sufficient for betaine lipid biosynthesis in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441(1), 96-105.
- Riekhof, W. R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C. et Voelker, D. R. (2014). Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine. *Eukaryotic Cell*, 13(6), 749-757.
- Riekhof, W. R., Sears, B. B. et Benning, C. (2005). Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 242-252.
- Roberty, S., Bailleul, B., Berne, N., Franck, F. et Cardol, P. (2014). PSI Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians. *The New Phytologist*, 204(1), 81-91.

- Roche, S. A. et Leblond, J. D. (2010). Betaine lipids in chlorarachniophytes. *Phycological Research*, 58(4), 298-305.
- Roháček, K. (2010). Method for resolution and quantification of components of the non-photochemical quenching (qN). *Photosynthesis Research*, 105(2), 101-113.
- Roháček, K., Bertrand, M., Moreau, B., Jacquette, B., Caplat, C., Morant-Manceau, A. et Schoefs, B. (2014). Relaxation of the non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms: kinetics, components and mechanisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 369(1640), 20130241.
- Roháček, K., Soukupová, J. et Barták, M. (2008). Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. Dans *Plant Cell Compartments-Selected Topics. Research Signpost, Kerala, India*, (p. 41–104). Research Signpost.
- Rontani, J.-F., Beker, B. et Volkman, J. K. (2004). Long-chain alkenones and related compounds in the benthic haptophyte *Chrysotila lamellosa* Anand HAP 17. *Phytochemistry*, 65(1), 117-126.
- Rontani, J.-F., Prahl, F. G. et Volkman, J. K. (2006). Characterization of unusual alkenones and alkyl alkenoates by electron ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(4), 583-588.
- Roopnarain, A., Gray, V. M. et Sym, S. D. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 156, 408-411.
- Rossi, F. et Philippis, R. D. (2016). Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis. [Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria]. Dans *The Physiology of Microalgae* (p. 565-590). Springer, Cham.
- Rozentsvet, O. A., Dembitsky, V. M. et Saksonov, S. V. (2000). Occurrence of diacylglyceryltrimethylhomoserines and major phospholipids in some plants. *Phytochemistry*, 54(4), 401-407.
- 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, 42.

S

- Saier, M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 64(2), 354-411.
- Sakshaug, E. et Holm-Hansen, O. (1977). Chemical composition of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve and *Pavlova (Monochrysis) lutheri* (Droop) green as a function of nitrate-, phosphate-, and iron-limited growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29(1), 1-34.
- Sato, N. (1988). Dual role of methionine in the biosynthesis of diacylglyceryltrimethylhomoserine in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 86(3), 931-934.
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H. et Tsuzuki, M. (2000). Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochemical Society Transactions*, 28(6), 912-914.

- Sato, N. et Murata, N. (1991). Transition of lipid phase in aqueous dispersions of diacylglyceryltrimethylhomoserine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1082(1), 108-111.
- Sato, N., Tsuzuki, M. et Kawaguchi, A. (2003). Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h: I. Existence of a eukaryotic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1633(1), 27-34.
- Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B. et Napier, J. A. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728), 20160407.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., ... Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20-43.
- Schlame, M. et Greenberg, M. L. (2017). Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1862(1), 3-7.
- Sebastián, M., Smith, A. F., González, J. M., Fredricks, H. F., Van Mooy, B., Koblížek, M., ... Chen, Y. (2016). Lipid remodelling is a widespread strategy in marine heterotrophic bacteria upon phosphorus deficiency. *The ISME journal*, 10(4), 968-978.
- Senik, S. V., Maloshenok, L. G., Kotlova, E. R., Shavarda, A. L., Moiseenko, K. V., Bruskin, S. A., ... Psurtseva, N. V. (2015). Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, 117, 34-42.
- Shanklin, J. et Cahoon, E. B. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 611-641.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. et Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553.
- Shemi, A., Schatz, D., Fredricks, H. F., Van Mooy, B. A. S., Porat, Z. et Vardi, A. (2016). Phosphorus starvation induces membrane remodeling and recycling in *Emiliania huxleyi*. *New Phytologist*, 211(3), 886-898.
- Shi, Q., Araie, H., Bakku, R. K., Fukao, Y., Rakwal, R., Suzuki, I. et Shiraiwa, Y. (2015). Proteomic analysis of lipid body from the alkenone-producing marine haptophyte alga *Tisochrysis lutea*. *Proteomics*, 15(23-24), 4145-4158.
- Shifrin, N. S. et Chisholm, S. W. (1981). Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology*, 17(4), 374-384.
- Shih, C.-Y., Kang, L.-K. et Chang, J. (2015). Transcriptional responses to phosphorus stress in the marine diatom, *Chaetoceros affinis*, reveal characteristic genes and expression patterns in phosphorus uptake and intracellular recycling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 470, 43-54.
- Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G. et Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic Cell*, 12(5), 665-676.

- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.
- Singer, S. J. et Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720-731.
- Sivak, M. N. et Walker, D. A. (1986). Photosynthesis in vivo can be limited by phosphate supply. *The New Phytologist*, 102(4), 499-512.
- Skau, L. F., Andersen, T., Thrane, J.-E. et Hessen, D. O. (2017). Growth, stoichiometry and cell size; temperature and nutrient responses in haptophytes. *PeerJ*, 5, e3743.
- Slover, H. T. et Lanza, E. (1979). Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(12), 933.
- Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 167-176.
- Solovchenko, A., Verschoor, A. M., Jablonowski, N. D. et Nedbal, L. (2016). Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances*, 34(5), 550-564.
- Song, B. et Ward, B. B. (2007). Molecular cloning and characterization of high-affinity nitrate transporters in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 43(3), 542-552.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. et Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Steele, J. H. (1962). Environmental control of photosynthesis in the sea. *Limnology and Oceanography*, 7(2), 137-150.
- Subramanian, S., Barry, A. N., Pieris, S. et Sayre, R. T. (2013). Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 150.
- Sukenik, A. et Wahnon, R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97(1), 61-72.
- Sun, J. et Liu, D. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1331-1346.

T

- Tan, K. W. M. et Lee, Y. K. (2016). The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 255.
- Tan, K. W. M., Lin, H., Shen, H. et Lee, Y. K. (2016). Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinants of carbon allocation in *Dunaliella tertiolecta*. *Scientific Reports*, 6, 37235.
- Tatsuzawa, H. et Takizawa, E. (1995). Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry*, 40(2), 397-400.
- Taylor, S. R. (1964). Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 28(8), 1273-1285.

- Terry, K. L. (1982). Nitrate and Phosphate Uptake Interactions in a Marine Prymnesiophyte. *Journal of Phycology*, 18(1), 79-86.
- Terry, K. L., Laws, E. A. et Burns, D. J. (1985). Growth rate variation in the N:P requirement ratio of phytoplankton. *Journal of Phycology*, 21(2), 323-329.
- Tesson, B., Gaillard, C. et Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina*, 52(2), 104-116.
- Theodorou, M. E., Elrifi, I. R., Turpin, D. H. et Plaxton, W. C. (1991). Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology*, 95(4), 1089-1095.
- Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(1), 17-45.
- Thompson, P. A., Guo, M. et Harrison, P. J. (1992a). Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28(4), 481-488.
- Thompson, P. A., Guo, M., Harrison, P. J. et N. C. Whyte, J. (1992b). Effect of variation of temperature. II. On the biochemical composition of species of marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 28(4), 488-497.
- Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment*, 23(10), 1005-1024.
- Tsay, Y.-F., Chiu, C.-C., Tsai, C.-B., Ho, C.-H. et Hsu, P.-K. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS letters*, 581(12), 2290-2300.
- Turner, R. et Rabalais, N. (2013). Nitrogen and phosphorus phytoplankton growth limitation in the Northern Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 68, 159-169.
- Turpin, D. H. (1991). Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*, 27(1), 14-20.
- Turpin, D. H. et Harrison, P. J. (1979). Limiting nutrient patchiness and its rôle in phytoplankton ecology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 39(2), 151-166.

U

- Umetani, I., Kunugi, M., Yokono, M., Takabayashi, A. et Tanaka, A. (2018). Evidence of the supercomplex organization of photosystem II and light-harvesting complexes in *Nannochloropsis granulata*. *Photosynthesis Research*, 136(1), 49-61.
- Underwood, G. J. C., Boulcott, M., Raines, C. A. et Waldron, K. (2004). Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: Dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology*, 40(2), 293-304.
- Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30(6), 967-977.
- Urbani, R., Magaletti, E., Sist, P. et Cicero, A. M. (2005). Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of P-depletion and growth status. *The Science of the Total Environment*, 353(1-3), 300-306.

V

Valenzuela, J., Mazurie, A., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K. E., Peyton, B. M. et Fields, M. W. (2012). Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 40.

Valledor, L., Furuhashi, T., Recuenco-Muñoz, L., Wienkoop, S. et Weckwerth, W. (2014). System-level network analysis of nitrogen starvation and recovery in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals potential new targets for increased lipid accumulation. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 171.

Vanhercke, T., El Tahchy, A., Liu, Q., Zhou, X.-R., Shrestha, P., Divi, U. K., ... Petrie, J. R. (2014). Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves. *Plant Biotechnology Journal*, 12(2), 231-239.

Van Mooy, B. A. S. et Devol, A. H. (2008). Assessing nutrient limitation of *Prochlorococcus* in the North Pacific subtropical gyre by using an RNA capture method. *Limnology and Oceanography*, 53(1), 78-88.

Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblížek, M., ... Webb, E. A. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458(7234), 69-72.

Vieler, A., Wilhelm, C., Goss, R., Süß, R. et Schiller, J. (2007). The lipid composition of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the diatom *Cyclotella meneghiniana* investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chemistry and Physics of Lipids*, 150(2), 143-155.

Vieler, A., Wu, G., Tsai, C.-H., Bullard, B., Cornish, A. J., Harvey, C., ... Benning, C. (2012). Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genetics*, 8(11), e1003064.

