



HAL
open science

Mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la survie de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée polaire) à une période d'obscurité prolongée

Théo Sciandra

► **To cite this version:**

Théo Sciandra. Mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la survie de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée polaire) à une période d'obscurité prolongée. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay; Université Laval (Québec, Canada), 2022. Français. NNT: 2022UPASB014. tel-03847766

HAL Id: tel-03847766

<https://theses.hal.science/tel-03847766>

Submitted on 10 Nov 2022

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.

Mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués
dans la survie de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée
polaire) à une période d'obscurité prolongée

*Physiological and molecular mechanisms involved in the survival of
Fragilariopsis cylindrus (polar diatom) to prolonged darkness*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay et de l'université
Laval**

École doctorale n° 567, Sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : biologie
Graduate School : Biosphera. Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse préparée à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure et au Laboratoire
International de Recherche Takuvik, sous la direction de **Chris BOWLER**, directeur de
recherche, et la co-direction de **Marcel BABIN**, directeur de recherche.

Thèse soutenue à Paris, le 22 mars 2022, par

Théo SCIANDRA

Composition du Jury

Jacqui SHYKOFF Directrice de recherche (CNRS/UP Saclay)	Présidente
Éric MARÉCHAL Directeur de recherche (CNRS/CEA)	Rapporteur & Examineur
Benoît SCHOEFS Professeur (Le Mans Université)	Rapporteur & Examineur
Connie LOVEJOY Professeure (Université Laval)	Examinatrice
Chris BOWLER Directeur de recherche (CNRS/ENS Paris)	Directeur de thèse
Marcel BABIN Directeur de recherche (Université Laval)	Co-directeur de thèse

Titre : Mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la survie de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée polaire) à une période d'obscurité prolongée

Mots clés : diatomée polaire, obscurité prolongée, survie, cytométrie en flux, réserves de carbone, métabolisme

Résumé : Les zones polaires sont caractérisées par des conditions environnementales extrêmes dont les variations mettent à rude épreuve les capacités d'acclimatation des organismes sessiles et planctoniques marins. L'un des grands défis rencontrés par les organismes autotrophes est de survivre dans aux longs mois d'hiver privés de lumière. Au printemps, les microalgues (eucaryotes majoritairement unicellulaires) ayant survécu forment d'importantes efflorescences (blooms) qui supportent la production estivale du reste du réseau trophique. Les diatomées, particulièrement bien adaptées aux zones océaniques turbulentes riches en nutriments, dominent la production primaire aux pôles. Elles sont souvent les premières à initier les efflorescences printanières, illustrant leur extraordinaire capacité à survivre à la nuit polaire, mais également à reprendre leur croissance après une très longue période d'inactivité. Bien qu'étudiés à de nombreuses reprises par le passé, les processus impliqués dans leur survie sont encore aujourd'hui mal connus.

Le projet *Green Life in the Dark*, au sein duquel cette thèse a été réalisée, a pour but d'élucider les mécanismes physiologiques et génétiques impliqués dans la survie des diatomées pendant et juste après la nuit polaire. Pour ce faire, des cultures de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée polaire pennée) ont été soumises en laboratoire à quatre périodes d'obscurité longues d'un à cinq mois, chacune suivie d'une période de ré-illumination. *F. cylindrus* domine souvent la production des blooms en Arctique et en Antarctique. Elle peut par ailleurs croître attachée sous la glace, et dans la colonne d'eau, faisant d'elle une représentante pertinente des diatomées polaires. Son génome a également été publié.

Nous nous sommes premièrement attelés à tester l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie en flux dans l'étude de la survie. Cette technique a permis de suivre les variations de différents paramètres physiologiques des cultures au niveau de la cellule, une première dans ce champ de recherche.

Les résultats ont permis d'illustrer l'importance de prendre en considération les potentielles variations interindividuelles au sein d'une population de cellules lors d'une acclimatation longue à l'obscurité. Après plusieurs semaines sans lumière, deux sous-populations dérivant de la population initiale ont pu être détectées, et leurs caractéristiques physiologiques étudiées. Trois causes de mortalité ont pu être identifiées.

Les grands réservoirs de molécules riches en carbone (sucres, lipides et protéines) permettent de stocker les photosynthétats. L'utilisation de ces réserves permet aux organismes de compenser un déficit d'apports énergétiques exogènes, en fournissant les métabolites nécessaires au fonctionnement de la cellule. Associée à un ralentissement du métabolisme, cette stratégie est utilisée par certaines diatomées pour survivre à la nuit polaire. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Le second objectif de cette thèse était donc, grâce une double approche, de suivre la gestion du métabolisme de *F. cylindrus* à l'obscurité. Premièrement, en étudiant la régulation de la transcription des voies métaboliques associées aux grands compartiments de carbone, puis en suivant les variations de la taille et de la nature de ces derniers. Les analyses ont permis de confirmer la dégradation de différents stocks de carbone accumulés avant l'obscurité, ainsi que le ralentissement métabolique attendu. Les données de transcriptomique ont notamment permis de souligner l'importance des voies de dégradation de certains acides aminés ramifiés ou aromatiques. L'analyse des différentes familles de molécules a montré que les lipides et carbohydrates de réserve ont été dégradés à court et moyen termes, alors que les protéines, biomasse fonctionnelle, ont été recyclées dans un second temps, probablement pour pallier la diminution d'énergie provenant d'autres compartiments.

Title : Physiological and molecular mechanisms involved in the survival of *Fragilariopsis cylindrus* (polar diatom) to prolonged darkness

Keywords : polar diatom, prolonged darkness, survival, flow cytometry, carbon reserves, metabolism

Abstract : The polar regions are characterized by extreme environmental conditions whose variations challenge the acclimation capabilities of marine sessile and planktonic organisms. One of the major challenges faced by autotrophic organisms is to survive in darkness during the long winter months. In the spring, the surviving microalgae (mostly unicellular eukaryotes) form large blooms that support the rest of the food web for summer production. Diatoms, particularly well adapted to turbulent nutrient-rich oceanic zones, dominate primary production at the poles. They are often the first to initiate spring blooms, illustrating their extraordinary ability to survive the polar night, but also to resume growth after a very long period of inactivity. Although studied many times in the past, most of the processes involved in survival remain poorly understood.

The Green Life in the Dark project, in which this thesis was carried out, aims at elucidating the physiological and genetic mechanisms involved in the survival of diatoms during and just after the polar night. To do so, cultures of *Fragilariopsis cylindrus* (polar pennate diatom) were subjected in the laboratory to four periods of darkness lasting from one to five months, each followed by a period of re-illumination. *F. cylindrus* often dominates bloom production in the Arctic and Antarctic. It can also grow attached under the ice and in the water column, making it a relevant representative of polar diatoms. Its genome has also been published.

We first set out to test the value of using flow cytometry in the study of survival. This technique allowed us to follow the variations of different physiological parameters of the cultures at the single-cell level, a first in this field of research. The results illustrated the imperatoris, matreque Galla.

importance of considering the potential inter-individual variations occurring within a population of cells during a long acclimation to darkness. After several weeks in the dark, two subpopulations derived from the initial population were observed and their physiological characteristics studied. Three causes of mortality were identified.

The large reservoirs of carbon-rich molecules (sugars, lipids and proteins) are used to store photosynthates. The use of these reserves allows organisms to compensate for a deficit in exogenous energy supply, by providing the metabolites necessary for the functioning of the cell. Associated with a slowing down of the metabolism, this strategy is used by some diatoms to survive the polar night. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. The second objective of this thesis was therefore, through a dual approach, to follow the management of the metabolism of *F. cylindrus* in the dark. First, by studying the regulation of the transcription of metabolic pathways associated with large carbon compartments, and then by following the variations of the size and nature of the latter. Analyses confirmed the degradation of different carbon stocks accumulated before darkness, as well as the expected metabolic slowdown. The transcriptomic data allowed to underline the importance of the degradation pathways of some branched and aromatic amino acids. The analysis of the different families of molecules showed that reserve lipids and carbohydrates were degraded in the short and medium term, while proteins, the functional biomass, were recycled in a second phase, probably to compensate for the decrease in energy from other compartments.

**Mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués
dans la survie de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée
polaire) à une période d'obscurité prolongée**

Thèse en cotutelle

Doctorat interuniversitaire en océanographie

Théo Sciandra

Sous la direction de :

Marcel Babin, directeur de recherche

Chris Bowler, co-directeur de cotutelle

Résumé

Les zones polaires sont caractérisées par des conditions environnementales extrêmes dont les variations mettent à rude épreuve les capacités d'acclimatation des organismes sessiles et planctoniques marins. L'un des grands défis rencontrés par les organismes autotrophes est de survivre dans aux longs mois d'hiver privés de lumière. Au printemps, les microalgues (eucaryotes majoritairement unicellulaires) ayant survécu forment d'importantes efflorescences (*blooms*) qui supportent la production estivale du reste du réseau trophique. Les diatomées, particulièrement bien adaptées aux zones océaniques turbulentes riches en nutriments, dominent la production primaire aux pôles. Elles sont souvent les premières à initier les efflorescences printanières, illustrant leur extraordinaire capacité à survivre à la nuit polaire, mais également à reprendre leur croissance après une très longue période d'inactivité. Bien qu'étudiés à de nombreuses reprises par le passé, les processus impliqués dans leur survie sont encore aujourd'hui mal connus.

Le projet *Green Life in the Dark*, au sein duquel cette thèse a été réalisée, a pour but d'élucider les mécanismes physiologiques et génétiques impliqués dans la survie des diatomées pendant et juste après la nuit polaire. Pour ce faire, des cultures de *Fragilariopsis cylindrus* (diatomée polaire pennée) ont été soumises en laboratoire à quatre périodes d'obscurité longues d'un à cinq mois, chacune suivie d'une période de ré-illumination. *F. cylindrus* domine souvent la production des *blooms* en Arctique et en Antarctique. Elle peut par ailleurs croître attachée sous la glace, et dans la colonne d'eau, faisant d'elle une représentante pertinente des diatomées polaires. Son génome a également été publié.

Nous nous sommes premièrement attelés à tester l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie en flux dans l'étude de la survie. Cette technique a permis de suivre les variations de différents paramètres physiologiques des cultures au niveau de la cellule, une première dans ce champ de recherche. Les résultats ont permis d'illustrer l'importance de prendre en considération les potentielles variations interindividuelles au sein d'une population de cellules lors d'une acclimatation longue à l'obscurité. Après plusieurs semaines sans lumière, deux sous-populations dérivant de la population initiale ont pu être détectées, et

leurs caractéristiques physiologiques étudiées. Trois causes de mortalité ont pu être identifiées.

Les grands réservoirs de molécules riches en carbone (sucres, lipides et protéines) permettent de stocker les photosynthétats. L'utilisation de ces réserves permet aux organismes de compenser un déficit d'apports énergétiques exogènes, en fournissant les métabolites nécessaires au fonctionnement de la cellule. Associée à un ralentissement du métabolisme, cette stratégie est utilisée par certaines diatomées pour survivre à la nuit polaire. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Le second objectif de cette thèse était donc, grâce une double approche, de suivre la gestion du métabolisme de *F. cylindrus* à l'obscurité. Premièrement, en étudiant la régulation de la transcription des voies métaboliques associées aux grands compartiments de carbone, puis en suivant les variations de la taille et de la nature de ces derniers. Les analyses ont permis de confirmer la dégradation de différents stocks de carbone accumulés avant l'obscurité, ainsi que le ralentissement métabolique attendu. Les données de transcriptomique ont notamment permis de souligner l'importance des voies de dégradation de certains acides aminés ramifiés ou aromatiques. L'analyse des différentes familles de molécules a montré que les lipides et carbohydrates de réserve ont été dégradés à court et moyen termes, alors que les protéines, biomasse fonctionnelle, ont été recyclées dans un second temps, probablement pour pallier la diminution d'énergie provenant d'autres compartiments.

Mots-clefs : Diatomée polaire, obscurité prolongée, survie, cytométrie en flux, réserves de carbone, métabolisme

Abstract

The polar regions are characterized by extreme environmental conditions whose variations challenge the acclimation capabilities of marine sessile and planktonic organisms. One of the major challenges faced by autotrophic organisms is to survive in darkness during the long winter months. In the spring, the surviving microalgae (mostly unicellular eukaryotes) form large blooms that support the rest of the food web for summer production. Diatoms, particularly well adapted to turbulent nutrient-rich oceanic zones, dominate primary production at the poles. They are often the first to initiate spring blooms, illustrating their extraordinary ability to survive the polar night, but also to resume growth after a very long period of inactivity. Although studied many times in the past, most of the processes involved in survival remain poorly understood.

The Green Life in the Dark project, in which this thesis was carried out, aims at elucidating the physiological and genetic mechanisms involved in the survival of diatoms during and just after the polar night. To do so, cultures of *Fragilariopsis cylindrus* (polar pennate diatom) were subjected in the laboratory to four periods of darkness lasting from one to five months, each followed by a period of re-illumination. *F. cylindrus* often dominates bloom production in the Arctic and Antarctic. It can also grow attached under the ice and in the water column, making it a relevant representative of polar diatoms. Its genome has also been published.

We first set out to test the value of using flow cytometry in the study of survival. This technique allowed us to follow the variations of different physiological parameters of the cultures at the single-cell level, a first in this field of research. The results illustrated the importance of considering the potential inter-individual variations occurring within a population of cells during a long acclimation to darkness. After several weeks in the dark, two subpopulations derived from the initial population were observed and their physiological characteristics studied. Three causes of mortality were identified.

The large reservoirs of carbon-rich molecules (sugars, lipids and proteins) are used to store photosynthates. The use of these reserves allows organisms to compensate for a deficit in exogenous energy supply, by providing the metabolites necessary for the functioning of the cell. Associated with a slowing down of the metabolism, this strategy

is used by some diatoms to survive the polar night. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. The second objective of this thesis was therefore, through a dual approach, to follow the management of the metabolism of *F. cylindrus* in the dark. First, by studying the regulation of the transcription of metabolic pathways associated with large carbon compartments, and then by following the variations of the size and nature of the latter. Analyses confirmed the degradation of different carbon stocks accumulated before darkness, as well as the expected metabolic slowdown. The transcriptomic data allowed to underline the importance of the degradation pathways of some branched and aromatic amino acids. The analysis of the different families of molecules showed that reserve lipids and carbohydrates were degraded in the short and medium term, while proteins, the functional biomass, were recycled in a second phase, probably to compensate for the decrease in energy from other compartments.