Villanova, V., Fortunato, A. E., Singh, D., Bo, D. D., Conte, M., Obata, T., ... Finazzi, G. (2017). Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1728), 20160404.

Vitousek, P. M. et Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, 13(2), 87-115.

Vogel, G. et Eichenberger, W. (1992). Betaine lipids in lower plants. Biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the possible role of DGTS in lipid metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 33(4), 427-436.

Volkman, J. K. (2016). Sterols in Microalgae. Dans *The Physiology of Microalgae* (p. 485-505). Springer, Cham.

Volkman, J. K., Barrerr, S. M., Blackburn, S. I. et Sikes, E. L. (1995). Alkenones in *Gephyrocapsa oceanica*: Implications for studies of paleoclimate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(3), 513-520.

W

Wada, H., Shintani, D. et Ohlrogge, J. (1997). Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1591-1596.

- Wagner, H., Jakob, T., Fanesi, A. et Wilhelm, C. (2017). Towards an understanding of the molecular regulation of carbon allocation in diatoms: the interaction of energy and carbon allocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1728), 20160410.
- Walker, D. A. et Robinson, S. P. (1978). Chloroplast and cell : A contemporary view of photosynthetic carbon assimilation. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 91(1), 513-526.
- Walker, D. A. et Sivak, M. N. (1986). Photosynthesis and phosphate: a cellular affair? *Trends in Biochemical Sciences*, 11(4), 176-179.
- Walne, P. R. (1966). Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery investigations*, 25, 1-55.
- Wang, X., Huang, B. et Zhang, H. (2014). Phosphorus deficiency affects multiple macromolecular biosynthesis pathways of *Thalassiosira weissflogii*. *Acta Oceanologica Sinica*, 33(4), 85-91.
- Watanabe, M., Kohata, K. et Kunugi, M. (1988). Phosphate accumulation and metabolism by *Heterosigma akashiwo* (raphidophyceae) during diel vertical migration in a stratified microcosm. *Journal of Phycology*, 24(1), 22-28.
- White, T., Bursten, S., Federighi, D., Lewis, R. A. et Nudelman, E. (1998). High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipid species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 258(1), 109-117.
- Wijffels, R. H. et Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5993), 796-799.
- Wilhelm, C., Büchel, C., Fisahn, J., Goss, R., Jakob, T., LaRoche, J., ... Kroth, P. G. (2006). The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist*, 157(2), 91-124.
- Wilhelm, C., Jungandreas, A., Jakob, T. et Goss, R. (2014). Light acclimation in diatoms: From phenomenology to mechanisms. *Marine Genomics*, 16, 5-15.
- Williams, P. J. le B. et Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554-590.
- Worden, A. Z., Lee, J.-H., Mock, T., Rouzé, P., Simmons, M. P., Aerts, A. L., ... Grigoriev, I. V. (2009). Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 268-272.
- Wu, J., Sunda, W., Boyle, E. A. et Karl, D. M. (2000). Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), 759-762.
- Wurch, L. L., Bertrand, E. M., Saito, M. A., Mooy, B. A. S. V. et Dyrman, S. T. (2011). Proteome changes driven by phosphorus deficiency and recovery in the brown tide-forming alga *Aureococcus anophagefferens*. *PLoS One*, 6(12), e28949.
- Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A. et Grossman, A. R. (1998). The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 117(1), 129-139.

X

Xu, C., Andre, C., Fan, J. et Shanklin, J. (2016). Cellular organization of triacylglycerol biosynthesis in microalgae. *Sub-Cellular Biochemistry*, 86, 207-221.

Y

Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M. et Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 12040-12045.

Yang, Y.-H., Du, L., Hosokawa, M., Miyashita, K., Kokubun, Y., Arai, H. et Taroda, H. (2017). Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Oleo Science*, 66(4), 363-368.

Yang, Z.-K., Niu, Y.-F., Ma, Y.-H., Xue, J., Zhang, M.-H., Yang, W.-D., ... Li, H.-Y. (2013). Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 67.

Yang, Z.-K., Zheng, J.-W., Niu, Y.-F., Yang, W.-D., Liu, J.-S. et Li, H.-Y. (2014). Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1793-1807.

Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M. et Hu, Q. (2012). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(9), 3708-3724.

Young, A. J. et Britton, G. (1990). Carotenoids and oxidative stress. Dans *Current Research in Photosynthesis* (p. 3381-3384). Springer, Dordrecht.

Young, E. B. et Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in *dunaliella tertiolecta* (chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of Phycology*, 39(5), 897-905.

Yu, B. et Benning, C. (2003). Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 36(6), 762-770.

Z

Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.-L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T. M., ... Geiger, O. (2010). *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 302-307.

Zhang, C., Lin, S., Huang, L., Lu, W., Li, M. et Liu, S. (2014). Suppression subtraction hybridization analysis revealed regulation of some cell cycle and toxin genes in *Alexandrium catenella* by phosphate limitation. *Harmful Algae*, 39, 26-39.

Zhang, L., Li, L. et Liu, J. (2014). Comparison of the photosynthetic characteristics of two *Isochrysis galbana* strains under high light. *Botanica Marina*, 57, 477-481.

- Zhang, S.-F., Yuan, C.-J., Chen, Y., Chen, X.-H., Li, D.-X., Liu, J.-L., ... Wang, D.-Z. (2016). Comparative transcriptomic analysis reveals novel insights into the adaptive response of *Skeletonema costatum* to changing ambient phosphorus. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1476.
- Zhao, S. et Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of computational biology*, 12(8), 1047-1064.
- Zhu, L. D., Li, Z. H. et Hiltunen, E. (2016). Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Research International*, 2016, 8792548.
- Zienkiewicz, K., Du, Z.-Y., Ma, W., Vollheyde, K. et Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae - Molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9, Part B), 1269-1281.
- Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K. et Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70, 1-16.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. et Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux utilisés pour vérifier l'axénie

a) Milieu FAG

Bacto-peptone	3 g	
Extrait de levure	1 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g	
Na-glycérophosphate	25 mg	
EDTA ferrique	6 mg	
Mélange eau distillée / eau de mer naturelle (50 %)		q.s.p. 1 L

b) Milieu FG

Bacto-peptone	4 g	
Extrait de levure	0,5 g	
Na-glycérophosphate	25 mg	
EDTA ferrique	6 mg	
Mélange eau distillée / eau de mer naturelle (75 %)		q.s.p. 1 L

c) Milieu LB (lysogeny broth) pour la culture bactérienne

Tryptone	10 g	
Extrait de levure	5 g	
NaCl	10 g	
Eau distillée	q.s.p.	1 L

Préparation des milieux de vérification de l'axénie

- Ajuster le pH entre 7,4 et 7,8
- Pour les milieux solides, ajouter de l'agar-agar 1,5 %
- Stériliser à l'autoclave (20 min à 120 °C), puis couler en boîtes de Pétri

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

- a) Solution de Walne pour milieu témoin « NP » (Walne, 1966)

Solution A

FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,3 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,36 g
H ₃ BO ₃	33,6 g
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	49,8 g
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	20,0 g
NaNO ₃	100,0 g
Solution B	1 mL
Eau distillée	q.s.p. 1 L

Stériliser par filtration sur filtre de 0,20 µm et conserver à 4 °C

Solution B (solution de métaux traces)

ZnCl ₂	2,1 g
CoCl ₂ , 2H ₂ O	2,0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,9 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2,0 g
HCl (concentré)	10 mL
Eau distillée	q.s.p. 100 mL

Stériliser par filtration sur filtre de 0,20 µm et conserver à 4 °C

Solution C (solution de vitamines)

B ₁₂ (Cyanocobalamine)	10 mg
B ₁ (Thiamine)	0,2 g
Eau distillée	q.s.p. 200 mL

Stériliser par filtration sur filtre de 0,20 µm et conserver à -20 °C

- b) Solution de Walne modifiée pour le milieu « P- »

Modifications de la solution A :

NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0,624 g
NaNO ₃	42,5 g

c) Solution de Walne modifiée pour le milieu « N- »

Modifications de la solution A :

$\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	19,5 g
NaNO_3	10,62 g

d) Préparation des milieux de culture

- Autoclaver l'eau de mer naturelle (20 min à 120 °C)
- Laisser refroidir
- Ajouter stérilement la solution A modifiée ou non (1 mL par litre de milieu)
- Ajouter stérilement la solution C (0,1 mL par litre de milieu)

Annexe 3 : Cinétique de la fluorescence modulée

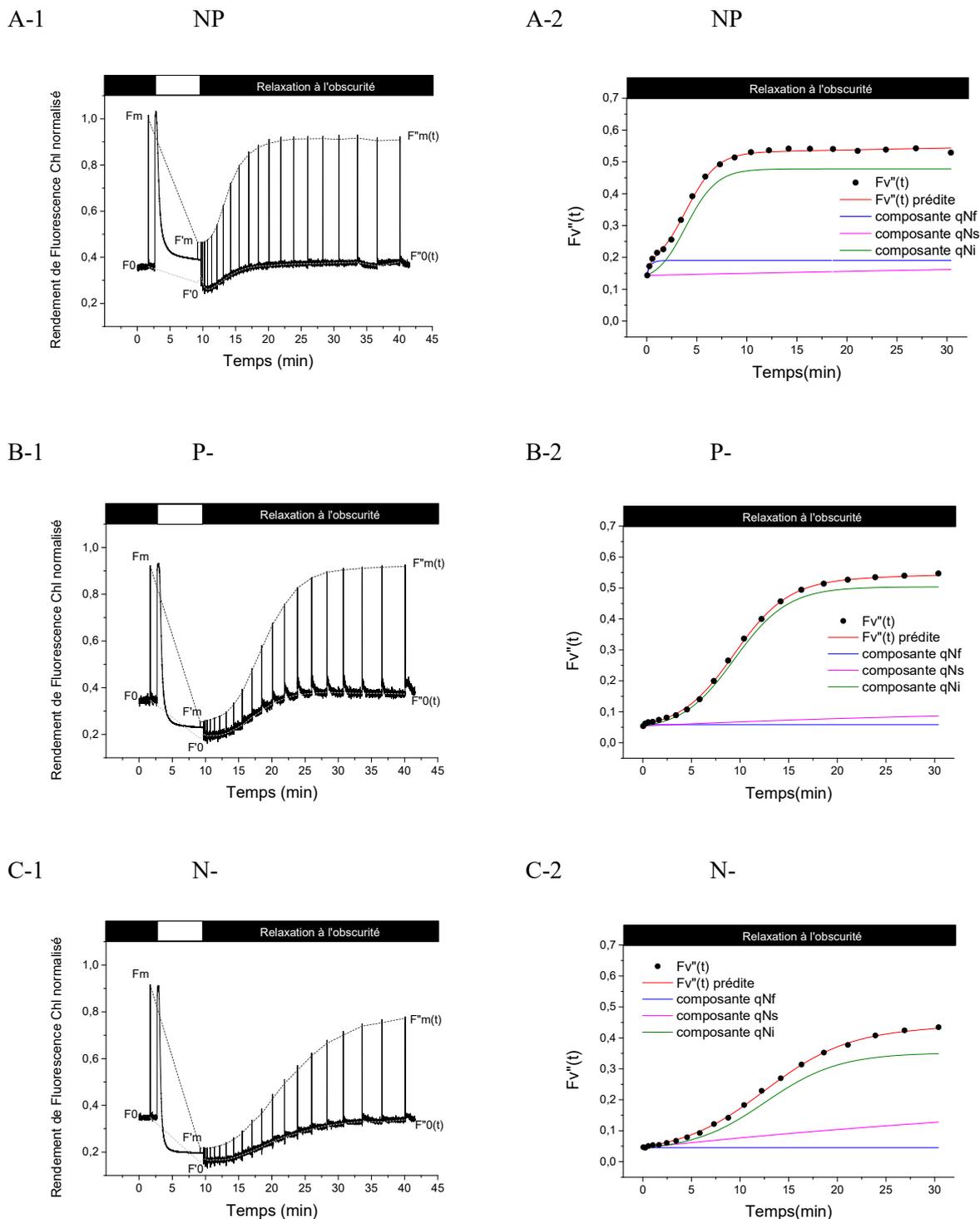


Figure A-1 : Cinétique de la fluorescence modulée de *P. tricornutum* cultivée en batch à J4 (A) en condition témoin (NP), (B) en condition limitante en P (P-), (C) en condition limitante en N (N-) sous lumière actinique ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et cinétique de relaxation $F''v$. Contributions des trois composantes de qN (qN_f , qN_s , qN_i) à l'obscurité. $F''v(t)$ prédite résulte de la somme des trois composantes qN_f , qN_s et qN_i .

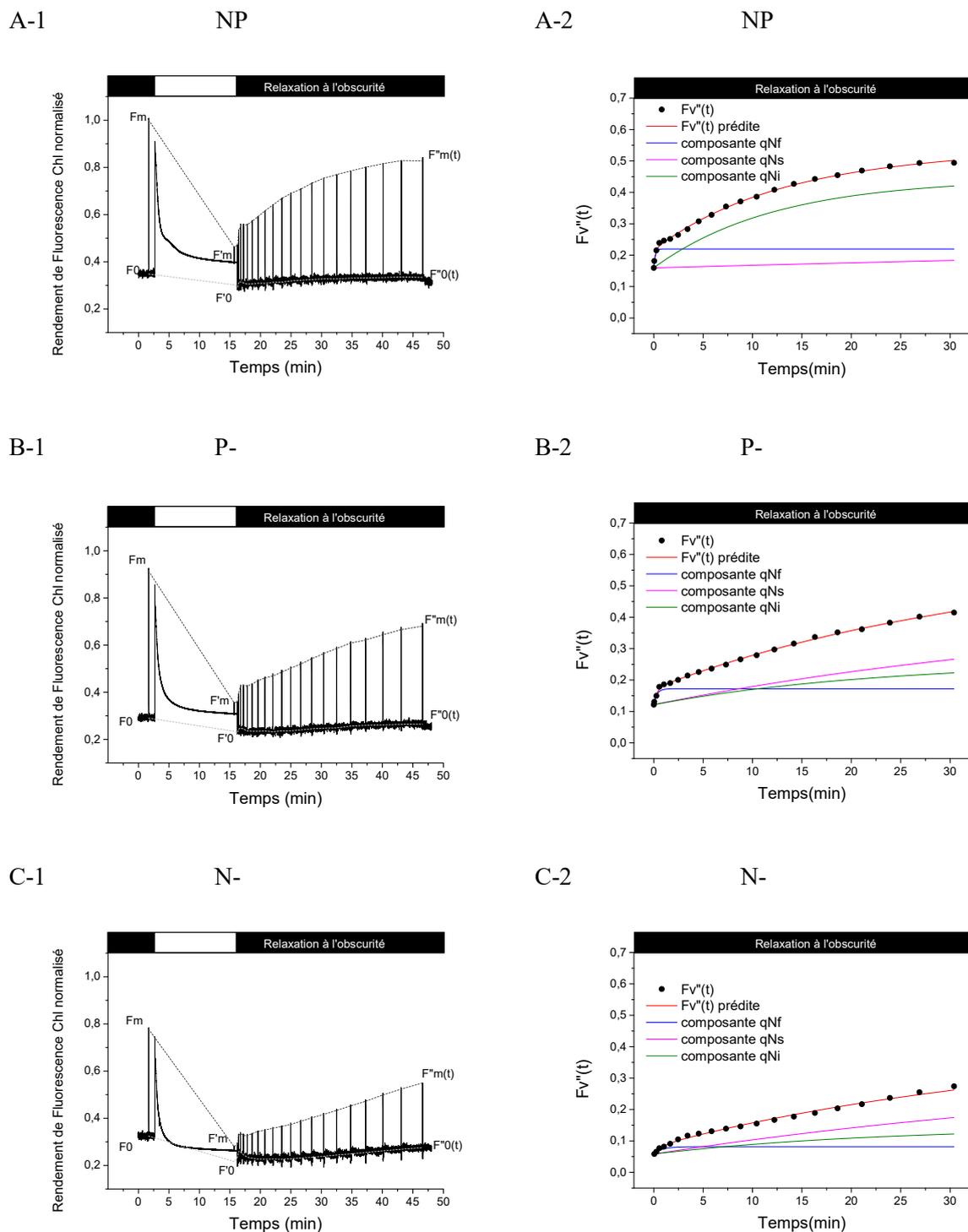
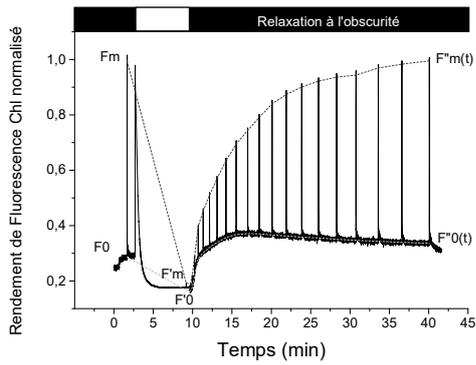


Figure A-2 : Cinétique de la fluorescence modulée de *T. lutea* cultivée en batch à J4 (A) en condition témoin (NP), (B) en condition limitante en P (P-), (C) en condition limitante en N (N-) sous lumière actinique ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et cinétique de relaxation $F''v$. Contributions des trois composantes de qN (qN_f , qN_s , qN_i) à l'obscurité. $F''v(t)$ prédite résulte de la somme des trois composantes qN_f , qN_s et qN_i .

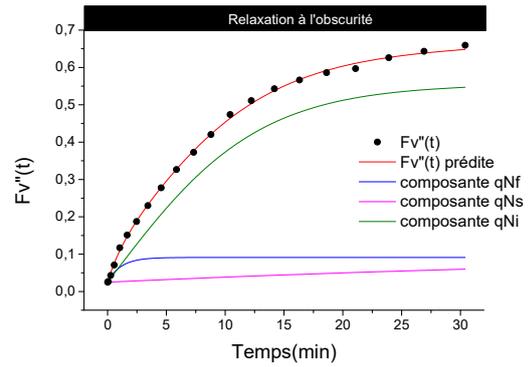
A-1

NP



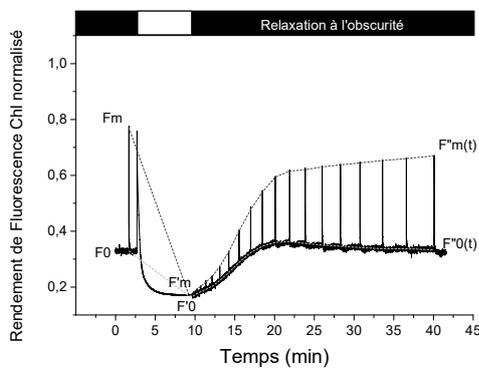
A-2

NP



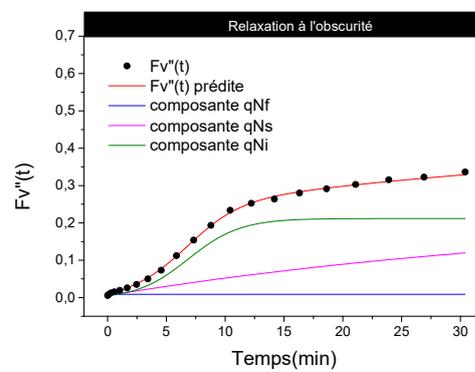
B-1

P-



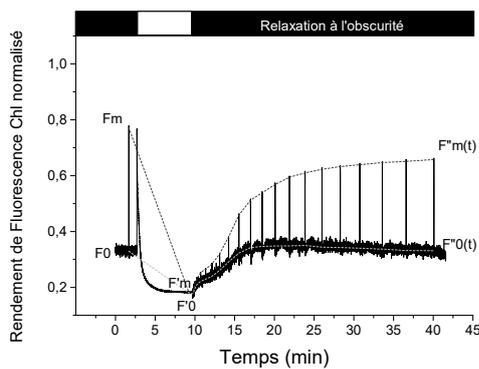
B-2

P-



C-1

N-



C-2

N-

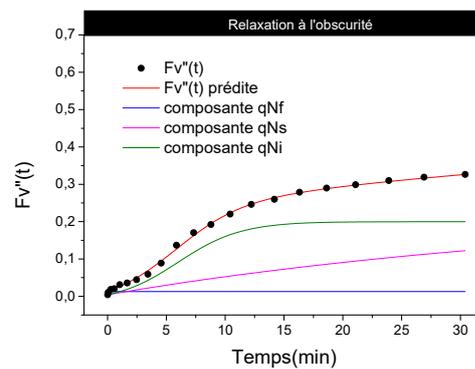


Figure A-3 : Cinétique de la fluorescence modulée de *D. lutheri* cultivée en batch à J7 (A) en condition témoin (NP), (B) en condition limitante en P (P-), (C) en condition limitante en N (N-) sous lumière actinique ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et cinétique de relaxation $Fv''(t)$. Contributions des trois composantes de qN (qN_f , qN_s , qN_i) à l'obscurité. $Fv''(t)$ prédite résulte de la somme des trois composantes qN_f , qN_s et qN_i .