Keywords: polar diatom, prolonged darkness, survival, flow cytometry, carbon reserves, metabolism

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iv
Table des matières	vi
Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux	xx
Liste des abréviations	xxiii
Remerciements	xxvii
Avant-propos	xxix
Introduction	1
Régime lumineux et production primaire aux pôles	1
Les diatomées	5
Origines	5
Morphologie et cycle de vie	8
Répartition et importance écologique	9
Succès écologique	11
Stratégies de survie à l'obscurité prolongée chez les diatomées	11
Constitution et consommation parcimonieuse des réserves de carbone	13
Les formes de stockage.....	13
Carbohydrates.....	14
Lipides	14
Dynamique d'accumulation et de consommation des carbohydrates et des lipides	15
Cellules de résistance	18
Les formes de résistance connues chez les diatomées.....	18
Importance des RS et RC dans le cycle de vie et à l'obscurité	19
Changements fréquemment décrits chez les RC et RS.....	21
Hétérotrophie.....	23
Introduction générale/historique.....	23
De nouveaux progrès possibles grâce à l'évolution des techniques biomoléculaires	25
L'hétérotrophie en renfort des deux premières stratégies ?.....	25
Gestion de la photosynthèse et de la photoprotection	26

Machinerie photosynthétique	26
Contenu en chlorophylle a.....	26
Photoprotection.....	27
Organisme d'étude	27
Caractéristiques de l'espèce	27
Survie de <i>Fragilariopsis cylindrus</i> à l'obscurité, approches des études passées	29
Objectifs de l'étude	32
Chapitre 1	33
Chapitres 3 et 4.....	33
Résumé de la planification des expérience et des tâches accomplies	34
Chapitre 1 - Destins possibles des cellules de <i>Fragilariopsis cylindrus</i> lors d'une obscurité prolongée	39
1.1 Résumé.....	39
1.2. Abstract.....	40
1.3. Introduction.....	40
1.4. Materials and methods	44
1.4.1 Biological material	44
1.4.2. Culture system and experimental planning	44
1.4.3. Studied parameters	46
1.4.3.1. Flow cytometry.....	46
1.4.3.2. Measurement of other physiological parameters.....	49
1.4.4. Statistical methods.....	49
1.5. Results.....	50
1.5.1. Influence of DA length and re-illumination on cell survival and recovery ..	50
1.5.2. Carbon consumption	52
1.5.3. Cells experience different fates	52
1.5.3.1. P1: Cells that survived darkness.....	53
1.5.3.2. P2: Population characterized by low red fluorescence, FSC and lipid content	57
1.5.3.3. P3: A population with high SYBR Green fluorescence	59
1.6. Discussion	60
1.6.1. Metabolic slowdown and carbon consumption.....	61
1.6.2. P1: Survival during darkness does not guarantee growth recovery following re-illumination.....	63
1.6.3. P2: Neutral lipid depletion and metabolic reduction.....	64

1.6.4. P3: Sleepwalker cells	65
1.7 Conclusion	66
1.8. Supplementary methods.....	67
1.8.1. Preparation of cultures: <i>F. cylindrus</i> growth conditions before the start of the experiments	68
1.8.2. Light spectrum in the cylinders.....	70
1.8.3. Sampling timeline	71
1.8.4. Identification of distinct cell populations on the cytograms	71
Chapitre 2 – Métabolisme du carbone chez les diatomées et chez <i>Fragilariopsis cylindrus</i>	73
2.1. Résumé.....	73
2.2. Abstract	73
2.3. Les réservoirs de carbone intracellulaire	74
2.3.1. Fixation de carbone inorganique	74
2.3.2. Compartiments cellulaires majeurs de carbone.....	74
2.4. Carbohydrates	76
2.4.1. La chrysolaminarine, carbohydrate de stockage	76
2.4.2. Glycolyse, gluconéogenèse et chrysolaminarine	78
2.4.3. Voie des pentoses phosphates	81
2.4.4. Entner-Doudoroff	82
2.4.5. Voie phosphocétolase.....	84
2.5. Lipides	85
2.5.1. Lipides de réserve.....	85
2.5.2. Autres classes majeures de lipides	86
2.5.2.1. Acides gras	86
2.5.2.2. Glycérides	88
2.5.2.3. Glycérophospholipides	88
2.5.2.4. Galactolipides	89
2.5.2.5. Sphingolipides	90
2.5.2.6. Lipides bêtaïnes	90
2.5.3. Voies de synthèse	92
2.5.3.1. Synthèse des acides gras.....	92
2.5.3.2. Voie procaryotique	94
2.5.3.3. Voie eucaryotique.....	94
2.5.3.4. Voies alternatives	95

2.5.4. Voies de dégradation.....	97
2.5.4.1. Lipolyse	97
2.5.4.2. β -oxydation.....	97
2.6. Réservoirs de carbone alternatifs	100
2.6.1. Protéines	100
2.6.1.1. Acides aminés à chaîne latérale ramifiée	101
2.6.1.2. Alanine	108
2.6.1.3. Asparagine et aspartate	108
2.6.1.4. Arginine et proline.....	109
2.6.1.5. Glutamate et glutamine.....	110
2.6.1.6. Lysine	111
2.6.1.7. Sérine, glycine, et thréonine	113
2.6.1.8. Histidine	115
2.6.1.9. Méthionine.....	115
2.6.1.10. Cystéine	117
2.6.1.11. Acides aminés aromatiques	117
2.6.1.12. Dégradation des protéines	119
2.6.2. Pigments	120
2.6.3. Exopolysaccharides.....	121
Chapitre 3 – Métabolisme du carbone and dégradation des acides aminés ramifiés chez <i>Fragilariopsis cylindrus</i> lors d'une acclimatation à l'obscurité prolongée.....	123
3.1 Résumé.....	123
3.2 Abstract	124
3.3 Introduction.....	125
3.4. Material and Methods	128
3.4.1. Organism and cultures.....	128
3.4.2. Cell concentration	128
3.4.3. ARN sequencing	129
3.4.3.1 Sampling	129
3.4.3.2. RNA extraction and purification	129
3.4.3.3. RNA sequencing.....	129
3.4.3.4. Alignment, count normalization and differential expression analysis ..	130
3.4.3.5. Identification of genes of interest	131
3.5. Results.....	132
3.5.1. Global overview	132
3.5.1. First three days of darkness	134

3.5.1.1. Carbohydrates	134
3.5.1.2. Lipids	135
3.5.1.3. Amino acids	135
3.5.1.4. Autophagy	136
3.5.2. Second phase of DA: day 6 to 3 months	136
3.5.2.1. Carbohydrates	136
3.5.2.2. Lipids	138
3.5.2.3. Amino acids	139
3.5.2.4. Autophagy	140
3.6. Discussion	143
3.6.1. Overview of the results of the differential expression analysis	144
3.6.1.1. Completion and arrest of the cell cycle	144
3.6.1.2. Dormancy	145
3.6.2. Carbohydrates.....	145
3.6.3. Lipids.....	147
3.6.4. Amino acids.....	149
3.6.5. Missing steps/routes of amino acid degradation in <i>F. cylindrus</i>	152
3.6.6. Autophagy	153
3.6.7. The role for autophagy in protein recycling.....	155
3.6.8. Influence of pre-darkness growth conditions	156
3.7 Conclusion	157
Chapitre 4 – Réponse des réservoirs de carbone de <i>Fragilariopsis cylindrus</i> à l’obscurité prolongée	158
4.1. Résumé.....	158
4.2. Abstract.....	159
4.3. Introduction.....	159
4.4. Matériel et méthodes.....	163
4.4.1. Matériel biologique	163
4.4.2. Cultures et conditions d’acclimatation.....	163
4.4.3. Paramètres étudiés.....	164
4.4.3.1. Cytométrie en flux, carbone organique particulaire et pigmentation	164
4.4.3.2. Respiration à l’obscurité.....	164
4.4.3.3. Carbohydrates.....	165
4.4.3.4. Lipides	167
4.4.3.5. Protéines	168

4.5. Résultats.....	170
4.5.1. Contamination des cultures	170
4.5.2. Taux de consommation d'oxygène à l'obscurité.....	172
4.5.3. Dosages des principaux éléments macromoléculaires	173
4.5.3.1. Carbone particulaire total	173
4.5.3.2. Carbohydrates	174
4.5.3.3. Lipides neutres cellulaires estimés par cytométrie en flux	176
4.5.3.4. Classes de lipides.....	177
4.5.3.5. Protéines	179
4.5.3.6. Pigments	181
4.6. Discussion.....	182
4.6.1. Diminution drastique de l'activité métabolique	182
4.6.2. Consommation lente du carbone cellulaire	184
4.6.3. La chrysolaminarine est dégradée lors des premières semaines d'obscurité	185
4.6.4. Lipides.....	186
4.6.5. La dégradation des protéines intervient dans un second temps	188
4.6.6. Pigments, peu probablement une source alternative d'énergie	190
4.7. Conclusion	191
4.8. Méthodes supplémentaires.....	191
4.8.1. Fréquence d'échantillonnage.....	192
4.8.2. Tampon d'extraction des protéines	193
Conclusion.....	194
Chapitre 1. Une approche unicellulaire innovante.....	194
Chapitre 2. Métabolisme du carbone	195
Chapitre 3. Première analyse du métabolisme du carbone par transcriptomique	195
Chapitre 4. Dynamique des réservoirs cellulaires de carbone	197
Pistes de recherche alternatives	199
Espèces étudiées	200
De nouvelles possibilités s'ouvrent avec l'étude de la nuit polaire sur le terrain ..	200
Influence des conditions de croissance précédant l'obscurité.....	201
Le rôle des molécules de signal, un domaine peu exploré chez les diatomées	202
Bibliographie	204
Annexe A – Chapitre 1	232

Annexe B – Chapitre 2	242
Annexe C – Chapitre 4	284

Liste des figures

- Figure 1.** Schéma de la variation saisonnière de l'exposition des zones polaires au rayonnement solaire résultant de l'angle entre l'axe de rotation de la Terre et la perpendiculaire à son plan orbital..... 1
- Figure 2.** Régime lumineux des zones polaires au cours d'une année en fonction de la latitude. 2
- Figure 3.** Cycle de la production primaire autotrophe annuelle dans les zones polaires recouvertes par une banquise hivernale..... 4
- Figure 4.** Photos de microscopie électronique d'un représentant de chacune des trois classes de diatomées (centrique, pennée raphée, pennée araphide). Photo 1 tirée de De Stephano et al. (2007), photo 2 et 3 postées par D.G Mann (2008) sur internet. 6
- Figure 5.** Représentation schématique des évènements d'endosymbiose et d'échanges de matériel génétique (parfois hypothétiques) intervenus dans les étapes évolutives ayant conduit à l'apparition des diatomées. Tirée de Falciatore et al. 2020. 7
- Figure 6.** Cycle de vie des diatomées centriques. Le cycle de vie des diatomées pennées diffère de celui des centriques (représenté ici) par l'emploi de l'isogamie plutôt que de l'oogamie. Schéma tiré de Moore et al. (2017). 9
- Figure 7.** (A) Concentration des diatomées dans les eaux de surface entre avril et juin (en haut) et octobre et décembre (en bas) estimée par modélisation. Tirée de Tréguer et al. 2018. (B) Abondance relative des diatomées par rapport à la biomasse totale du phytoplancton entre 1980 et 1999 estimée par modélisation. Tirée de Marinov et al. (2010). 10
- Figure 8.** (A) Images issues de microscopie optique de cellules en chaîne de *Chaetoceros pseudocurvisetus* sous leur forme végétative (haut), sous forme de spores (milieu) formées dans une culture limitée en azote, et sous forme de RC formées dans une culture limitée en azote et silice (bas) (échelle : 10 µm) (tirée de Kuwata et al. 2013). (B) Photo de microscopie électronique à balayage d'une spore de *Chaetoceros socialis* formée dans une culture limitée en azote (échelle : 1 µm) (tirée de Pelusi et al. 2019). 19
- Figure 9.** (A) Photo de microscopie électronique à balayage de deux cellules de *F. cylindrus* (Lange et Dieckmann, AWI). (B) Photo de microscopie optique de deux cellules de *F. cylindrus* issues de cultures acclimatées en lumière continue pendant nos expériences. (C) et (D) Photos de microscopie électronique issues de la collection de culture de Roscoff (RCC) de cellules de deux souches de *F. cylindrus* isolées respectivement dans les océans Arctique et Antarctique (crédit : M. Gachenot)..... 29

Figure 10. Étude de l’acclimatation à l’obscurité prolongée et au retour à la lumière de <i>F. cylindrus</i> par Kennedy et al. (2019).....	32
Figure 11. Plan des trois expériences d’acclimatation à l’obscurité prolongée. La fréquence d’échantillonnage est représentée de manière schématique par des barres verticales bleues.....	35
Figure 12. Photo de deux cylindres de 80 L utilisés pour cultiver <i>F. cylindrus</i> dans une chambre froide maintenue à 0 °C.	36
Figure 1.1. Mean BODIPY green fluorescence (neutral lipids) and carbon quota during the 3-month DA. Each point is the mean of technical replicates of the three biological replicates (n = 9) with their standard deviation as the error bars. Neutral lipid content is expressed as relative units (r.u.).	52
Figure 1.2. Density scatter plot showing P1, P2 and P3 after three months of darkness.	53
Figure 1.3. Mean cell concentrations during 3-month DA and subsequent RL.	54
Figure 1.4. Mean forward scatter and red fluorescence during the 3-month DA and subsequent RL.	55
Figure 1.5. Mean SYBR Green fluorescence of P1 and P3 during the 3-month DA and subsequent RL.	57
Figure 1.6. BODIPY fluorescence of P2. Relative units (r.u.). (A) Cytogram showing the pattern of BODIPY green fluorescence of P1 and P2 at the end of DA after staining with BODIPY. Cal. beads = calibration beads. (B) BODIPY fluorescence for P2 during the 3-month DA and subsequent RL.	59
Figure 1.7. The integral of the curve equals 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The light intensity was measured with a radiometer USB-4000 (Ocean Insight) every 21 nm. The light probe was placed in the middle of the cylinders.....	70
Figure 2.1. Pourcentages des masses sèches moyennes (%) des réservoirs de carbone chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> au cours d’un cycle jour nuit (16:8) (A) en conditions de croissance non limitantes, (B) lors d’une limitation en nitrates (modifiée d’après Remmers et al. 2018). LR = lipides de réserve, LM = lipides membranaires.....	75
Figure 2.2. Représentation simplifiée des connexions entre photosynthèse, métabolisme des carbohydrates, du pyruvate et des acides aminés, cycle du TCA, et respiration mitochondriale, montrant les principales voies du carbone fixé ainsi que les échanges possibles entre les principaux réservoirs de carbone et les processus qui génèrent de l’énergie et du potentiel réducteur.	78

Figure 2.3. Métabolisme de la chrysolaminarine chez les diatomées. Les flèches noires représentent les réactions réversibles.	80
Figure 2.4. Voies des pentoses phosphates oxydatives (OPPP) et non-oxydatives (NOPPP).	82
Figure 2.5. La voie d'Entner-Doudoroff est considérée comme la plus ancienne des voies glycolytiques.	84
Figure 2.6. Structure de l'acide gras docosahexaénoïque.	88
Figure 2.7. Structure des principales classes de lipides présentes chez les diatomées. (A) Glycérides. (B) Glycérophospholipides et lysoglycérophospholipides. (C) Glycolipides, (D) Lipides bétaïne. (E) Sphingolipides.	91
Figure 2.8. La synthèse des acides gras dans les diatomées est opérée par la FASII, un processus cyclique qui aboutit à la formation d'un acyl-ACP grâce à la condensation successive de malonyl-CoA sur un acétyl-CoA.	93
Figure 2.9. Représentation simplifiée des principales voies du métabolisme des lipides dans une diatomée.	96
Figure 2.10. Schéma de la β -oxydation.	99
Figure 2.11. Points d'entrée des acides aminés (rectangles en pointillés) protéinogènes dans le TCA.	101
Figure 2.12. Leucine, valine, et isoleucine.	102
Figure 2.13. Voies cataboliques des acides aminés à chaîne ramifiée aboutissant à la production d'acétyl-CoA et de succinyl-CoA pouvant entrer dans le TCA.	108
Figure 2.14. Voie catabolique de l'alanine.	108
Figure 2.15. Voies cataboliques de l'asparagine et de l'aspartate.	109
Figure 2.16. Voies cataboliques de l'arginine et de la proline.	110
Figure 2.17. Voies cataboliques de la glutamine et du glutamate incluant le <i>shunt</i> GABA.	111
Figure 2.18. Voie catabolique de la lysine. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de <i>F. cylindrus</i> . Les flèches rouges pointillées représentent les parties manquantes de la voie hypothétique chez <i>A. thaliana</i> (voir Hildebrandt et al. 2015).	113
Figure 2.19. Voies cataboliques de la sérine, de la thréonine et de la glycine, y compris le système de clivage de la glycine (GCS).	115