Annexe 4 : Respiration

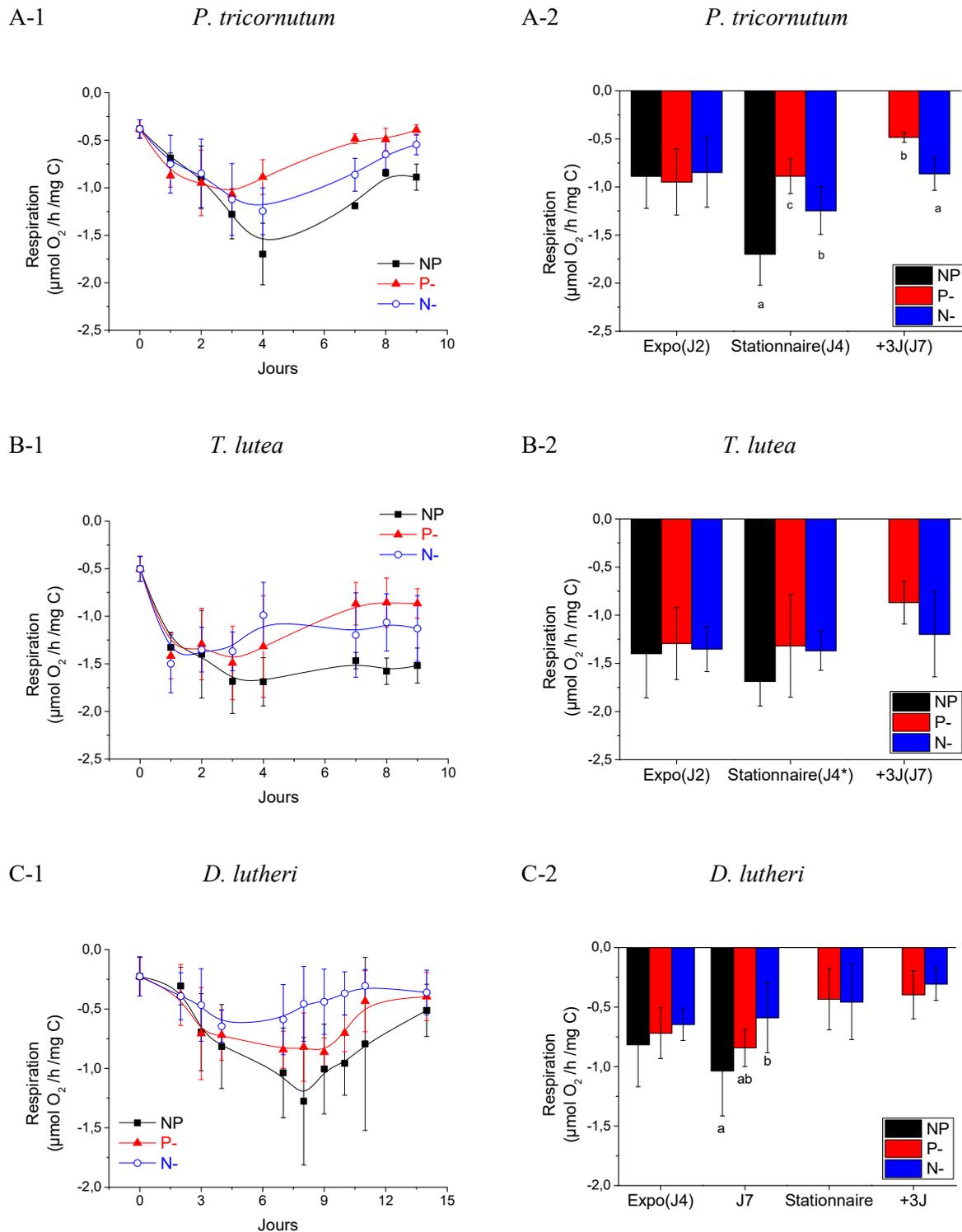


Figure A-4 : Evolution de la respiration rapportée au C ($\mu\text{mol O}_2/\text{h}/\text{mg C}$) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

Annexe 5 : Teneur cellulaire en protéines, glucides et lipides

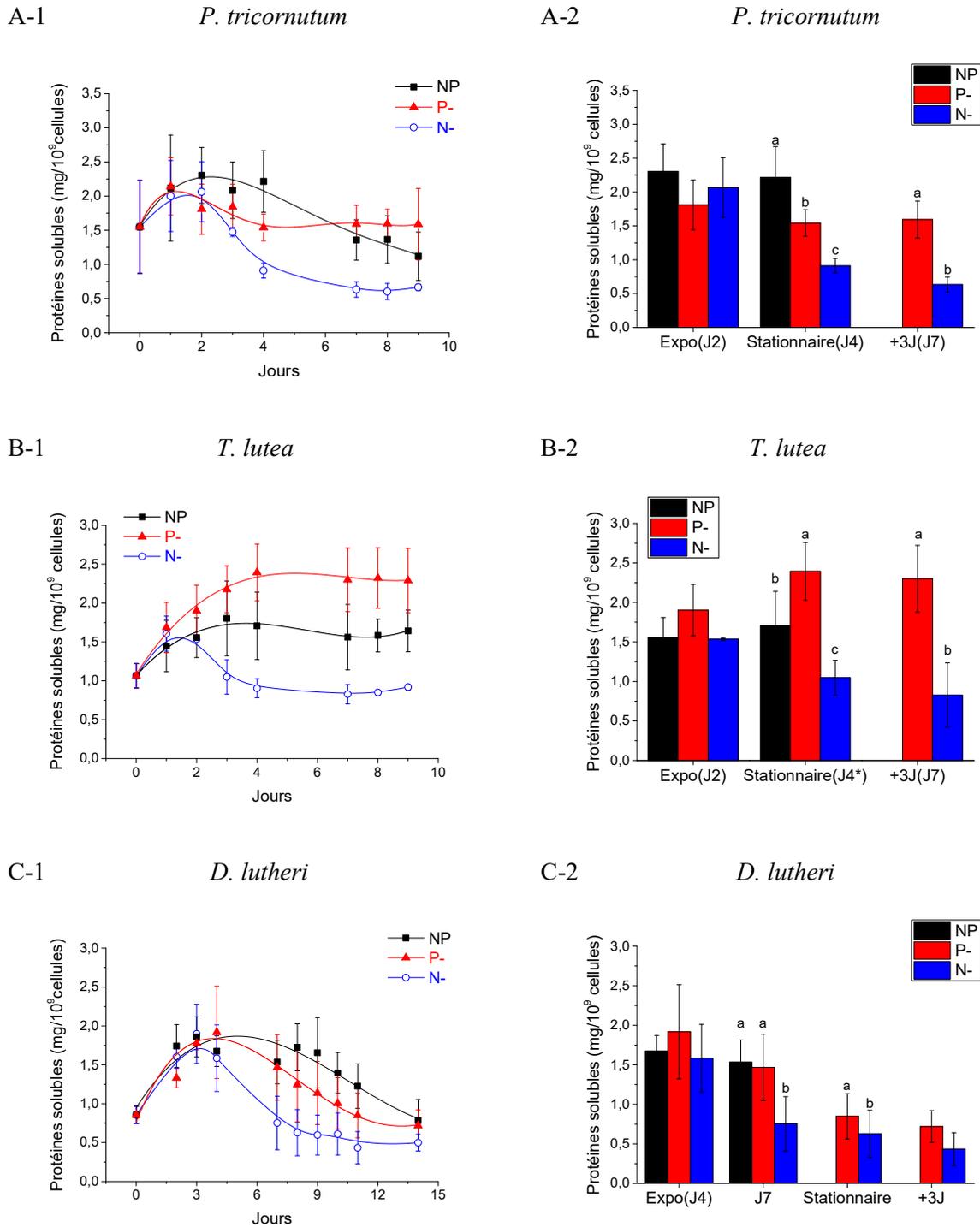


Figure A-5 : Evolution de la teneur cellulaire en protéines solubles (mg/10⁹ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