Figure 2.20. Voie catabolique de la méthionine.....	116
Figure 2.21. Voie catabolique de la cystéine.....	117
Figure 2.22. Voies cataboliques de la phénylalanine et de la tyrosine.....	119
Figure 3.1. Simplified representation of connections between the metabolism of carbohydrates, pyruvate, lipids, amino acids, the TCA cycle and mitochondrial respiration.....	127
Figure 3.2. Differential expression (log2 fold change = L2FC) relative to T0 of <i>F. cylindrus</i> genes during DA.....	133
Figure 3.3. Regulation of BCAA catabolism. Numbers in circles refer to enzymes listed in the table. Dashed arrows represent steps encoded genes that we were not able to identify in <i>F. cylindrus</i> genome. Colors were assigned based on the corresponding L2FC (warm colors for overexpressed genes, cool colors for underexpressed genes, and white for genes that were not differentially expressed).....	142
Figure 4.1. Représentation simplifiée du métabolisme cellulaire et des flux d'énergie associés (ATP et nucléotides jouant le rôle de co-enzyme dans les réactions d'oxydoréduction).	161
Figure 4.2. Résumé de la procédure de séparation des deux fractions de carbohydrates et des deux sous-fractions de la partie soluble. Modifiée à partir de Caballero et al. 2016.	167
Figure 4.3. Vitesse de variation de la concentration en oxygène lors d'incubations à l'obscurité d'aliqots de la culture n°1 (dépourvue de contamination jusqu'au jour 42).	173
Figure 4.4. Carbone total par cellule (n = 9). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.....	174
Figure 4.5. Fractions cellulaires de carbohydrates (A) solubles réducteurs et non-réducteurs et (B) insolubles, en équivalent glucose (n = 3). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.....	176
Figure 4.6. Contenu en lipides neutres par cellule estimé par CMF après marquage des cellules au BODIPY. Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard (n = 3). Unités relatives (u.r.).....	177
Figure 4.7. Teneurs des principales classes de lipides par cellule pour les cultures n°1 et n°2 (n = 6). Les barres d'erreur représentent l'écart type standard. PL : phospholipides ; GL : glycolipides.	178

Figure 4.8. Cholestérol and desmostérol sulfates par cellules pour les cultures n°1 et n°2 (n = 6). Les barres d'erreur représentent l'écart type standard.....	179
Figure 4.9. Teneur cellulaire en protéines totales pour les cultures n°1 et n°2 (n = 6).	180
Figure 4.10. Quantités de Rubisco et de PsbA par cellule pour les cultures n°1 et n°2 (n = 2).....	181
Figure 4.11. Pigments cellulaires mesurés par HPLC (n=3). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.....	182
Figure S1. 1. Example of cytograms showing (A) the cell concentration, the red fluorescence and the FSC, (B) the neutral lipids content, (C) the viability, (D) the genetic material fluorescence and to detect the eventual presence of contaminant organisms. Relative units (r.u.).	232
Figure S1. 2. Viability of cultures for each of the three DA before RL estimated with SYTOX Green (i.e. membrane permeability test). Each point is the mean of the technical replicates of all biological replicates (n = 9) with their standard deviation as the error bars.	233
Figure S1. 3. Appearance of the P2 population (red) next to the P1 population (green) during DA.	234
Figure S1. 4. Size distribution curves of the three cultures of <i>F. cylindrus</i> after three months of darkness estimated on the Multisizer 4.	235
Figure S1. 5. Linear regression between the FSC and red fluorescence and green fluorescence values of the population containing P1 and P3 showing the dependency of FSC estimations on chl <i>a</i> and NL contents in darkness for the 3-month DA cultures. Each point is the mean of the technical replicates for each biological replicate (n = 3). Relative units (r.u.).	235
Figure S1. 6. Viability of P1 et 2 stained with SYTOX Green (A) after 3-month DA and (B) after five days of re-illumination.....	236
Figure S1. 7. DNA stained with SYBR Green fluorescence pattern of P2.	236
Figure S1. 8. Decrease of the FSC and red fluorescence of P2 cells during RL. The four panels are cytograms selected from all those available and deemed relevant to visually illustrate P2 degradation during RL. Cal. beads = calibration beads. Relative units (r.u.).	237
Figure S1. 9. Appearance and development of the P3 population (blue) during DA..	238

Figure S1. 10. Cytogram showing no differences between P1 and 3 in terms of FSC and red fluorescence at day 87 of DA. Relative units (r.u.).....	239
Figure S1. 11. Cytograms showing P3 red fluorescence and FSC decreasing 24 h after RL, rejoining progressively the P2 population. Relative units (r.u.).....	239
Figure S1. 12. Degradation of the P3 population (blue) during RL.	240
Figure S1. 13. Average cell pigment contents during the 3-month DA. (A) Chlorophyll <i>a</i> (solid line) and fucoxanthin (dashed line). (B). β -carotenes. (C). Diadinoxanthin (solid line) and Chlorophyll <i>c</i> (dashed line). Each point is the mean of the three biological replicates (n = 3) with their standard deviation as the error bars.	241
Figure S3. 1. Schematic representation of chrysolaminarin metabolism, gluconeogenesis and glycolysis. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 1. P: phosphate.	242
Figure S3. 2. Representation of steps allowing pyruvate and phosphoenolpyruvate into the TCA.	249
Figure S3. 3. Schematic representation of pentose phosphate pathway.	250
Figure S3. 4. Representation of Entner-Doudoroff pathway last step.	252
Figure S3. 6. Schematic representation of the steps allowing the production of acetyl-CoA.....	255
Figure S3. 7. Schematic representation of FASII.	257
Figure S3. 8. Schematic representation of the procaryotic pathway of glycerolipids synthesis.	259
Figure S3. 9. Schematic representation of the eukaryotic pathway of glycerolipids synthesis.	262
Figure S3. 10. Schematic representation of lipolysis.	264
Figure S3. 11. Schematic representation of steps linking glycerolipid and carbohydrate metabolisms <i>via</i> glycerol-3-phosphate.	266
Figure S3. 12. Schematic representation of the β -oxidation.....	268
Figure S3. 13. Schematic representation of the known steps of phenylalanine and tyrosine catabolism.....	270
Figure S3. 14. Schematic representation of histidine catabolism.	271
Figure S3. 15. Schematic representation of alanine catabolism.	271

Figure S3. 16. Schematic representation of asparagine and aspartate catabolism.....	272
Figure S3. 17. Schematic representation of arginine and proline catabolism.	273
Figure S3. 18. Schematic representation of glutamine and glutamate catabolism.	274
Figure S3. 19. Schematic representation of the hypothetic lysine catabolism.	276
Figure S3. 20. Schematic representation of the methionine catabolism.....	277
Figure S3. 21. Schematic representation of cysteine catabolism.....	278
Figure S3. 22. Schematic representation of serine, glycine, and tryptophan catabolism.	280
Figure S4. 1. Exemple de cytogrammes présentant les bactéries et les levures d'un échantillon marqué au SYBR Green (culture n°3 au jour 42). La fluorescence rouge des bactéries et levures sur le cytogramme de gauche est due au marquage au SYBR Green (Unités relatives : r.u.).	284
Figure S4. 2. Distribution de taille des particules dans les cylindres n°2 (à gauche) et n°3 (à droite) estimées avec le Multisizer 4.....	286
Figure S4. 3. Courbes de distribution de tailles obtenues avec le Multisizer 4.....	286
Figure S4. 4. Viabilité moyenne des cultures estimée par cytométrie en flux après marquage au SYTOX Green (n = 9). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.....	287
Figure S4. 5. Concentrations cellulaires moyenne obtenues par CMF (n = 9).....	287
Figure S4. 6. Concentration en nitrates dans le milieu de culture pendant l'acclimatation au noir de trois mois.	288

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des paramètres suivis pendant les expériences.....	37
Table 1.1. Average viability, survival rate and growth parameters upon re-illumination. Each point is the mean of technical replicates of the three biological replicates (n = 9) ± standard deviation.....	51
Table 1. 2. Prior to experiments, <i>F. cylindrus</i> cells were maintained in stable semi-continuous culture conditions and cultivated in incremental volumes to reach a final volume of 80 L of acclimated culture in each cylinder.	68
Table 1.3. Sampling timeline for each of the two experiment phases of the three DA. For RL, the sampling times mentioned are the times since re-illumination. In each experiment, the light system was started 24 hours after the last sampling time of DA.	71
Tableau 2.1. Estimés des rendements énergétiques (nombres de molécules) générés par l'oxydation des acides aminés chez <i>A. thaliana</i> . D'après Hildebrandt et al. (2015).	102
Table 3.1. Cell harvesting method.	129
Table 3.2. Number of genes overexpressed at given numbers of sampling points between day 6 to 3 months (example: among all genes retained by the analysis, 23 genes were overexpressed at all five sampling points).	134
Table 3.3. Expression patterns of genes involved in chrysolaminarin degradation, glycolysis and PPP which were not downregulated immediately after the third day of darkness.	138
Tableau 4.1. Fréquence d'échantillonnage des différents paramètres étudiés. Le nombre d'échantillonnages total réalisé pour chaque paramètre est indiqué dans la dernière colonne.	192
Tableau 4.2. Composition détaillée du tampon d'extraction des protéines 1 X.....	193
Table S3. 1. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the chrysolaminarin metabolism, gluconeogenesis and glycolysis.	243
Table S3. 2. Differential expression analysis of genes encoding proteins allowing the entrance of pyruvate and phosphoenolpyruvate into the TCA.	249
Table S3. 3. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the pentose phosphate pathway.	251
Table S3. 4. Differential expression analysis of the gene encoding the key step in Entner-Doudoroff pathway.....	252

Table S3. 5. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in the synthesis of sugar moieties used in exopolysaccharides synthesis.....	252
Table S3. 6. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in acetyl-CoA synthesis.	255
Table S3. 7. Differential expression analysis of genes encoding proteins belonging to FASII.	258
Table S3. 8. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the prokaryotic pathway of glycerolipids synthesis.	260
Table S3. 9. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the eukaryotic pathway of glycerolipids synthesis.....	263
Table S3. 10. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the lipolysis.	265
Table S3. 11. Differential expression analysis of genes encoding proteins allowing the reverse conversion of glycerol to dihydroxyacetone phosphate <i>via</i> glycerol-3-phosphate.	267
Table S3. 12. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in β -oxidation.	269
Table S3. 13. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in phenylalanine and tyrosine catabolism.....	270
Table S3. 14. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in histidine catabolism.	271
Table S3. 15. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in alanine catabolism.	271
Table S3. 16. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in asparagine and aspartate catabolism.....	272
Table S3. 17. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in arginine and proline catabolism.....	273
Table S3. 18. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in glutamine and glutamate catabolism.	274
Table S3. 19. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in lysine catabolism.	276

Table S3. 20. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in methionine catabolism.....	277
Table S3. 21. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in cysteine catabolism.....	278
Table S3. 22. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in serine, glycine, and tryptophan catabolism.	281
Table S3. 23. Differential expression analysis of candidate genes encoding proteins of autophagy.	283
Tableau S4. 1. Pourcentage de contamination bactérienne et par les levures dans les trois cultures	285

Liste des abréviations

Abréviations (anglais s'il y a lieu)	Signification (termes anglais en italique)
ACP	<i>Acyl carrier protein</i> (protéine porteuse d'acyle)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATG	Autophagy
ATP	Adénosine triphosphate
BCAA	<i>Branched-chain amino acid</i> (acides aminés ramifiés)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> (pas d'équivalent français)
BCKDH	<i>Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex</i> (Complexe 3-méthyl-2-oxobutanoate déshydrogénase)
C	Carbone
CDP	Cytidine diphosphate diacylglycérol
CH	Carbohydrates
chl	Chlorophylle
CHY	Chrysolaminarine
CMF (FCM)	Cytométrie en flux
CO ₂	Dioxyde de carbone
CoA	Coenzyme A
COD (COD)	Carbone organique dissous
DA	<i>Long term darkness acclimation</i> (acclimatation à l'obscurité prolongée)
DAG	Diglycéride
DD	Diadinoxanthine
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DGTA alanine	Diacylglycéryl hydroxyméthyltriméthyl-β-
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DT	Diatoxanthine
ED	Entner-Doudoroff
EPS	Exopolysaccharides
FA	<i>Fatty acid</i> (acide gras)
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FAS gras)	<i>Fatty acid synthesis</i> (synthèse des acides
FSC	<i>Forward scatter</i> (diffusion en avant)
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GABA	Acide γ-aminobutyrique
Glk	Glucokinase

HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (chromatographie en phase liquide à haute performance)
ID	Identifiant
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
KDPG	<i>2-keto-deoxy-6-phosphogluconate</i> (2-céto-désoxy-6-phosphogluconate)
3-	
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> (chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse)
LD	<i>Lipid droplet</i> (gouttelette lipidique)
LP-	Lysophatidyl-
LPL	Lysophospholipides
MAG	Monoglycérade
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
N	Azote
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide
phosphate	
NL	<i>Neutral lipids</i> (lipides neutres)
NPQ	<i>Quenching Non Photochimique</i> (extinction photochimique)
non	
P	Phosphate
PA	Phosphatidic acid (acide phosphatisique)
PC	Phosphatidylcholine
PDC	<i>Pyruvate dehydrogenase complex</i> (complexe pyruvate déshydrogénase)
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol phosphate
PL	Phospholipides
PPP	<i>Pentose phosphate pathway</i> (voie des pentoses phosphates)
PS	Phosphatidylsérine
PSII	Photosystème II
RC	<i>Resting cell</i> (pas d'équivalent français)
RE	Réticulum endoplasmique
RL	Retour à la lumière
RNAseq	<i>RNA sequencing</i> (séquençage de l'ARN)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espèce réactive d'oxygène)
RS	<i>Resting spore</i> (spore)
Rubisco	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
TAG	Triglycérade
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i> (acide tricarboxylique)
UDP	Uridine-diphosphate

VC

Vegetative cell (cellule végétative)

Je me souviens d'une conversation lors de laquelle nous débattions de la faisabilité et de l'intérêt d'étudier la nuit polaire,

Jean-Paul Sartre, campé sur ses positions, soutenait :

« Plus claire la lumière, plus sombre l'obscurité... Il est impossible d'apprécier correctement la lumière sans connaître les ténèbres. »

faisant évidemment référence au fait que jusqu'il y a peu, la nuit polaire, période « morte », a été ignorée par la communauté scientifique, mais qu'aujourd'hui, il est évident qu'il faille l'étudier pour comprendre les écosystèmes polaires dans leur globalité.