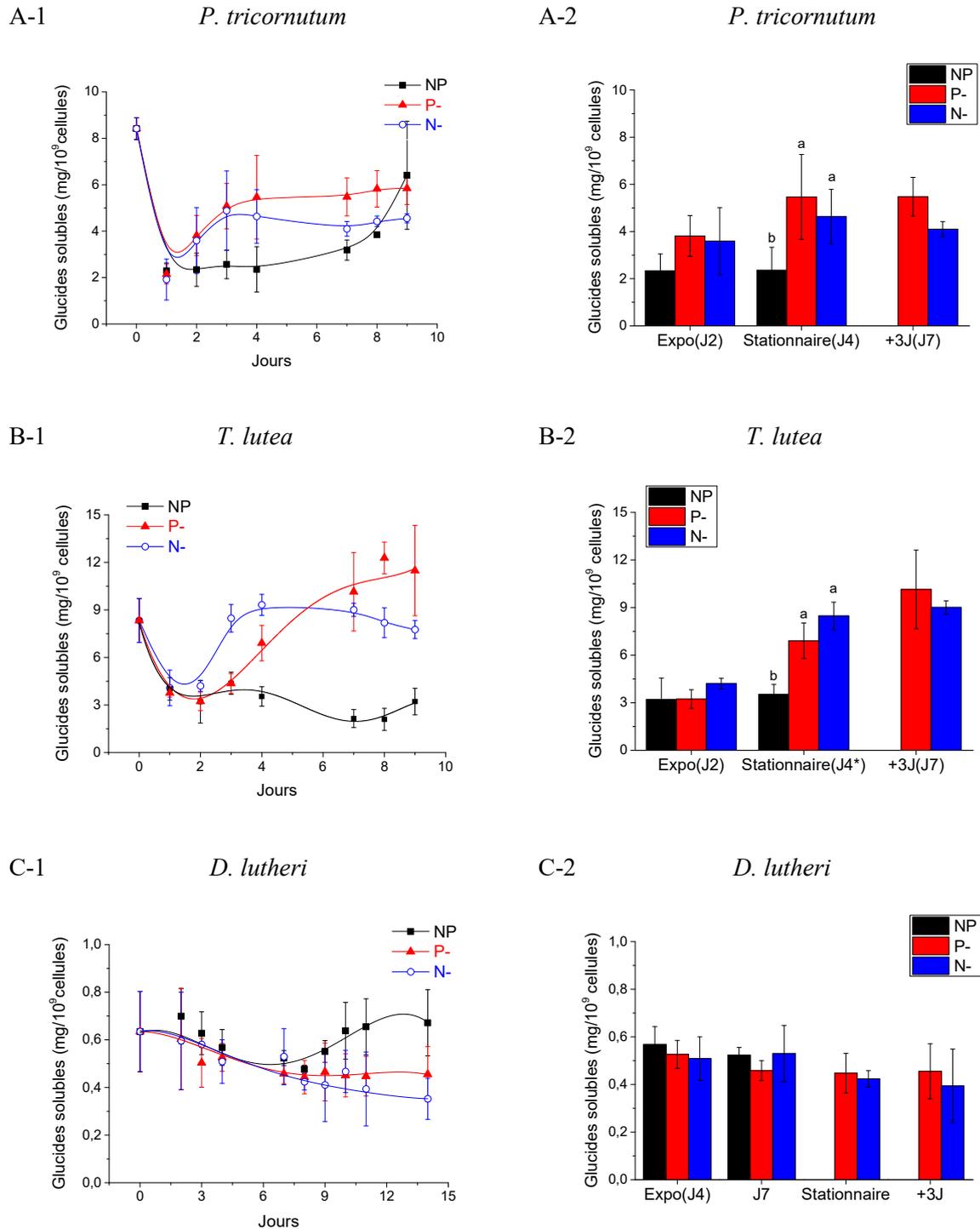


Figure A-6 : Evolution de la teneur cellulaire en glucides solubles ($\text{mg}/10^9$ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

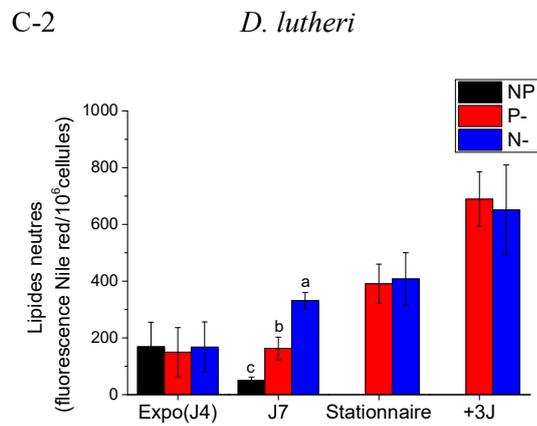
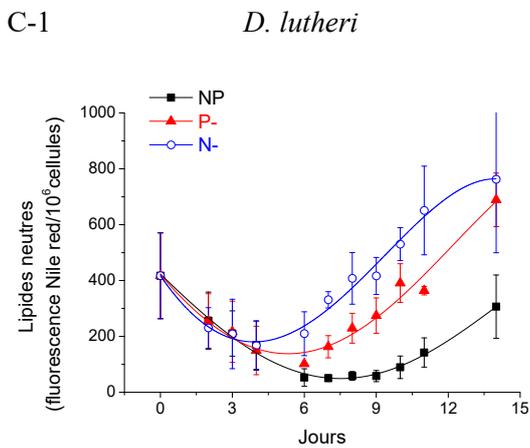
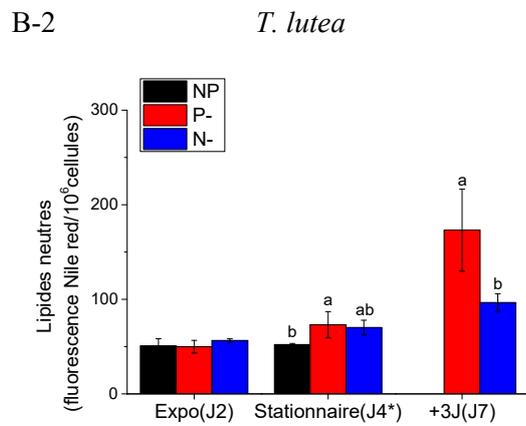
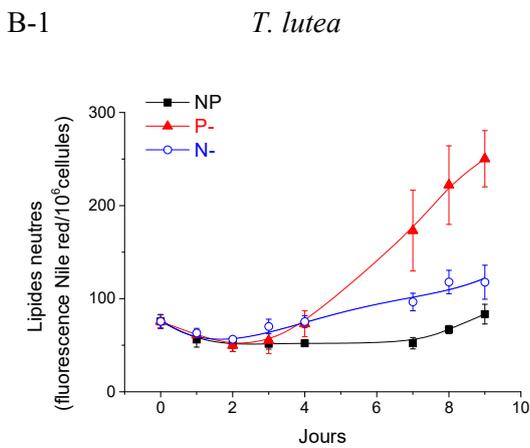
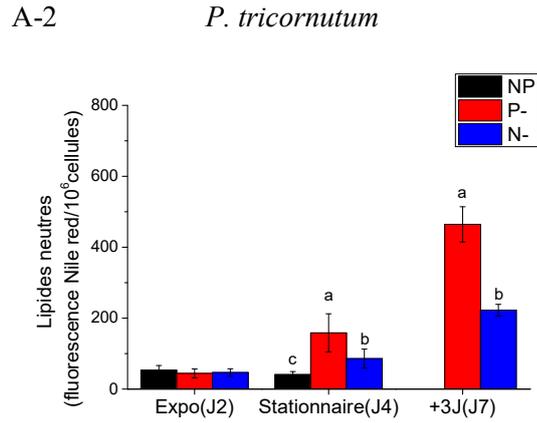
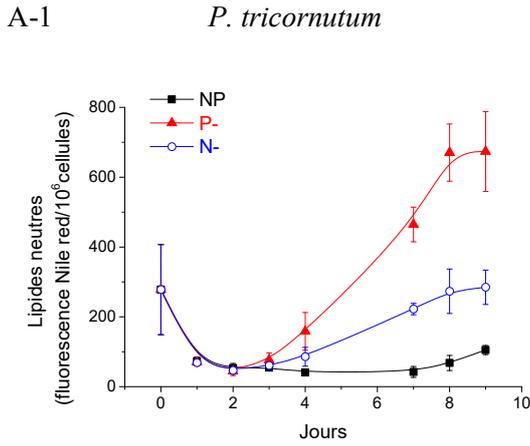


Figure A-7 : Evolution de la teneur en lipides neutres (fluorescence Nile red/10⁶ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne ± S.D. (n = 3). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

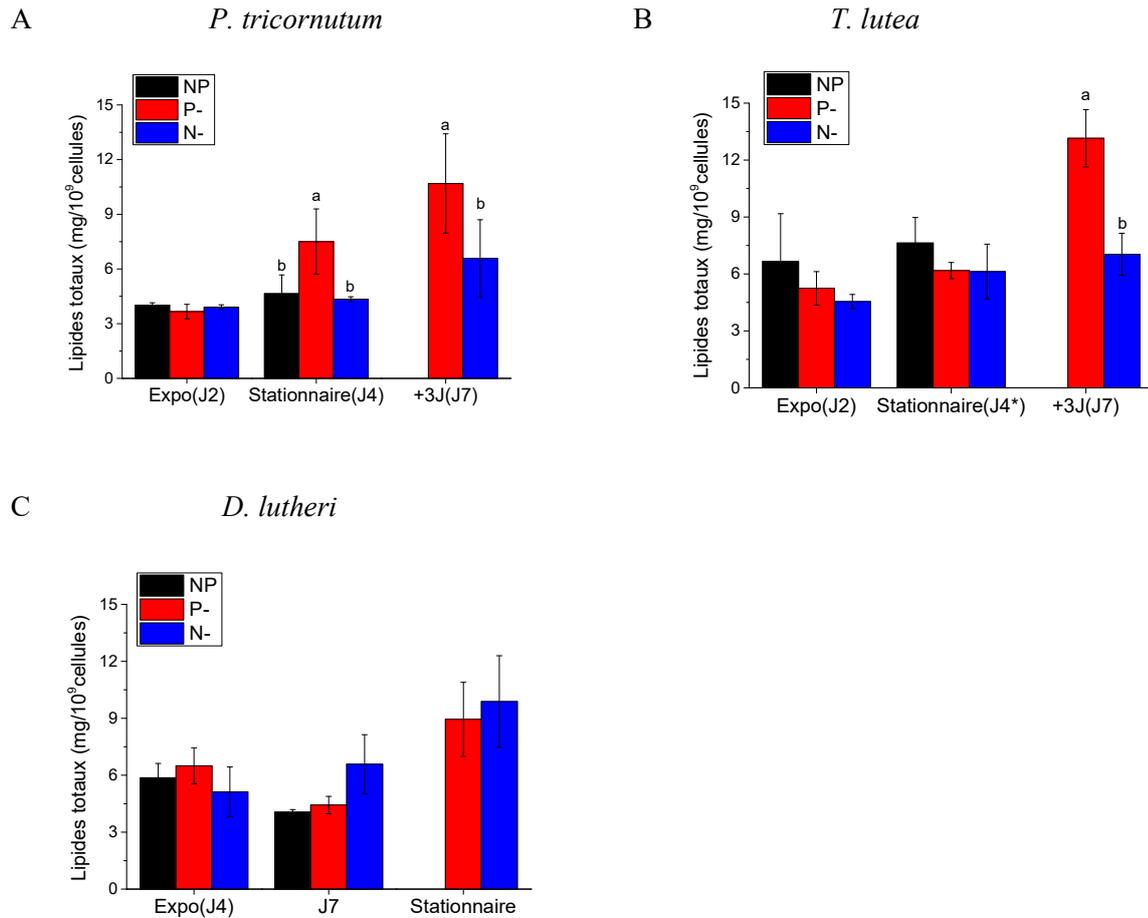
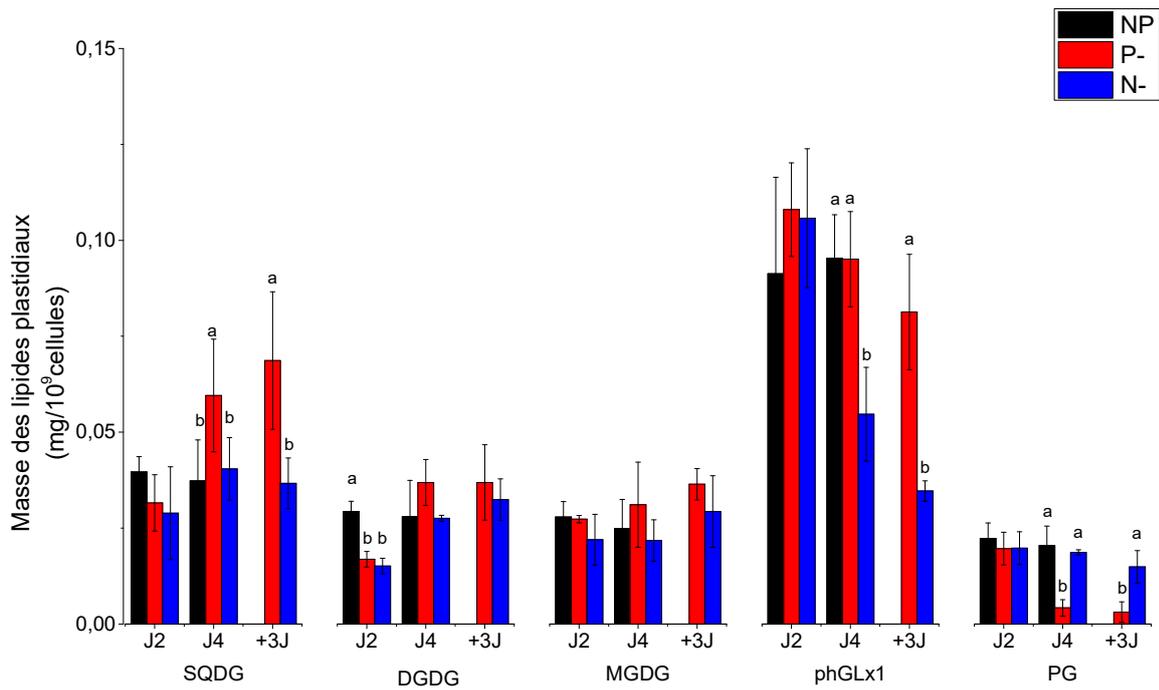


Figure A-8 : Teneur cellulaire en lipides totaux (mg/10⁹ cellules) chez les microalgues cultivées en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). (A) *P. tricornutum*, (B) *T. lutea*, (C) *D. lutheri*.

A



B

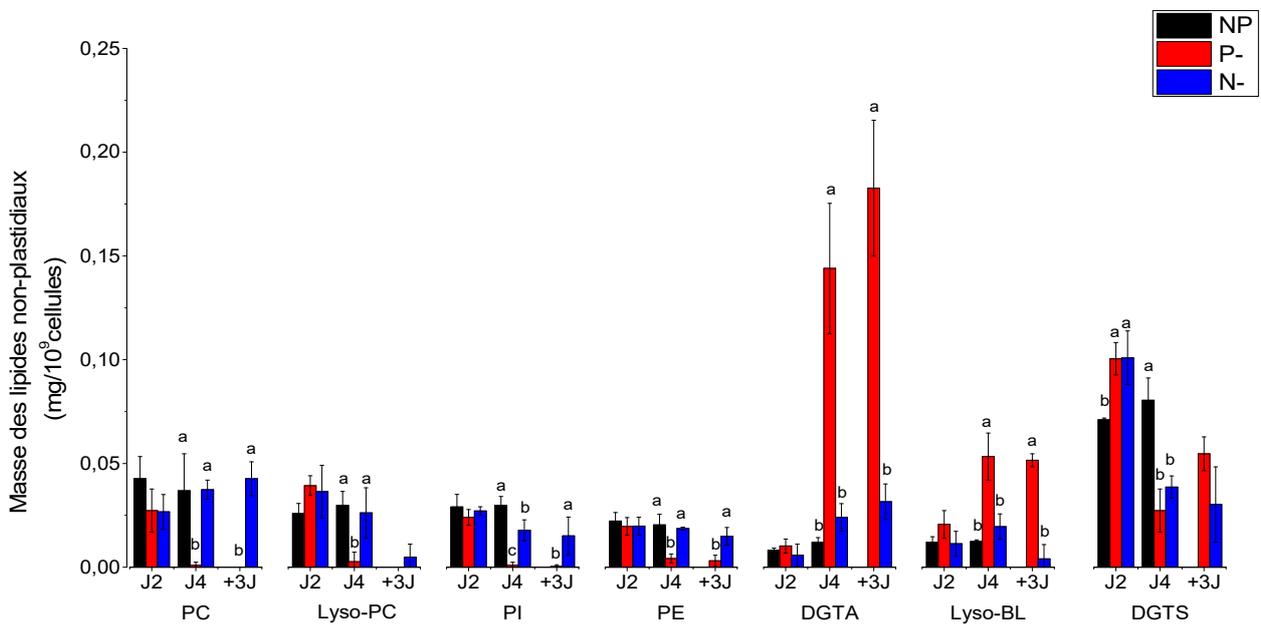
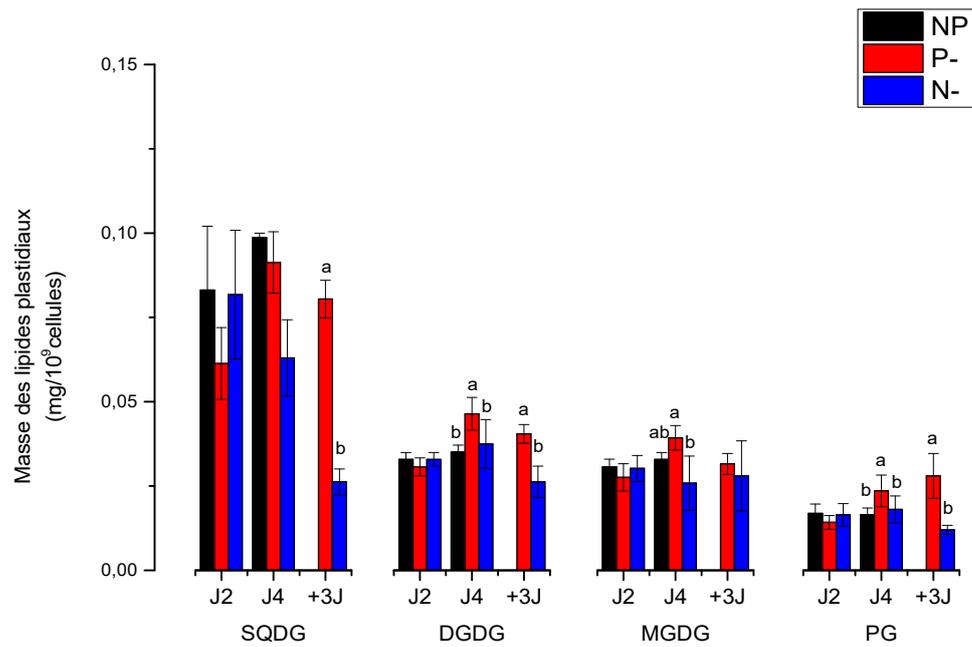


Figure A-9 : Analyse quantitative des lipides polaires (mg/10⁹ cellules) extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne ± S.D. (n = 3). J2 : phase exponentielle, J4 : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire + 3 jours. (A) Lipides plastidiaux, (B) Lipides non-plastidiaux.