Alexis Carrel était d'accord avec J-P et soulignait que :

« La difficulté ou l'obscurité d'un sujet n'est pas une raison suffisante pour le négliger. »

évoquant lui le fait que c'est pas parce qu'on y voit rien que c'est une raison pour se laisser abattre et ne pas aller aux pôles en hiver.

Raymond Devos était lui beaucoup plus pessimiste et affirmait :

« On ne sait plus ce que c'est que l'obscurité. A force de vouloir faire la lumière sur tout, on ne distingue plus rien ! »

camouflant en réalité maladroitement sa peur du noir

Finalement, mon ami Paulo, le plus pragmatique de tous, s'exclama soudain, complètement hors sujet :

« C'est quand même formidable la recherche fondamentale, c'est le seul milieu où on peut passer nos journées à étudier des phénomènes dont 99% de la population ignore jusqu'à l'existence même ! »

mettant ainsi fin au débat, et une nouvelle tournée en mouvement.

Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu Marcel Babin et Chris Bowler qui m'ont permis de travailler au sein d'un projet au sujet si passionnant.

Je remercie également Messieurs Éric Maréchal et Benoît Schoefs qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Mesdames Connie Lovejoy et Jacqui Shykoff, et Messieurs Benjamin Bailleul et François-Yves Bouget, qui ont accepté d'être examinateurs. Je remercie aussi les membres de mes comités de thèse et séminaires pour le temps qu'ils m'ont accordé et leurs précieux conseils.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à tous les membres des équipes de Takuvik, du groupe Bowler et des équipes associées au projet *Green Life in the Dark*, qui ont, en participant de près ou de loin, permis la réalisation d'un projet si ambitieux. Je remercie en particulier Marie-Hélène Forget pour le soutien qu'elle m'a apporté dans bien des domaines tout au long de ma thèse. Merci également à Marianne Potvin et Dominique Marie qui m'ont aidé à la réalisation des analyses de cytométrie, à Philippe Massicotte pour avoir partagé avec moi ses connaissances en statistiques et en codes informatiques (ainsi que musicales !), ainsi qu'à Thomas Lacour et Martine Lizotte pour leurs relectures et conseils toujours pertinents. Je n'oublie pas tous les membres de l'administration qui ont facilités les nombreuses démarches nécessaires à la mise en place d'une thèse en cotutelle.

En amitié, il y a certaines rencontres que l'on n'oublie pas. J'ai eu la chance d'en faire de nombreuses ces dernières années, que ce soit dans le cadre de mon travail ou à l'extérieur, et que ce soit à Québec, à Paris ou à Villefranche. Je voudrais donc profiter de l'occasion pour souhaiter le meilleur à chacune de ces personnes, dont les aventures partagées ont ponctué mon parcours. J'ai une pensée plus particulière pour Pauline, Loïc et Déborah qui ont si souvent pris place sur ma terrasse à Québec, Peter, Antoine et Mattheus avec qui nous avons écumé les rues de Pigalle, ainsi que mes voisins de la vieille ville de Villefranche, sans qui ces dernières années, si particulières, auraient été parfois beaucoup plus moroses. Évidemment, un petit mot destiné spécialement à Marin qui, malgré ses

difficultés, a toujours su garder sa joie de vivre et m'a conservé son indéfectible amitié : cher ami, je t'attends de pieds fermes à la fin de ton post-doc.

Je remercie également Charlotte, Jean-Charles, Mr Pierre et Danielle, Pauline, et Alison, qui m'ont chaleureusement accueilli en leurs demeures ces cinq dernières années. J'en conserve des souvenirs indélébiles.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, Noémie et le reste de ma famille, dont le soutien inconditionnel m'a permis d'aller au bout de mon travail, et ce quel que soient les difficultés rencontrées.

PS : j'ai une dernière pensée pour les groupes de musique suédois qui ont popularisé le death métal mélodique, Coluche, et la personne qui a inventé l'apéritif, sans les œuvres desquels ma vie de thésard n'aurait pas été la même.

Avant-propos

Cette thèse a pour but de présenter les résultats récoltés au cours du doctorat. Elle est composée d'une introduction générale, de quatre chapitres et d'une conclusion. La langue principale de rédaction est le français mais le premier et le troisième chapitres, dont les travaux sont respectivement publiés et destinés à être soumis, ont été rédigés en anglais.

Référence de l'article publié associé au travail présenté dans le premier chapitre :

The possible fates of *Fragilariopsis cylindrus* (polar diatom) cells exposed to prolonged darkness. Théo Sciandra, Marie-Hélène Forget, Flavienne Bruyant, Marine Béguin, Thomas Lacour, Chris Bowler, Marcel Babin. Publié le 6 janvier 2022 par *Journal of Phycology* via Wiley Online Library (<https://doi.org/10.1111/jpy.13232>). Pour ce chapitre, j'ai mis en place les protocoles de cytométrie et effectué les mesures. J'ai également analysé et mis en forme les données. J'ai finalement rédigé le document. Marie-Hélène a aidé à coordonner le projet et à la récolte des données. Flavienne Bruyant et Marine Béguin ont eu la charge de la préparation et de l'acclimatation des cultures ainsi que des mesures autres que les mesures de cytométrie. Thomas Lacour a aidé à l'écriture du projet et à la révision du document. Chris Bowler et Marcel Babin ont écrit et coordonné le projet, et ont participé à la révision du document.

Mes recherches, financées par Marcel Babin, ont été rendues possibles grâce à la bourse Human Frontier Science Program qu'il a obtenu conjointement avec Chris Bowler pour réaliser le projet *Green Life in the Dark*. Elles ont également bénéficié du support financier de la Chaire d'excellence en recherche du Canada en télédétection de la nouvelle frontière Arctique de Marcel Babin, d'ArcticNet, du programme Sentinelle Nord de l'Université Laval, et du Fonds d'Excellence en Recherche Apogée Canada. En outre, la formation que j'ai suivie au NCMA (Bigelow, ME, USA) pour étudier les méthodes de cultures en grands volumes a été permise par les soutiens financiers de la bourse Human Frontier Science Program, du FQRNT et de Québec Océan. Un financement FRQNT octroyé à l'Unité Mixte Internationale Takuvik (# 203208) a permis de compléter ma bourse doctorale lors de mon séjour à Paris.

Introduction

Régime lumineux et production primaire aux pôles

Les zones polaires se différencient des autres écosystèmes marins par la présence de la banquise et d'un cycle annuel de lumière unique. Ces caractéristiques ont une influence majeure sur la transmission de l'énergie lumineuse à l'océan et, par conséquent, sur sa disponibilité pour les organismes autotrophes. Aux hautes latitudes, particulièrement en Arctique, l'inclinaison de l'axe de rotation de la Terre modifie directement les variations saisonnières de la qualité et la quantité de la lumière qui atteint la surface de l'eau (Fig. 1). Ainsi, au-delà du cercle polaire, les écosystèmes sont assujettis en hiver à une période plus ou moins longue d'obscurité (i.e., nuit polaire), à une période de jour continu en été et à un changement rapide de la photopériode et de l'intensité lumineuse entre ces deux saisons (Fig. 2).

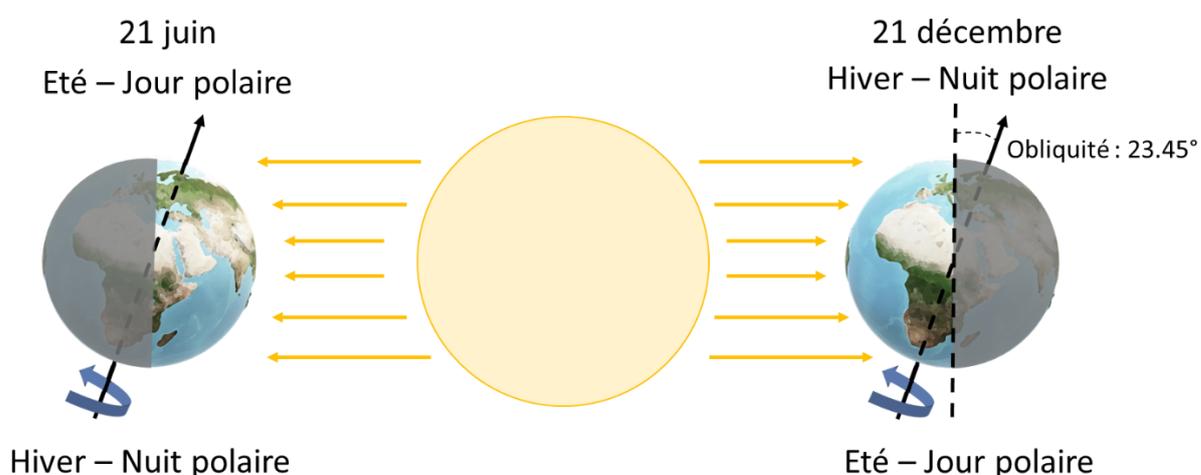


Figure 1. Schéma de la variation saisonnière de l'exposition des zones polaires au rayonnement solaire résultant de l'angle entre l'axe de rotation de la Terre et la perpendiculaire à son plan orbital.

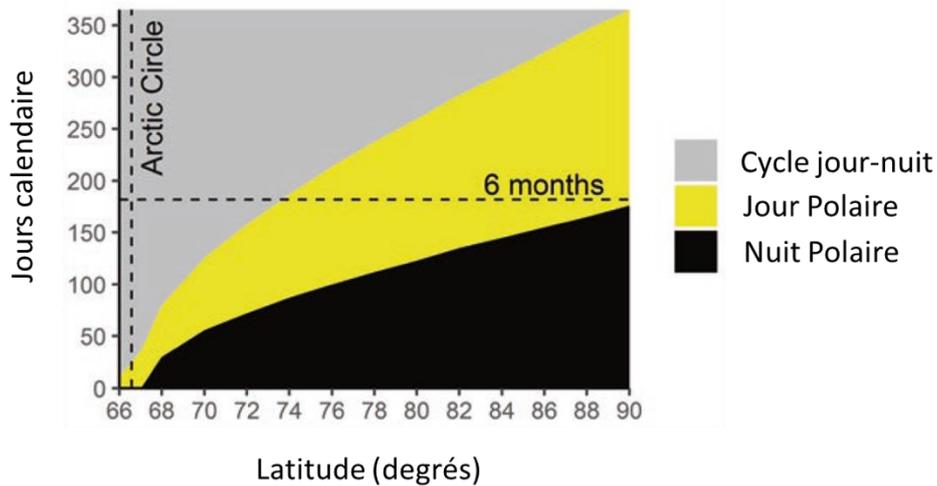


Figure 2. Régime lumineux des zones polaires au cours d’une année en fonction de la latitude. Le jour polaire et la nuit polaire sont ici définis comme les périodes pendant lesquelles le soleil demeure respectivement au-dessus et en dessous de l’horizon. Le cercle arctique, situé au-dessus de 66° nord, est le parallèle se trouvant à la latitude la plus basse à laquelle on peut observer la nuit polaire. Modifiée à partir de Cohen et al. 2020.

Par ailleurs, la dynamique de la banquise ainsi que celle des précipitations, elles-mêmes dépendantes de divers paramètres environnementaux physico-chimiques, affectent aussi les écosystèmes marins. La banquise atténue la pénétration du rayonnement solaire à l’interface eau-atmosphère (McMinn et al. 1999). Par conséquent, les mécanismes impliqués dans la formation ou la disparition du couvert de glace affectent également l’énergie radiative disponible. À ces processus, agissant à grande et moyenne échelles spatio-temporelles, s’ajoute l’influence du mélange vertical de la colonne d’eau qui se manifeste parfois par des épisodes beaucoup plus localisés dans le temps et l’espace. Ces épisodes de mélange fréquents (Martinson et Steele 2001), qui résultent de l’augmentation de la salinité de l’eau due à la formation de la banquise, peuvent exporter des masses d’eau et les organismes qu’elles contiennent en profondeur (Cullen et Lewis 1988). Notons qu’avec le recul du couvert de glace, ces épisodes pourraient devenir de plus en plus fréquents, exposant d’avantage de surface d’eau libre à l’influence du vent (Martin et al. 2014). Parfois piégées dans la zone aphotique pour des périodes allant de quelques jours à plusieurs années, les microalgues peuvent soudainement être remises en suspension sous l’action du mélange vertical ou des remontées d’eau (*upwellings*), et être ainsi réexposées à la lumière en surface.

Tous ces changements du régime lumineux, qu'ils soient saisonniers ou bien imprévisibles car épisodiques, représentent un défi de taille pour les microalgues photosynthétiques. En particulier, les périodes d'obscurité prolongées mettent à rude épreuve leurs capacités d'acclimatation, ainsi que le retour à la lumière qui peut être plus ou moins rapide (ouverture soudaine de la banquise vs fonte progressive) et qui leur impose un stress considérable.

A très haute latitude, bien que la photosynthèse soit impossible ou très limitée une grande partie de l'année, les eucaryotes phototrophes assurent la majorité de la production primaire, principalement au moment du *bloom* annuel (Perrette et al. 2011). La floraison est déclenchée à la fin du printemps, après que le mélange hivernal a levé la limitation en nutriments engendrée par le *bloom* de l'année précédente, et lorsque la lumière redevient disponible. Les microalgues sympagiques (i.e., qui se développent dans et sous la glace de mer) sont les premières à en bénéficier. Le *bloom* phytoplanctonique se poursuit ensuite dans la colonne d'eau lorsque la fonte du manteau neigeux et l'altération de la banquise permettent au rayonnement de se propager plus en profondeur, et lorsque l'apport d'eau douce permet la stratification de la colonne d'eau (Arrigo et Dijken 2004 ; Hsiao 1992 ; voir aussi Leu et al. 2015) (Fig. 3). Ces *blooms* sont, en termes d'abondance et de biomasse, très largement dominés par des microalgues appartenant au groupe des diatomées, et plus particulièrement par des représentants des genres *Thalassiosira*, *Chaetoceros*, *Fragilariopsis*, *Nitzschia* et *Fossula*. Seule la prymnésiofycée *Phaeocystis pouchetii*, membre de la division des Haptophytes, rivalise très souvent avec les diatomées en matière d'abondance (Booth et Horner 1997 ; Degerlund et Eilertsen 2010 et références associées ; von Quillfeldt 2000).