A



B

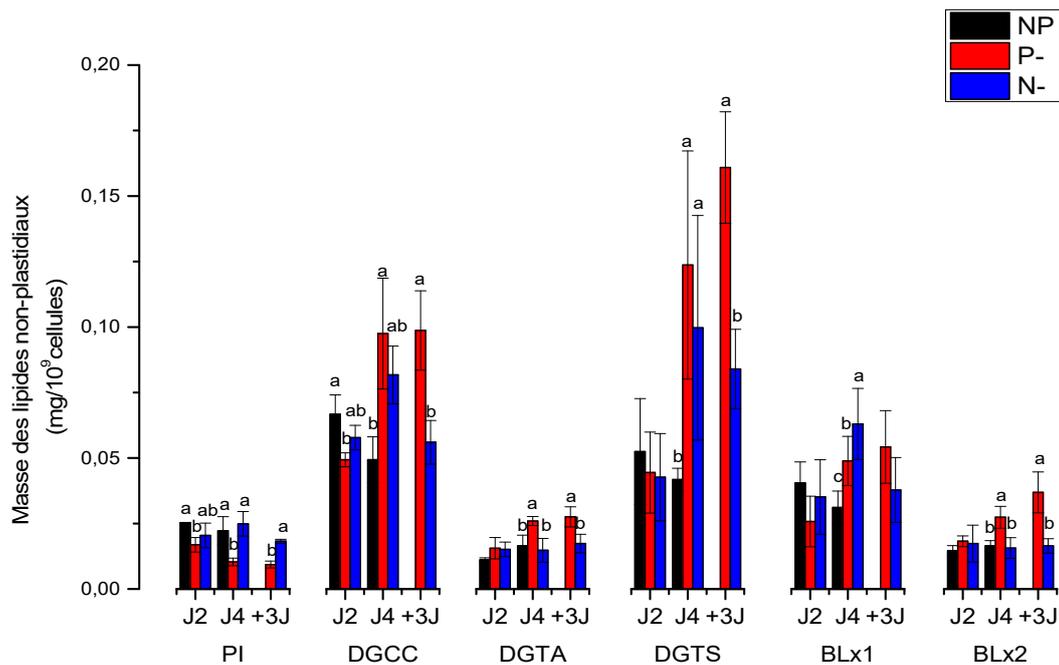
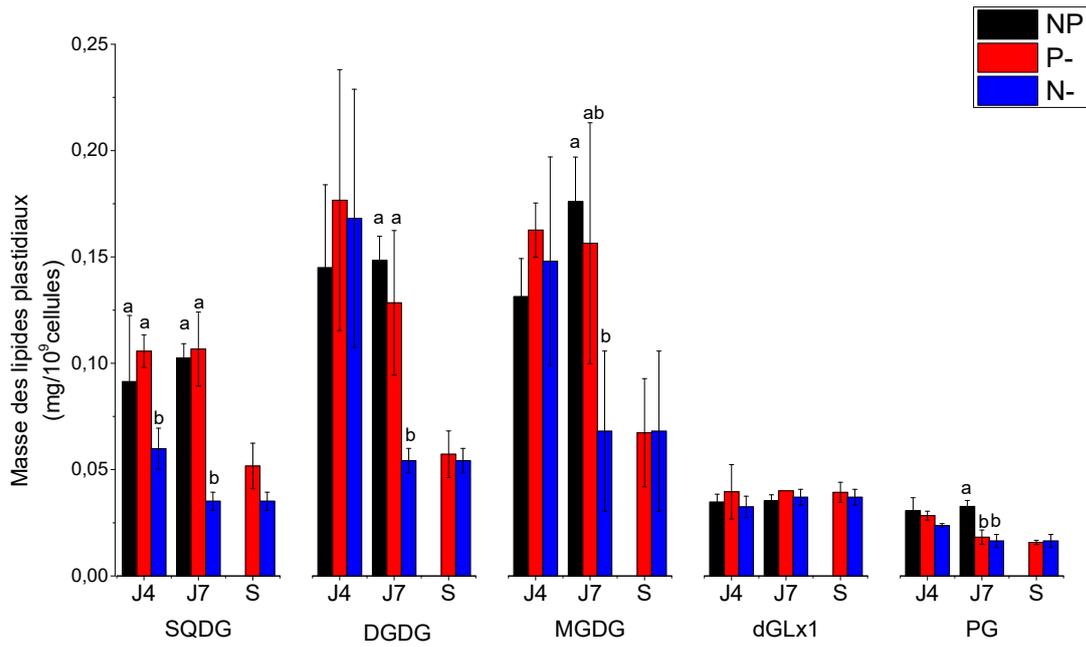


Figure A-10 : Analyse quantitative des lipides polaires (mg/10⁹ cellules) extraits de *T.lutea* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives (p < 0,05) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne ± S.D. (n = 3). J2 : phase exponentielle, J4 : début de la phase stationnaire, +3J : début de la phase stationnaire + 3 jours. (A) Lipides plastidiaux, (B) Lipides non-plastidiaux.

A



B

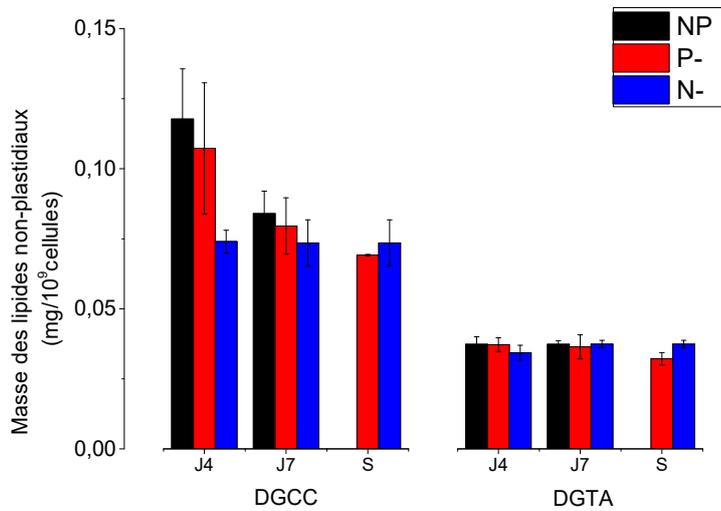


Figure A-11 : Analyse quantitative des lipides polaires (mg/10⁹ cellules) extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition témoin (NP) et en condition limitante en P (P-) ou en N (N-). Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions pendant chaque phase de la croissance. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$). J4 : phase exponentielle, S : début de la phase stationnaire. (A) Lipides plastidiaux, (B) Lipides non-plastidiaux.

Annexe 6 : Teneur cellulaire relative en acides gras dans les lipides neutres

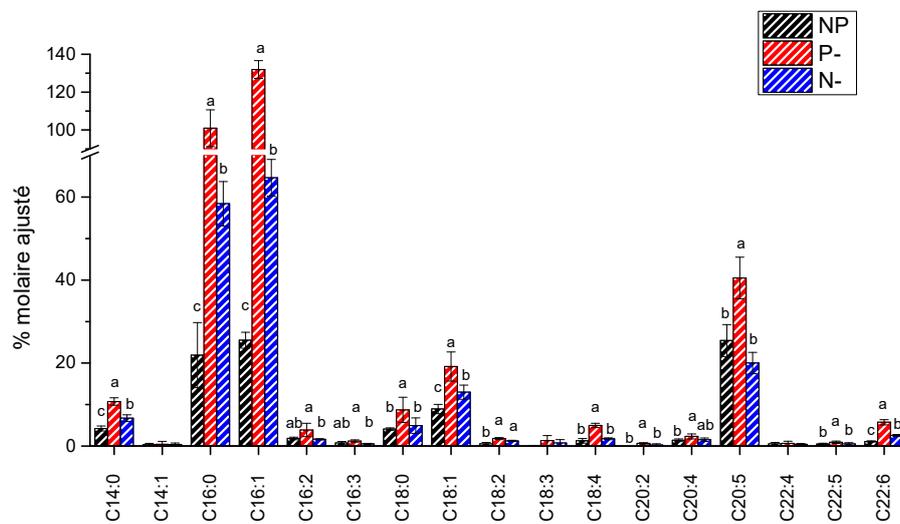


Figure A-12 : Teneur relative en acides gras dans les lipides neutres extraits de *P. tricornutum* cultivée en batch en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire) rapportée à celle des cellules témoins NP. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

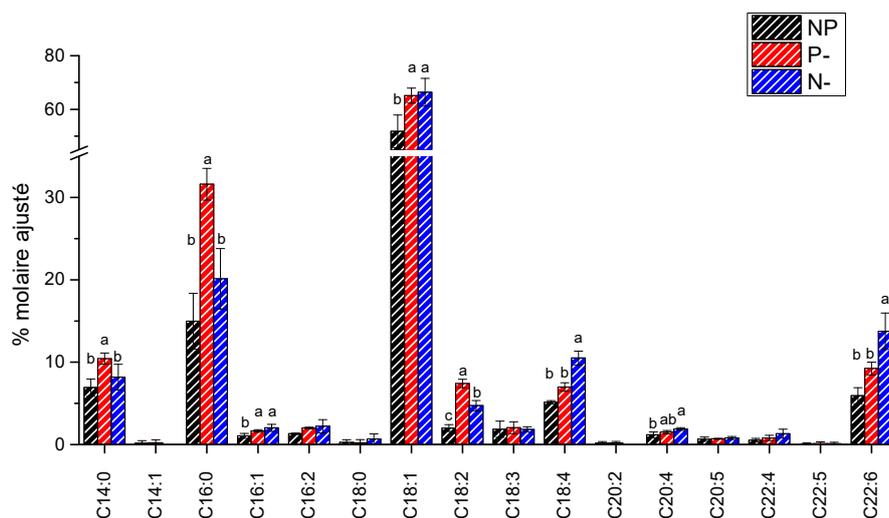


Figure A-13 : Teneur relative en acides gras dans les lipides neutres extraits de *T. lutea* cultivée en batch en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J4 (début de la phase stationnaire) rapportée à celle des cellules témoins NP. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. ($n = 3$).