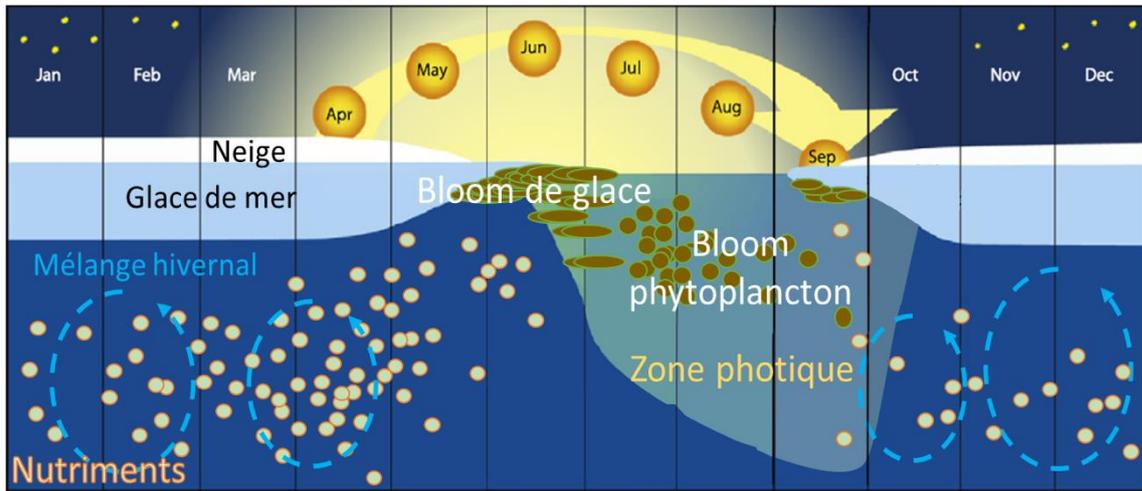


Figure 3. Cycle de la production primaire autotrophe annuelle dans les zones polaires recouvertes par une banquise hivernale. En hiver, la formation de la glace accompagne le refroidissement des eaux de surface dans lesquelles elle relargue du sel. Cela a pour conséquence d'augmenter la densité des eaux de surface qui, en coulant, enclenchent le mélange hivernal. Ce dernier permet la remontée des nutriments piégés en dessous de la pycnocline à la fin de l'été. La remontée des températures au printemps provoque la fonte de la neige et de la glace de mer et déclenche la production primaire nouvelle. Les algues sympagiques, majoritairement représentées par les diatomées pennées, les premières à bénéficier de la disponibilité nouvelle de la lumière, forment des efflorescences importantes sous la glace. La fonte a également pour effet de libérer de l'eau douce et de réchauffer les eaux de surface. Ceci provoque une stratification qui autorise la formation de *blooms* phytoplanctoniques (souvent majoritairement formés de diatomées centriques) d'autant plus rapidement que la glace fond et que la lumière se propage dans la colonne d'eau. Au cours de l'été, la colonne d'eau se stratifie davantage, et les nutriments commencent à se raréfier, limitant la production primaire. La composition des communautés phytoplanctoniques change au profit de communautés dominées par des espèces autotrophes de plus petites tailles, et d'une production primaire majoritairement régénérée, avant que ces dernières ne cèdent finalement la place à des communautés majoritairement hétérotrophes. Aux basses latitudes des zones polaires, lorsque la glace commence à se reformer en automne et que le mélange hivernal reprend, certaines zones restent encore suffisamment éclairées pour qu'un second *bloom* d'algues sympagiques se produise, de moindre amplitude cependant. Adaptée de Wassmann (2011).

Pour pouvoir s'adapter à un environnement aux conditions extrêmes de lumière, de salinité et de température, caractérisées par des changements rapides, imprévisibles et de grandes amplitudes, les algues polaires ont dû se doter de capacités d'acclimatation

remarquables propres à leur niche écologique (Lyon et Mock 2014). Le plus grand mystère qui entoure le cycle biologique des microalgues polaires reste sans aucun doute leur capacité à survivre, chaque année, lorsqu'elles sont privées de lumière pendant plusieurs mois. Chez les organismes phototrophes, les variations de nombreux facteurs environnementaux, dont la photopériode, l'intensité ou la qualité de la lumière, sont accompagnées d'ajustements physiologiques rapides (quelques générations pour les plus longs) grâce à un certain nombre de processus regroupés sous le terme de photoacclimatation (Falkowski et Laroche 1991 ; MacIntyre et al. 2002). Ces ajustements permettent une exploitation optimale du rayonnement pour la photosynthèse, en particulier quand il est faible. Ils permettent également aux cellules de se protéger d'une exposition à des éclaircements excessifs susceptibles de provoquer des dommages cellulaires pouvant conduire à la photoinhibition. Néanmoins, les mécanismes de photoacclimatation n'expliquent pas la capacité de survie des microalgues polaires en absence totale de lumière durant une longue période.

La capacité des microalgues à survivre à des périodes d'obscurité allant de plusieurs semaines à plusieurs mois, ainsi que celle à recouvrer leur croissance lorsque qu'elles sont exposées à nouveau à la lumière, a été constatée chez de nombreux groupes phytoplanctoniques, et en particulier chez les diatomées polaires (Kennedy et al. 2019 ; Lacour et al. 2019 ; Morin et al. 2019 ; voir aussi Tableau 1 de Wulff et al. 2008). Ces microalgues, connues pour se développer dans les zones riches en nutriments, froides et où l'éclaircissement est souvent limité (peu éclairées ou turbulentes ; Gosselin et al. 1986 ; Lavaud et al. 2007 ; Margalef 1978), dominent la biomasse autotrophe aux pôles, notamment au moment de l'initiation des *blooms* de banquise (Poulin et al. 2011 ; von Quillfeldt 2000) qui intervient à la fin de la nuit polaire, au moment où l'intensité lumineuse reste encore faible (Wassmann 2011).

Les diatomées

Origines

Les diatomées sont des eucaryotes unicellulaires photosynthétiques qui forment, au sein des microalgues, le groupe monophylétique des *Bacillariophyta*. Les premiers

représentants de cette embranchement, issu du sous-règne des Straménopiles et du règne des Chromoalvéolés, seraient apparus il y a 180 à 250 Ma (Medlin et al. 2000 ; Sorhannus 2007). Les estimations du nombre d'espèces de diatomées existantes varient largement d'une étude à l'autre. Certains l'estiment à plusieurs dizaines de milliers (20 000 espèces selon Guiry et al. 2012), tandis que d'autres l'estiment à plusieurs centaines de milliers (200 000 espèces selon Mann et Droop 1996). De nos jours, un peu plus de 10 000 espèces de diatomées ont été décrites.

Sur la base de différences morphologiques, les diatomées ont été divisées en trois classes. La classe des *Coscinodiscophyceae* constitue un premier groupe qui est celui des diatomées centrales (à symétrie radiale). Les cellules des deux autres classes, qui appartiennent au groupe des diatomées pennées (à symétrie bilatérale), se différencient par la présence (espèces raphées : classe des *Bacillariophyceae*) ou non (espèces araphides : classe des *Fragilariophyceae*) d'un raphé à la surface de leur thèque (Fig. 4). Le raphé est une strie qui parcourt les cellules dans leur longueur. Chez certaines espèces se développant sur un substrat, il joue un rôle dans leur communication avec le milieu extérieur et dans leur locomotion.

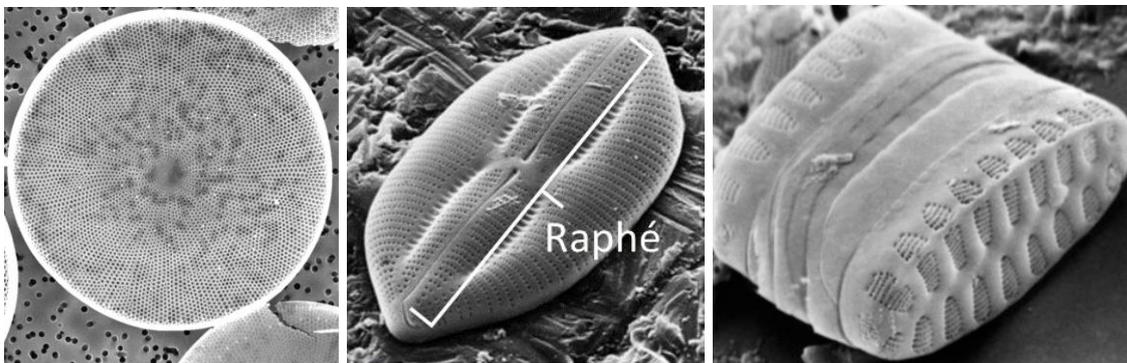


Figure 4. Photos de microscopie électronique d'un représentant de chacune des trois classes de diatomées (centrique, pennée raphée, pennée araphide). Photo 1 tirée de De Stephano et al. (2007), photo 2 et 3 postées par D.G Mann (2008) sur internet.

La reconstitution partielle de l'histoire évolutive des diatomées (et des microalgues d'une manière générale) a permis d'établir qu'elles sont apparues à la suite d'événements d'endosymbiose successifs (Falkowski et al. 2004) dont le premier a vu un hôte hétérotrophe phagocyter une cyanobactérie (bactérie photosynthétique), et conserver certaines de ses caractéristiques dont celle de faire de la photosynthèse (Fig. 5). Après la

diversification des formes centriques, les diatomées pennées araphides, puis les diatomées pennées raphides, seraient apparues il y a 120 à 150 millions d'années (Nakov et al. 2018). L'apparition du raphé chez ce dernier groupe aurait participé à son succès écologique et à son importante diversification, en lui permettant notamment de coloniser de nouvelles niches écologiques (benthos, banquise) jusque-là inexploitées par les diatomées. Au fil de l'évolution, les diatomées, en se diversifiant, ont pu perdre ou conserver certaines caractéristiques de l'hôte hétérotrophe. Leur *pool* génétique, également enrichi par le biais de transferts latéraux de gènes bactériens, en fait des organismes tout à fait uniques (Armbrust et al. 2004 ; Bowler et al. 2008). Selon les études de Dorrell et al. (2021) et de Basu et al. (2017), 2 à 6 % des gènes de diatomées seraient d'origine bactérienne.

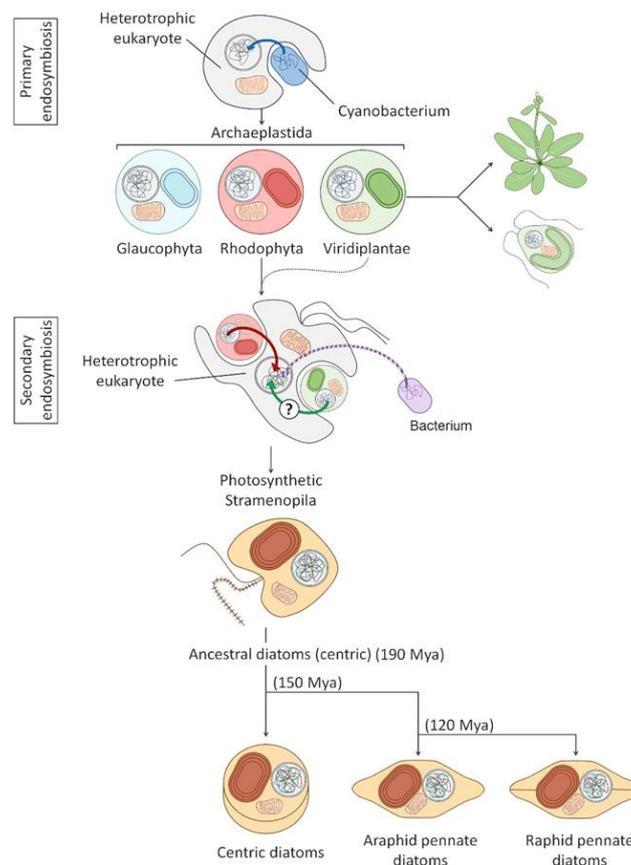


Figure 5. Représentation schématique des événements d'endosymbiose et d'échanges de matériel génétique (parfois hypothétiques) intervenus dans les étapes évolutives ayant conduit à l'apparition des diatomées. Tirée de Falciatore et al. 2020.

Morphologie et cycle de vie

Les diatomées mesurent pour la plupart entre 20 et 200 μm . Mais certaines peuvent ne mesurer que quelques μm tandis que d'autres peuvent atteindre 2 mm de diamètre. Les cellules sont souvent trouvées isolées mais certaines forment des chaînes de plusieurs millimètres. Les diatomées se distinguent des autres groupes de microalgues par la possession d'une thèque de silice biogénique, appelé frustule. Ce dernier, associé à une matrice organique, est percé de pores de quelques dizaines de nanomètres appelés areola, qui permettent la communication avec le milieu environnant. Le frustule se compose de deux valves imbriquées l'une dans l'autre à la manière d'une boîte de Petri. L'épivalve (grande valve) et l'hypovalve (petite valve) sont liées par une ou plusieurs bandes siliceuses appelées segments cingulaires. Lors de la reproduction asexuée, chacune des deux cellules filles hérite de l'une ou l'autre des valves qui constitueront leur épivalves. Dans la nature, la taille des cellules diminue donc à la suite de multiples cycles mitotiques, mais peut être réinitialisée grâce à la reproduction sexuée. Au cours de celle-ci, l'association des gamètes précède la formation d'une grande cellule sphérique couverte d'une membrane organique appelée auxospore. Cette cellule produira une nouvelle cellule végétative de taille maximale qui pourra se diviser de manière asexuée (Fig. 6).

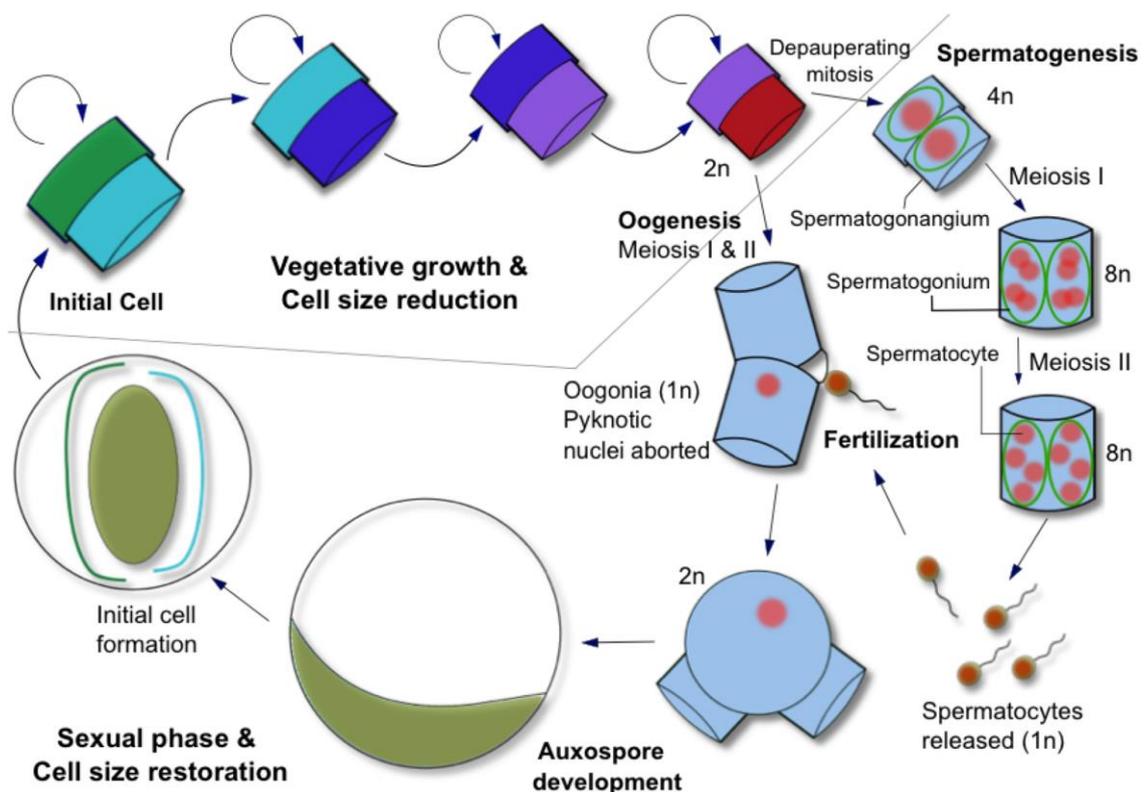


Figure 6. Cycle de vie des diatomées centriques. Le cycle de vie des diatomées pennées diffère de celui des centriques (représenté ici) par l'emploi de l'isogamie plutôt que de l'oogamie. Schéma tiré de Moore et al. (2017).

Répartition et importance écologique

Les diatomées sont ubiquistes et peuvent être trouvées dans les environnements marins et dulcicoles. On les trouve dans la colonne d'eau (phytoplancton), à la surface ou à l'intérieur des sédiments (phytobenthos), ou encore dans et sous la banquise dans les zones polaires (algues sympagiques). Leur taux de croissance élevé, associé à une taille relativement importante, leur offre un avantage dans les zones riches où les nutriments abondent, comme les zones côtières ou les zones d'*upwelling*. Caractérisées par des constantes de demi-saturation de la photosynthèse relativement basses, elles sont également plus compétitives que la majorité des autres groupes d'algues dans l'exploitation de faibles intensités lumineuses. C'est une des raisons pour lesquelles elles dominent très régulièrement les efflorescences printanières formées lorsque la colonne d'eau commence à se stratifier après avoir été enrichie en nutriments par le mélange hivernal. C'est notamment le cas aux hautes latitudes où les diatomées assurent la majeure partie de la production primaire marine annuelle (Gosselin et al. 1997) (Fig. 7). A l'échelle globale, elles contribuent à hauteur de 30 à 40 % de la production totale dans l'océan, et participent donc largement aux cycles biogéochimiques dans les zones océaniques où elles abondent (voir Uitz et al. 2010 ; Vancoppenolle et al. 2013). Leur taille importante et le poids de leur frustule qui leur confèrent une vitesse de sédimentation rapide, leur permet de jouer un rôle important dans la pompe à carbone biologique.

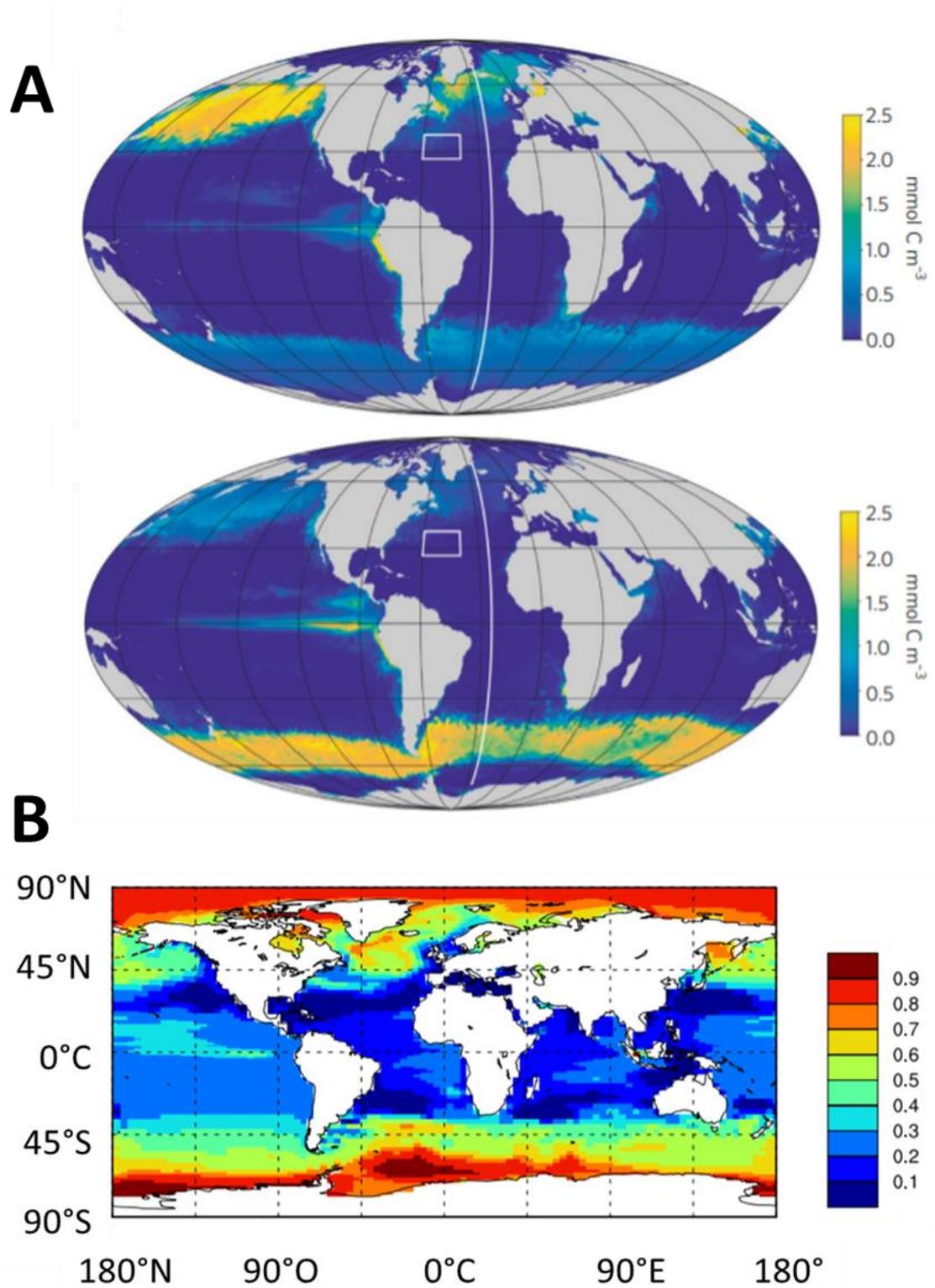


Figure 7. (A) Concentration des diatomées dans les eaux de surface entre avril et juin (en haut) et octobre et décembre (en bas) estimée par modélisation. Tirée de Tréguer et al. 2018. (B) Abondance relative des diatomées par rapport à la biomasse totale du phytoplancton entre 1980 et 1999 estimée par modélisation. Tirée de Marinov et al. (2010).

Succès écologique

La diversification des diatomées pourrait avoir bénéficié d'un évènement d'extinction de masse survenu il y a 250 Ma (Medlin et al. 1997). Par la suite, l'apparition du frustule leur aurait conféré de nombreux atouts : (1) une résistance mécanique qui, associée à la possibilité pour certaines diatomées de former des chaînes, leur permettrait de se protéger de certains prédateurs ; (2) une barrière permettant de filtrer les UV (Carreto et Carignan 2011) ; (3) un tampon pH facilitant la conversion du bicarbonate en dioxyde de carbone (CO₂) (Milligan et Morel 2002) ; (4) une efficacité accrue d'absorption de la lumière (Roman et al. 2015).

S'ajoute à cela la capacité, chez certaines diatomées confrontées à des conditions de croissance défavorables, de produire des formes de résistance. Il a été rapporté que ces formes pouvaient rester viables plusieurs dizaines d'années avant de retourner à un état végétatif. Des cellules de diatomées ont ainsi pu reprendre leur croissance après avoir été conservées plus de cent ans dans les sédiments d'un fjord (Härnström et al. 2011). Chez certaines espèces, la formation de cellules de résistance en réponse à un stress peut également être précédée d'un évènement de reproduction sexuée (French et Hargraves 1985). Dans ce cas, la cellule de résistance se forme dans l'auxospore, ce qui permettrait, en plus de protéger la cellule, un brassage génétique offrant de meilleures chances de survie à la population lors de sa reprise d'activité. Un évènement de reproduction sexuée seul peut également être induit lors d'un stress.

Enfin, il faut mentionner que les diatomées possèdent un potentiel hétérotrophe plus ou moins développé selon les espèces (Lewin 1953 ; Lewin et Hellebust 1970 ; Palmisano et Sullivan 1982), potentiel qu'elles ont pu hériter d'un ancêtre hétérotrophe, ou acquérir à l'occasion de transferts latéraux de gènes (Bowler et al. 2008 ; Dorrell et al. 2021). Ces capacités à venir compléter le métabolisme autotrophe, ou à se substituer à ce dernier sous certaines conditions de croissance, offrent une dernière arme de poids à certains représentants de ce groupe.

Stratégies de survie à l'obscurité prolongée chez les diatomées

Les stratégies impliquées dans la survie des microalgues à des périodes d'obscurité prolongées sont souvent classées en trois ou quatre types, pouvant différer selon les auteurs. Parmi ceux-ci figurent la formation et la consommation de réserves intracellulaires, l'hétérotrophie, le développement de formes cellulaires résistantes et la réduction du métabolisme. Dans cette thèse, nous ne considérerons que les trois premières stratégies comme étant des stratégies à part entière (mais qui ne sont pas mutuellement exclusives pour autant). La réduction du métabolisme ne devrait en effet pas suffire à elle seule pour permettre la survie. Il apparaît évident que les algues placées à l'obscurité pour de longues périodes, ne peuvent pas, pour survivre, se contenter de ralentir leur métabolisme sans en changer le fonctionnement. En revanche, on peut aisément supposer que ce ralentissement doit systématiquement accompagner les trois autres stratégies. Dans l'hypothèse où les algues utilisent leurs réserves pour survivre, leur taux de consommation doit être maintenu au minimum pour leur permettre de survivre le plus longtemps possible. Les cellules de résistance étant en dormance, leur formation s'accompagne par définition d'un ralentissement de leur métabolisme. En ce qui concerne l'hétérotrophie, l'absence de référence faisant état de diatomées autotrophes capables d'une croissance à l'obscurité au moins aussi rapide que celle observée à la lumière nous conduit à considérer ce mode de nutrition comme secondaire chez ces organismes.

Bien que cette thèse ne se soit pas focalisée sur chacune de ces stratégies, l'état actuel de leurs connaissances sera néanmoins dressé pour fournir une vue d'ensemble de l'état de l'art. En raison du rôle central rempli par la machinerie photosynthétique dans le métabolisme cellulaire, tout changement des conditions de croissance peut entraîner son remaniement. Cela nous permet d'affirmer que certaines modifications de la photophysologie interviennent nécessairement dans chacune des trois stratégies de survie, que ce soit à l'obscurité ou au retour à la lumière. Cependant, la photosynthèse n'intervenant pas à l'obscurité, on peut s'attendre à ce que ces ajustements soient indépendants de la stratégie adoptée. On leur consacra donc un quatrième volet.

Dans les parties suivantes, je dresse une revue des travaux de la littérature qui ont enrichi nos connaissances sur chacune des stratégies. La quasi-totalité des résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui (les premières études suffisamment abouties remontant à la fin des années 1960) sont issus d'expériences menées en laboratoire, qui se sont focalisées sur la physiologie des diatomées.

Les travaux concernant les changements génétiques impliqués dans la survie à long terme sont encore aujourd'hui rares et seront abordés plus tard (voir section « Organisme d'étude » de cette Introduction).

Constitution et consommation parcimonieuse des réserves de carbone

Les formes de stockage

Les photosynthétats (produits de la photosynthèse) peuvent être employés de différentes manières : pour la croissance somatique et la division cellulaire (qui nécessitent la production de nouvelles macromolécules et un apport d'énergie), ou pour la constitution de réserves. Ces dernières permettent de maintenir un équilibre énergétique au cours de la vie des cellules en stockant l'énergie excédentaire produite par la photosynthèse. Ces réserves peuvent être consommées lorsque l'apport énergétique par la photosynthèse n'est plus suffisant (absence de lumière par exemple, voir Coleman et Lee, 2004). Les carbohydrates et lipides sont les formes de stockage du carbone organique les plus communes chez les espèces phytoplanctoniques. Elles peuvent représenter chez les diatomées une grande proportion du poids sec (Biersmith et Benner 1998 ; Darley 1977 ; Hu et al. 2008). Lorsque nécessaire, elles peuvent être converties en ATP (énergie), NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, pouvoir réducteur), ou utilisées pour la synthèse de nouvelles molécules. La possibilité d'utiliser ces réserves de manière parcimonieuse à l'obscurité est depuis longtemps considérée comme l'une des stratégies qui pourrait expliquer la survie des diatomées. Une diminution des protéines a parfois également été observée lors d'acclimations prolongées à l'obscurité, mais peu d'études en font cas, et aucune généralisation ne semble se dégager de la littérature (Anderson 1976 ; Handa 1969 ; Schaub et al. 2017). Dans de nombreuses expériences d'acclimation à l'obscurité, la durée de vie des cultures semble être négativement corrélée à la température (Antia 1976 ; Martin et al. 2012 ; Smayda et Mitchell-Innes 1974), ce qui pourrait s'expliquer par l'influence de la température sur le taux métabolique. En stimulant le métabolisme, une augmentation de la température entraîne une consommation plus rapide des réserves cellulaires, et, par conséquent, une diminution de leur temps de survie et de leur viabilité (i.e., de leur capacité à survivre et à redémarrer

leur croissance) (Schaub et al. 2017). Bien que les deux formes de stockage semblent partager une fonction très similaire, il apparaît qu'elles diffèrent par leur dynamique et leur rôle au cours du cycle de vie cellulaire.

Carbohydrates

Le β -1,3-glucane (ou chrysolaminarine), polysaccharide de réserve le plus important chez les diatomées (Villanova et al. 2017), constitue la forme de stockage principale lorsque les conditions de croissance sont optimales (Granum et al. 2002). Il s'accumule rapidement dans les vacuoles le jour, et permet un apport d'énergie continu ainsi que la synthèse de nouvelles protéines la nuit (Granum et Mykkestad 1999 ; Hitchcock 1980 ; Oijen et al. 2003 ; voir Smith et al. 1990). Sous certaines conditions de stress, notamment des carences nutritives, les diatomées accumulent de grandes quantités de carbohydrates (Suroy et al. 2015). Cependant, ce phénomène n'est pas systématique et ne semble intervenir que dans un nombre de cas limité (limitation en azote notamment).

Lipides

Les lipides peuvent être classés en deux grandes classes : les lipides polaires (amphipatiques) et les lipides neutres. Les premiers sont principalement composés de glycolipides et de phospholipides qui jouent différents rôles dans les cellules, dont un rôle structurel primordial, étant des éléments constitutifs majeurs des membranes. Ils sont majoritaires et synthétisés en grande quantité lors des périodes de croissance efficaces (voir Hu et al. 2008), notamment pour la synthèse des membranes des cellules filles et de leurs organelles. Les lipides neutres sont majoritairement composés de triglycérides (aussi appelés triacylglycérols, triacylglycérides ou TAG) qui sont les lipides de réserves. Les lipides neutres regroupent également les monoglycérides et les diglycérides, deux intermédiaires de synthèse de nombreux autres lipides. Les lipides de stockage suivent, comme les sucres, une dynamique liée au cycle diurne (Gaidarenko et al. 2019). Ils sont synthétisés puis stockés dans des structures cytoplasmiques appelées gouttelettes lipidiques. Mais c'est lorsque les conditions de croissance sont défavorables que les lipides de réserve s'accumulent en plus grandes quantités (Hu et al. 2008). L'accumulation de TAG a d'ailleurs déjà été observée à l'orée de la nuit polaire (Fahl et

Kattner 1993 ; Fryxell 1989). Grâce à leur important degré de réduction ainsi que leur nature hydrophobe, les lipides neutres constituent une forme de stockage nettement plus optimale que les carbohydrates avec un ratio énergie:poids deux fois supérieur (Berg et al. 2003 ; Lehninger 1975).