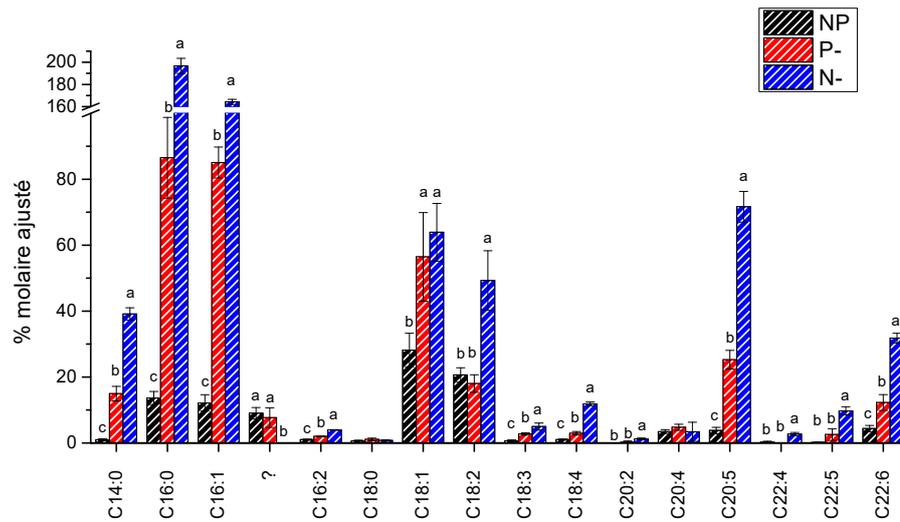


Figure A-14 : Teneur relative en acides gras dans les lipides neutres extraits de *D. lutheri* cultivée en batch en condition limitante en P (P-) ou en N (N-) au J7 rapportée à celle des cellules témoins NP. Les lettres différentes indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) entre les conditions. Moyenne \pm S.D. (n = 3).

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

1) **Huang B.**, Marchand J., Blanckaert V., Lukomska E., Ulmann L., Wielgosz-Collin G., Rabesaotra V., Moreau B., Bougaran G., Mimouni V., Morant-Manceau A. Nitrogen and phosphorus limitations induce carbon partitioning and membrane lipid remodeling in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*.

Accepté sous réserve de corrections dans European Journal of Phycology

2) **Huang B.**, Marchand J., Thiriet-Rupert S., Carrier G., Saint-Jean B., Lukomska E., Moreau B., Morant-Manceau A., Bougaran G., Mimouni V. Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta).

En préparation pour soumission à Algal Research

3) Heydarizadeh P., Boureba W., Zahedi M., **Huang B.**, Moreau B., Lukomska E., Couzinet-Mossion A., Wielgosz-Collin G., Martin-Jézéquel V., Bougaran G., Marchand J. and Schoefs B. Response of CO₂-starved diatom *Phaeodactylum tricornutum* to light intensity transition. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 372 (1728), ID 20160396, 2017

4) Chapitre de livre en préparation :

Huang B., Mimouni V., Marchand J., Morant-Manceau A., Ulmann L., Schoefs B. Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. In "Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals: Nutritional, Nutraceutical, Pharmaceutical and Multifarious Applications", CRC Press, USA.

Communications orales et affichées

1) **Huang B.**, Mimouni V., Bougaran G., Ulmann L., Marchand J., Schoefs B., Saint-Jean B., Carrier G., Morant-Manceau A. Effets physiologiques et synthèse de bétaïne lipides en réponse à une limitation nutritive en phosphore chez différentes espèces de microalgues marines. Colloque annuel de la Société Phycologique de France (SPF), 28 mars 2017, Paris (**résumé + présentation orale**).

2) **Huang B.**, Mimouni V., Bougaran G., Ulmann L., Marchand J., Saint-Jean B., Carrier G., Morant-Manceau A. Physiological effects and betaine lipid synthesis in response to phosphorus limitation in different species of marine microalgae Effets physiologiques et synthèse de bétaïne lipides en réponse à une limitation nutritive en phosphore chez différentes espèces de microalgues marines. 6^{ème} Congrès de l'International Society for Applied Phycology (ISAP), 18-23 juin 2017, Nantes (**résumé + poster**).

3) Mayer C., **Huang B.**, Le Goff M., Come M., Chini-Zittelli G., Faraloni C., Blanckaert V., Ouguerram K., Nazih H., Schoefs B., Chénais B., Mimouni V., Ulmann L. Efficiency of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in the prevention of metabolic syndrome installation: restoration of EPA levels in high-fat fed rat plasma and red blood cell lipids. 6^{ème} Congrès de l'International Society for Applied Phycology (ISAP), 18-23 juin 2017, Nantes (résumé + poster).

4) **Huang B.**, Marchand J., Lukomska E., Moreau B., Bougaran G., Mimouni V., Morant-Manceau A. Orientation du carbone et remodelage des lipides membranaires induits par une limitation en phosphore ou en azote chez la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum*. Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), 11-13 septembre 2018, Bruxelles (**résumé + présentation orale**).

5) Marchand J., **Huang B.**, Moreau B., Scarsini M., Thurotte A., Thiriet-Rupert S., Carrier G., Lukomska E., Bougaran G., Hu H., Schoefs B. L'orientation du métabolisme du carbone en réponse à des modifications du CO₂ chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*. Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), 11-13 septembre 2018, Bruxelles (résumé + présentation orale de M. Schoefs).

6) Thurotte A., Scarsini M., **Huang B.**, Moreau B., Lagarde F., Mimouni V., Bougaran G., Morant-Manceau A., Hu H., Schoefs B., Marchand J. Contrôle de la réorientation métabolique chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* par les facteurs de transcription. Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), 11-13 septembre 2018, Bruxelles (résumé + poster).

Journées Scientifiques

1) 5^{èmes} Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale VENAM, université de Nantes, 3 et 4 novembre 2016 (**résumé + présentation orale**)

2) Forum Jeunes Recherche, Collège Doctoral, Le Mans université, 17 novembre 2017 (**poster + présentation orale du poster** : obtention du prix du public)

3) 1^{ères} Journées de l'Ecole Doctorale des Science de la Mer et du Littoral, université de Brest, 13 et 14 février 2018 (**poster** : obtention du 1^{er} prix des posters présentés).

Titre : Réponses physiologiques et biochimiques à une limitation nutritive en phosphore ou en azote sur la réorientation métabolique des lipides polaires chez différentes espèces de microalgues marines

Mots clés : Microalgues marines, bétaïne lipides, triacylglycérols, limitation en phosphore, lipides polaires, acides gras oméga-3

Résumé : Les bétaïne lipides (BL) sont des lipides polaires qui se distinguent des phospholipides (PL) par l'absence de phosphore (P). La réorientation métabolique induite par une limitation en P chez des microalgues produisant des BL (*Tisochrysis lutea* et *Diacronema lutheri*, Haptophytes) ou en produisant peu (*Phaeodactylum tricorutum*, Bacillariophyte) a été comparée à celle induite par une limitation en azote (N). Le devenir et le flux de carbone dans différentes voies de biosynthèse ont été étudiés par une approche pluridisciplinaire.

La limitation nutritive en P ou en N affecte différemment le métabolisme du carbone selon les espèces microalgales. La limitation en P réduit fortement l'activité photosynthétique et la respiration chez *P. tricorutum* et *T. lutea*. Par conséquent, l'accumulation de carbone est plus élevée que sous limitation en N chez ces deux espèces. Les deux limitations stimulent en particulier la synthèse des lipides neutres et / ou des glucides. Le remplacement des PL par les BL a été observé

chez *P. tricorutum* en condition de limitation en P. Ce résultat est en accord avec une augmentation de la transcription du gène codant la bétaïne lipide synthase. En revanche, cette limitation ne modifie pas les teneurs en BL rapportées au carbone chez *T. lutea* et *D. lutheri*. La composition en acides gras des différentes classes lipidiques est modifiée selon l'espèce microalgale et l'élément nutritif limitant. Une attention particulière a été portée aux acides gras de la série oméga-3, notamment l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 ω 3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 ω 3) dont les proportions varient en fonction de l'élément limitant, de l'espèce et de la classe lipidique. L'augmentation de la production des lipides neutres et / ou des lipides polaires, notamment des bétaïne lipides, riches en DHA et/ou EPA induite par un stress nutritif laisse envisager une valorisation de ces molécules d'intérêt dans différents domaines dont la nutrition et la santé.

Title : Physiological and biochemical responses to a phosphorus or nitrogen limitation on the metabolic reorientation of polar lipids in different marine microalgal species.

Keywords : Marine microalgae, betaine lipids, triacylglycerols, phosphorus limitation, polar lipids, omega-3 fatty acids

Abstract : Betaine lipids (BL) are P-free polar lipids, conversely to phospholipids (PL). The metabolic reorientation induced by phosphorus (P) limitation in microalgae producing BL (*Tisochrysis lutea* and *Diacronema lutheri*, Haptophyta) or producing low levels of BL (*Phaeodactylum tricorutum*, Bacillariophyta) was compared to that induced by nitrogen (N) limitation. The carbon destiny and flow in different biosynthetic pathways were studied with a multidisciplinary approach.

P or N limitation differently affected carbon metabolism according to microalgal species. P limitation highly decreased photosynthetic activity and respiration of *P. tricorutum* and *T. lutea*. Consequently, carbon accumulation was higher than under N limitation in these two species. Both limitations stimulated the synthesis of neutral lipids and / or carbohydrates. Replacement of PL by BL

was observed in *P. tricorutum* under P limitation.

This result is in agreement with a transcription increase of the gene encoding BL synthase. On the other hand, this limitation did not modify BL contents in reference with carbon in *T. lutea* or *D. lutheri*. Fatty acid composition of the different lipid classes was modified according to the microalgal species and the limiting nutrient. Particular attention was paid to the fatty acids of the omega-3 series, notably eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 ω 3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3), the proportions of which vary according to the limiting element, species and lipid class. The increase in the production of neutral lipids and / or polar lipids, especially betaine lipids, rich in DHA and / or EPA induced by nutritive stress suggests a valorization of these molecules of interest in various areas including nutrition and health.