Dynamique d'accumulation et de consommation des carbohydrates et des lipides

En 1986, Vårum et collaborateurs ont montré que l'amplitude des variations du pool de carbohydrates d'une diatomée augmentait avec la durée de la phase sombre de la photopériode. Lors de cette expérience, le stock de β -1,3-glucane pouvait être quotidiennement consommé dans sa quasi-totalité lorsque la nuit était suffisamment longue. Après 36 h d'obscurité, la souche de *Skeletonema costatum* étudiée restait par ailleurs viable après avoir consommé 95 % de ses carbohydrates de réserve. Trois semaines plus tard, les cultures étaient toujours capables de reprendre leur croissance lorsque qu'elles étaient réexposées à la lumière, suggérant que les carbohydrates n'étaient probablement pas impliqués dans la survie à long terme. Dans une autre étude menée sur une souche de *Thalassiosira weissflogii* par Walter et al. (2017), une douzaine de jours passés à l'obscurité ont suffi à réduire le quota en carbohydrates des cellules d'au moins 40 %. En 1969, Handa avait remarqué, chez une autre souche de *S. costatum* maintenue à l'obscurité, que les carbohydrates étaient très rapidement consommés. Les lipides, dont la dégradation était plus lente et indépendante de celle des sucres, commençaient à être consommés après ces derniers. Un certain nombre d'observations similaires ont été effectuées par Dehning et Tilzer (1989), Gibson et Fitzsimons (1990), Popels et al. (2007), et Ricketts (1966) chez différents groupes d'algues. La même dynamique a également été observée par Manoharan et al. (1999) chez une *Dinophyceae*. Il faut noter que le schéma inverse a aussi parfois été aussi observé. C'est notamment le cas chez une espèce de diatomée du genre *Navicula* lors d'une acclimatation à l'obscurité d'une durée de 8 semaines (voir Schaub et al. 2017). Dans cette étude, le mode de consommation des carbohydrates peut constituer un cas particulier, le genre *Navicula* semblant posséder une aptitude très développée (par rapport à la majorité des diatomées) à non seulement survivre à l'obscurité, mais également à y croître activement par hétérotrophie (Lewin 1953). D'une manière générale, les modes de synthèse/consommation des carbohydrates les plus fréquemment observés au cours d'un cycle jour-nuit et lors d'acclimations à

l'obscurité laissent penser que leur dynamique est plus adaptée à des processus dont l'échelle est de l'ordre d'un à plusieurs jours (cycle circadien, excursion en sub-surface due au mélange vertical, par exemple).

Au contraire, Smith et al. (1990) ont observé que le pool de lipides d'une communauté d'algues sympagiques arctiques restait en grande partie stable au cours d'un cycle jour/nuit 12 : 12. Lors d'une acclimatation à l'obscurité d'une durée de trois mois, Morin et al. (2019) ont suivi le contenu en lipides neutres d'une souche de *F. cylindrus*. Pendant la majeure partie de période d'obscurité, le contenu cellulaire en lipides neutres a diminué de manière linéaire mais n'avait diminué au total que de 13 % à la fin de l'expérience. Ces résultats suggèrent bien l'implication des TAG dans la survie de l'espèce étudiée ainsi qu'une consommation extrêmement lente.

Il apparaît donc que les carbohydrates représentent plus souvent un stock de carbone organique utilisable à court terme pour la synthèse de protéines, la respiration et la fixation d'azote à l'obscurité. Quant aux lipides, ils seraient préférentiellement mobilisés pour affronter de longues périodes de conditions défavorables à la croissance. Cette distinction du rôle des lipides et des carbohydrates est corroborée par l'étude réalisée en 1980 par Smith et Morris sur une communauté phytoplanctonique polaire. Lorsque la température et l'intensité lumineuse étaient favorables à la croissance, une bonne partie du carbone se retrouvait sous forme de polysaccharides. Au contraire, en conditions de faible intensité lumineuse et de faible température, la majeure partie du carbone assimilé était stockée sous forme de lipides. Lorsque la croissance est progressivement ralentie puis limitée, la nature des produits stockés change. Il est intéressant de noter que, dans cette étude, les baisses de la température et de la lumière, caractéristiques de l'approche de l'hiver polaire, pourraient être les déclencheurs permettant aux algues d'anticiper la nuit polaire en adaptant la nature de leur stock de carbone (i.e. en l'enrichissant en lipides de stockage).

Cette différence de dynamique des sucres et des lipides pourrait s'expliquer par le fait que les lipides possèdent un meilleur rendement énergie/volume, alors que les carbohydrates présentent l'avantage de pouvoir être synthétisés, stockés puis mobilisés rapidement lorsque nécessaire, optimisant ainsi le coût associé à leur utilisation. Retenons que les modes d'utilisation des stocks de carbone organique sont connus pour varier d'une espèce de microalgue à l'autre et en fonction des conditions de croissance. L'implication

des carbohydrates dans la survie des diatomées à l'obscurité prolongée paraît moins probable, mais n'est cependant pas à exclure.

Dans l'éventualité où un apport de carbone exogène (i.e., hétérotrophie) n'est pas envisageable et où les réserves énergétiques intracellulaires des algues, par leur quantité et/ou leur nature, ne sont pas suffisantes pour assurer la survie à l'obscurité, une manière d'augmenter l'énergie disponible serait de recycler les composantes structurales et fonctionnelles de la cellule qui ne sont pas essentielles à la survie. Les études faisant référence à des processus de recyclage et de réallocation des ressources cellulaires sont nombreuses. Ces observations ont cependant rarement été faites lors d'expériences d'acclimatation à l'obscurité. En 1975, Anderson était l'un des premiers à suivre les changements physiologiques et morphologiques opérés au cours des premières semaines chez une diatomée (*Amphora coffaeiformis*) placée à l'obscurité. Il avait observé une importante activité vacuolaire et suggéré que les cellules pourraient effectuer de l'autophagie (aussi observée lors de la germination de spores du genre *Melosira* par Sicko-Goad et al. 1986b). Un tel processus pourrait permettre, par exemple, la réallocation de l'azote des protéines, la conversion des lipides membranaires en lipides de réserves, ou encore la dégradation de ces deux types de composés pour alimenter la respiration. Cette hypothèse est corroborée par la réduction du nombre d'organelles observée dans cette étude et l'apparition de gouttelettes lipidiques après que les algues ont été placées à l'obscurité, alors qu'elles ne bénéficiaient plus à ce moment-là de lumière pour fixer du carbone inorganique.

Des processus de recyclage ont souvent été suggérés chez des diatomées soumises à des stress nutritifs (Allen et al. 2008 ; Bender et al. 2014 ; Levitan et al. 2014 ; Nunn et al. 2013 ; Shih et al. 2015 ; Valenzuela et al. 2012). Le séquençage de génomes de diatomées a récemment permis d'identifier les composants nécessaires à la réalisation d'un cycle complet de l'urée, une voie métabolique qui n'avait encore jamais été décrite chez les eucaryotes autotrophes (Armbrust et al. 2004 ; Bowler et al. 2008). Il pourrait permettre aux algues de redistribuer leur carbone et leur azote lors de stress nutritifs (Allen et al. 2011 ; Bender et al. 2014 ; Fernie al. 2012). En 2014, Chen et collaborateurs ont par ailleurs montré que le cycle de l'urée était probablement impliqué dans la germination des cellules de résistance, qui sont présentées ci-après.

Cellules de résistance

Les formes de résistance connues chez les diatomées

On sait de longue date que certains microorganismes peuvent produire, à différents stades de leur cycle de vie, et parfois de manière obligatoire, des types de cellules différant de leur forme végétative (i.e. *vegetative cell*, VC) (i.e. auxospores, hypospores, kystes). Certains sont caractérisés par un état de dormance permettant d'affronter des périodes de stress. Un état de dormance se définit par un arrêt de la croissance et par une réduction du métabolisme. Certains stades de dormance, appelés cellules de résistance, sont en plus caractérisés par une modification de la structure des cellules. On reconnaît aujourd'hui chez les diatomées l'existence de deux types de cellules de résistance : les spores (i.e. *resting spore*, RS) et les *resting cells* (RC). Une troisième forme de résistance, appelée stade hivernal (i.e., *winter stage*), a été décrite par Fryxell et Prasad en 1990. Cette forme possède une morphologie similaire à celle des RS mais est dépourvue des réserves usuellement trouvées chez ces dernières et peut se diviser sans germer. La description de cette forme de résistance alternative reste anecdotique dans la littérature et ne sera pas considérée dans cette introduction.

Incapables de croissance active, caractérisés par un métabolisme ralenti et une réorganisation cellulaire réversible, ces stades de dormance apparaissent lorsque les cellules végétatives rencontrent des conditions défavorables à leur croissance (Lennon et Jones 2011 ; Oku et Kamatani 1999). Elles permettent donc la survie des cellules en « hibernation ». Au retour de conditions propices à la croissance, les cellules peuvent germer rapidement (Kuwata et Takahashi 1999). Notons que, chez certaines espèces, la germination ne peut intervenir qu'après une période minimale de dormance obligatoire. La capacité des diatomées à produire ces formes de dormance, ainsi que les facteurs déclenchant leur formation/germination, n'ont été caractérisés que pour un nombre limité de souches, et semblent être spécifiques à chaque espèce. Les observations qui ont été faites jusqu'à présent sont donc difficilement généralisables.

Les RS sont facilement distinguables des VC par la modification de leur frustule au moment de la sporulation. Ils sont davantage silicifiés (Sugie et al. 2010) et souvent ornés d'épines (Pitcher 1990). Les RC ne sont pas morphologiquement différentes des VC et, par conséquent, parfois plus difficiles à identifier. Les RC (comme les RS) se distinguent

cependant des formes végétatives par un réarrangement de leur protoplasme (Fig. 8). Différentes études ont en effet observé une contraction et un assombrissement de ce dernier (du Preez et Bäte 1992 ; Palmisano et Sullivan 1983 ; Pitcher 1990 ; Sicko-Goad et al. 1986a et 1989 ; Wulff et al. 2008). Ces changements sont parfois accompagnés d'un arrondissement des chloroplastes (Chen 2014 ; Gibson et Fitzsimons 1990 ; Lund 1954). Certains auteurs ont également associé la contraction du cytoplasme à un évènement de plasmolyse (i.e., perte d'eau par la cellule ; Anderson 1975 ; Peters et Thomas 1996).

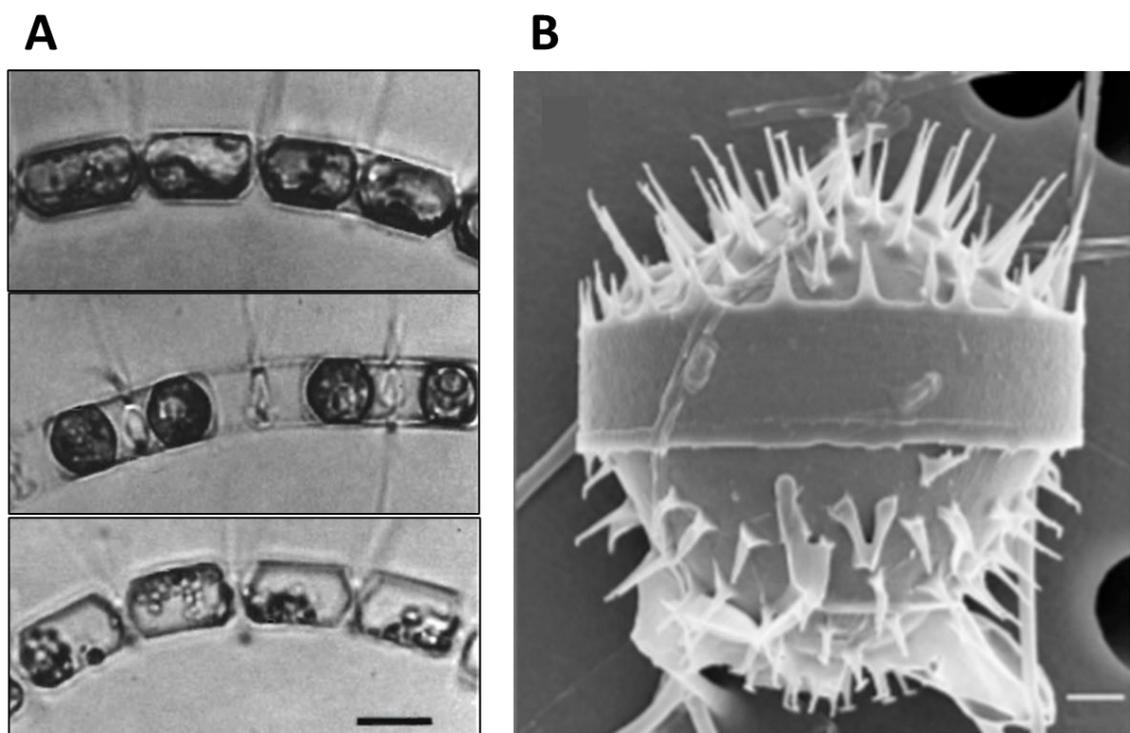


Figure 8. (A) Images issues de microscopie optique de cellules en chaîne de *Chaetoceros pseudocurvisetus* sous leur forme végétative (haut), sous forme de spores (milieu) formées dans une culture limitée en azote, et sous forme de RC formées dans une culture limitée en azote et silice (bas) (échelle : 10 μ m) (tirée de Kuwata et al. 2013). (B) Photo de microscopie électronique à balayage d'une spore de *Chaetoceros socialis* formée dans une culture limitée en azote (échelle : 1 μ m) (tirée de Pelusi et al. 2019).

Importance des RS et RC dans le cycle de vie et à l'obscurité

Certaines espèces peuvent produire aussi bien des RC que des RS (Jewson et al. 2008 ; Kuwata et Takahashi 1999), ce qui suggère que ces stades de dormance peuvent remplir des rôles différents dans le cycle de vie des diatomées. Plusieurs auteurs ont tenté de

différencier les RC et les RS en les associant notamment à des genres de diatomées plutôt qu'à d'autres, ou en fonction de la nature des stress et signaux environnementaux permettant le déclenchement de leur formation (Jewson et al. 2008 ; Kuwata et Takahashi 1993 et 1999 ; McQuoid et Hobson 1996 ; SickoGoad et al. 1989). Cependant, la diversité des nombreuses observations contradictoires n'a jamais permis de distinguer et de délimiter clairement l'intérêt et le rôle d'une forme vis-à-vis de l'autre.

Différents facteurs de croissance (température, salinité, lumière etc.) semblent pouvoir provoquer la production de RS chez les diatomées (voir McQuoid et Hobson 1996 ; Sugie 2010). Cependant, les limitations nutritives restent le facteur le plus fréquemment évoqué (Drebes 1966 pour le phosphore ; Hargraves et French 1985 pour l'azote ; Kuwata et Takahashi 1990 ; Oku et Kamatani 1995 ; Sugie et Kuma 2008 pour le fer). Ces conditions de limitation sont caractéristiques de la période de l'année faisant suite au *bloom* printanier. Alors que la production primaire se retrouve limitée par le manque de ressources dans la couche de mélange, la formation des RS permettrait aux diatomées de se réfugier en profondeur ou dans les sédiments (Odate et Maitan 1990) où le niveau d'éclairement réduit et les faibles températures favoriseraient le maintien de la viabilité des cellules en dormance (Durbin 1978 ; Smayda et Mitchell-Innes 1974). Pour accélérer leur export de la couche de surface, les RS peuvent compter sur le poids important que leur confère leur frustule, plus épais. Les épines qui l'ornent souvent leur donneraient également la possibilité de s'agréger lors d'événements de sédimentation massive (*mass sinking*) typiques de la fin des *blooms*. Ces deux caractéristiques du frustule offrent par ailleurs l'avantage d'une protection accrue contre les organismes brouteurs, les infections bactériennes et la dissolution de la silice (Kuwata et Jewson 2005 ; Kuwata et Takahashi 1990 ; Oku et Kamatani 1997 ; Smetacek 1985). Une fois à l'abri des conditions de croissance défavorables (limitation en nutriments et photoinhibition) de la couche de surface, les diatomées attendent ensuite d'être remises en suspension dans un environnement où elles pourront initier un nouveau *bloom* (Eilertsen et al. 1995 ; McQuoid et Godhe 2004 ; Odate et Maita 1990). La germination est le plus souvent déclenchée lorsque les cellules sont réexposées à la lumière (Eilertsen et al. 1995 ; Shikata et al. 2011 ; Zhang et al. 2010). Elle l'est également parfois par le transport des cellules dans un milieu enrichi en nutriments (Jewson et al. 2008).

En laboratoire, la formation de RS n'a été que rarement observée chez des diatomées cultivées à l'obscurité (Peters et Thomas 1996 ; Syvertsen 1991 ; Zhang et al. 1998). Lorsque cela a été le cas, il s'agissait exclusivement d'algues du genre *Chaetoceros* (exception chez Stosch et Fecher 1979). Ces observations suggèrent que, dans la majorité des cas, la sporulation ne semble pas pouvoir être directement déclenchée par l'absence de lumière. Notons qu'elle pourrait cependant, aux pôles, permettre indirectement aux cellules de survivre à la nuit polaire. En 1978, Durbin avait déjà mis en avant cette idée en suggérant que les spores, dont le rôle premier serait de survivre à un stress nutritif, pourraient, dans la foulée, permettre aux algues de survivre pendant l'hiver. En effet, si des spores étaient formées à la fin du *bloom* printanier, et si elles ne rencontraient pas de conditions favorables à leur germination avant le début de l'hiver, elles pourraient théoriquement survivre à ce dernier sous leur forme de dormance. Malheureusement, en raison du nombre limité d'études conduites sur la diversité et la répartition (eau, glace, sédiments) des communautés de microalgues arctiques (et ce, pendant la nuit polaire en particulier), aucune conclusion ne peut être tirée. Notons que la présence de spores dans la glace et dans l'eau sous-jacente en hiver n'a été que rarement rapportée (Niemi et al. 2011 ; Róžańska et al. 2008 ; Werner et al. 2007).

Le rôle des RC est aujourd'hui moins bien caractérisé que celui des RS. Les RC ont en revanche été fréquemment observées lors d'acclimatation à l'obscurité (Anderson 1975 et 1976 ; Palmisano et Sullivan 1983 ; Peters et Thomas 1996 ; Preez et Bäte 1992 ; Sicko-Goad et al. 1989). Malheureusement, leur fonction et fonctionnement (ainsi que ceux des RS) ne sont toujours aujourd'hui que très mal compris, leur physiologie n'ayant été que peu étudiée.

Changements fréquemment décrits chez les RC et RS

Les mécanismes intervenant dans la formation des cellules de résistance ont été si peu étudiés qu'ils demeurent aujourd'hui quasiment inconnus. Les études passées se limitent la plupart du temps au simple constat de changements de paramètres physiologiques et phénotypiques, sans identification claire de leur utilité ou des processus sous-jacents. Un certain nombre d'observations récurrentes ont tout de même été effectuées. Les descriptions faites de RC et RS produites *via* différents stress comportent en effet de nombreux points communs. Ceux-ci laissent penser que la nature des réarrangements intervenant durant leur formation se recoupe en grande partie, indépendamment des

espèces étudiées et des facteurs déclencheurs de la métamorphose. Les études ayant porté spécifiquement sur la formation de RS/RC de diatomées polaires produites lors d'acclimatation à l'obscurité sont relativement peu nombreuses. Nous avons donc tenu compte de l'ensemble des études ayant traité des caractéristiques communément observées chez ces types de cellules.

Ralentissement du métabolisme – Les RS et RC ralentissent leur métabolisme, et aucune de ces deux formes ne se divise. Anderson (1976) et Kuwata et al. (1993) ont rapporté une diminution notable de la respiration des RS et RC (voir aussi Peters et Thomas 1996 ainsi que Peters 1996). Kuwata et al. (1993), comme Peters et Thomas (1996), ont observé une réduction de la fixation de carbone, et Preez et Bâte (1992), sa totale suppression. Palmisano et Sullivan (1982), lors d'une transition été-hiver expérimentalement simulée, ainsi que Oku et Kamatani (1999), ont observé une diminution de la quantité d'ATP (et d'autres nucléotides majeurs) par cellule, ce qui témoigne d'un ralentissement du métabolisme.

Réserves de carbone importantes – Les RS et RC peuvent se doter de réserves importantes de carbone sous forme de carbohydrates et (plus souvent) de lipides (Anderson 1975 ; Doucette et Fryxell 1983 et 1985 ; Fryxell 1989 ; Kuwata et al. 1993 ; Palmisano et Sullivan 1982). Ceci s'illustre notamment par l'augmentation des rapports carbone : azote (C : N) et C : chlorophylle *a* (C : chl *a*) (Bunt et Lee 1972 ; Doucette et Fryxell 1983 ; Kuwata et al. 1993 ; Sakshaug et Andresen 1986) lors de la formation des formes de résistance. Lorsque les cellules sont ensuite maintenues à l'obscurité, une lente diminution des quotas en carbone peut être observée (Anderson 1976 ; Peters et Thomas 1996). En 1993, Kuwata et collaborateurs menèrent une analyse approfondie de la composition des lipides et des carbohydrates de RS et RC d'une souche de *C. pseudocurvisetus* soumise à une limitation nutritive. Cette étude a permis d'illustrer l'efficacité avec laquelle les cellules de résistance de cette espèce pouvaient stocker ces deux types de molécules sous des formes favorisant leur survie à long terme (quantité, rendement énergétique et possibilité éventuelle de métaboliser à l'obscurité). Lors de la « germination » de RC au retour de conditions favorables à la croissance, Sicko-Goad et al. (1986a) ont pu observer la reconstitution des réserves. L'implication des sucres et des lipides de stockage dans la survie des RC et RS ne semble faire aucun doute. Cependant, beaucoup d'éléments restent mal caractérisés. Parmi ceux-ci, on peut énumérer : (1) la

période pendant laquelle ces réserves peuvent ou doivent être accumulées (i.e. avant, pendant ou après celle des RC ou RS), (2) leur éventuelle implication dans la formation des RC et RS, (3) la dynamique de leur consommation, (4) la possibilité ou pas de les reconstituer au cours de la période à l'obscurité, (5) les fonctions métaboliques dans lesquelles elles sont investies à l'obscurité et au retour à la lumière, (6) leur nécessité absolue (ou pas) dans la survie et /ou dans la reprise d'activité, ainsi que (7) la capacité des RC et RS à survivre et à germer une fois les réserves épuisées.

Dans le milieu naturel, on peut s'attendre à ce qu'une algue placée à l'obscurité abandonne sa forme végétative au profit d'une forme de dormance seulement après plusieurs jours, sa « métamorphose » impliquant une importante réorganisation de la cellule qu'il ne serait évidemment pas avantageux de déclencher toutes les nuits. Les réserves en carbone qui semblent impliquées dans la survie des cellules de résistance pourraient jouer un rôle primordial dans le déclenchement de leur formation. On peut en effet faire l'hypothèse que la consommation de ces réserves, au-delà d'un certain seuil, pourrait être le facteur nécessaire au déclenchement (1) de la transformation en stade de dormance et (plus généralement) (2) d'une diminution et d'une modification drastiques du métabolisme.

Hétérotrophie

La capacité de certaines diatomées à faire de l'hétérotrophie pourrait les aider à maintenir leur viabilité au cours d'une acclimatation à l'obscurité. Bien que ma thèse ne l'examine pas, cette alternative aux stratégies exposées précédemment sera présentée brièvement dans le paragraphe suivant afin d'appréhender la question traitée dans sa globalité.

Introduction générale/historique

L'hypothèse selon laquelle l'hétérotrophie serait un des moyens que possèdent les diatomées pour survivre à des périodes d'obscurité prolongées n'est pas nouvelle (Wilce 1967). Pendant longtemps, on a pensé que l'utilisation de la mixotrophie était cantonnée à certains groupes de microalgues dont ne faisaient pas partie les diatomées. Depuis, diverses observations ont permis de constater que certaines diatomées, lorsque placées à l'obscurité, se révélaient non seulement capables de développer des systèmes de transport du carbone organique dissous (COD), mais étaient parfois même capables de croître

activement. Depuis, le sujet reste épineux. En effet, la possibilité d'avoir recours à l'hétérotrophie, sa nécessité absolue pour certaines espèces, son efficacité, les facteurs qui l'inhibent ou permettent son utilisation, les substrats en mesure de l'alimenter, ainsi que les conditions parfois nécessaires à l'induction des systèmes de transport et des enzymes impliquées dans la métabolisation du COD, diffèrent d'une espèce à l'autre (Changsang et Cooksey 1977 ; Hellbust et Lewin 1972). L'hétérotrophie se manifeste donc de manière extrêmement diverse chez les diatomées. Ceci découle peut-être de l'origine des gènes et voies métaboliques concernées, modulées par deux phénomènes aléatoires importants de l'histoire évolutive des diatomées (Bowler et al. 2008). Certains gènes, hérités de l'ancêtre hétérotrophe, ont pu être perdus par certaines espèces au fil du temps. Tandis que d'autres, issus d'événements de transferts latéraux de gènes bactériens, ont pu être acquis par certains groupes de diatomées uniquement.

De nombreuses espèces de diatomées (pennées en particulier), souvent recensées au sein d'environnements riches en matière organique, sont capables d'assimiler le COD (Hellbust et Lewin 1977 ; Lewin 1953 ; Zhang et al. 1998). Le genre *Nitzschia*, qui domine souvent les communautés d'algues sympagiques en Arctique (en hiver comme pendant le *bloom* printanier), semble par exemple doté d'un potentiel hétérotrophe particulièrement développé (Hellbust et Lewin 1977). Horner et Alexander (1972) ont cependant montré que l'assimilation de COD par des diatomées issues de carottes de glace prélevées en hiver en Arctique, était négligeable. Les diatomées sont par ailleurs généralement considérées comme étant faiblement compétitives quant à leur efficacité à assimiler le COD vis-à-vis des bactéries. Ceci dit, la survie à l'obscurité n'implique pas nécessairement le maintien de la croissance, mais seulement celui du métabolisme basal, qui n'implique qu'un faible coût énergétique et ne nécessite, *a priori*, qu'un apport réduit en COD. La présence et l'activité de bactéries toujours actives pendant la nuit polaire n'empêcheraient donc pas forcément les diatomées de survivre grâce à l'hétérotrophie (Hellbust et Lewin 1977). Tuchman et al. (2006) ont par ailleurs montré que les algues et les bactéries n'assimilaient pas les mêmes formes de COD avec la même efficacité, et que les diatomées seraient plus enclines à incorporer les carbohydrates que les bactéries. Les bactéries sont, elles, connues pour être capables d'assimiler une plus grande diversité de molécules organiques. Cette disparité pourrait bien conférer aux diatomées un avantage sur leurs concurrents dans la compétition pour les ressources.

De nouveaux progrès possibles grâce à l'évolution des techniques biomoléculaires

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire offrent aujourd'hui l'opportunité d'approfondir notre compréhension du potentiel hétérotrophe des diatomées. Armbrust et al. (2004) puis Bowler et al. (2008), en séquençant et en analysant les premiers génomes de diatomées, ont pu identifier de nouvelles voies métaboliques qui permettraient l'utilisation de COD. En 2016, le génome nucléaire de *Cyclotella cryptica* par Traller et al., diatomée capable de croître par hétérotrophie seule (voir Pahl et al. 2010 et les références qui y figurent), a révélé la présence de transporteur de sucres. En 2017, Villanova et collaborateurs ont également montré, chez une souche de *P. tricornutum* cultivée à la lumière, que l'ajout d'une source de COD pouvait affecter drastiquement la gestion de son métabolisme carboné, aux niveaux physiologique et génétique. L'ajout de glycérol dans le milieu de culture engendre notamment une augmentation du stockage et de la consommation des lipides (réserves de TAG en particulier) et des carbohydrates. Ces éléments suggèrent que l'hétérotrophie pourrait, en plus de soutenir le métabolisme basal à l'obscurité, augmenter le potentiel de survie reposant sur la mobilisation de réserves lorsqu'elles sont constituées avant que la lumière ne disparaisse complètement. Plus récemment, le génome d'une souche de diatomée du genre *Nitzschia* ayant perdu sa capacité à faire de la photosynthèse, a également été séquencé (Onyshchenko et al. 2021) et offre de nouvelles possibilités.

L'hétérotrophie en renfort des deux premières stratégies ?

En général, une réduction de l'intensité lumineuse partielle ou totale est nécessaire au déclenchement ou à l'augmentation du potentiel hétérotrophe des diatomées (Palmisano et Sullivan 1982 ; Tuchman et al. 2006). Par le passé, on a pu observer que certaines espèces de diatomées augmentent la taille de leurs réserves de carbone de manière significative lors d'acclimations à l'obscurité. Curieusement, cette augmentation pouvait se produire avant que les cultures ne soient complètement privées de lumière (Palmisano et Sullivan 1982), mais aussi après la mise à l'obscurité, et parfois même après la métamorphose en cellules de résistance (Anderson 1975 ; Doucette et Fryxell 1983). Au même titre que l'autophagie évoquée précédemment, l'hétérotrophie pourrait bien être une des clés de la survie des diatomées à l'obscurité. Et ce, en particulier si elles ne disposent pas de réserves de carbone intracellulaires importantes lorsqu'elles sont

privées de lumière, et/ou si elles n'ont pas déjà à ce moment-là adopté une forme dormante.

Gestion de la photosynthèse et de la photoprotection

Sont mentionnées ici les observations fréquemment obtenues au cours d'acclimations à l'obscurité.

Machinerie photosynthétique

La capacité des diatomées placées à l'obscurité à faire de la photosynthèse (fixation de C) peut diminuer lentement (Peters et Thomas 1996) en réponse à une probable diminution progressive de la viabilité des cellules, ou rapidement (Anderson 1976 ; du Preez et Bäte 1992 ; Gibson et Fitzsimons 1990 ; Lacour et al. 2019 ; Morin et al. 2019 ; Peters 1996) en réponse à un mécanisme d'acclimation. Dans les deux cas, cela n'empêche pas une rapide reprise de l'activité après plusieurs semaines ou plusieurs mois passés à l'obscurité. Dans le premier des deux cas, la capacité photosynthétique est probablement maintenue. Dans le second cas, la vitesse de la reprise d'activité des algues à la lumière montre bien que la réduction, voire l'inhibition totale de la photosynthèse à l'obscurité, résulte d'un processus d'acclimation réversible et non de dommages cellulaires (Martin et al. 2012 ; Morin et al. 2019 ; Lacour et al. 2019 ; Luder et al. 2002 ; Reeves et al. 2012).

Contenu en chlorophylle a

La chl *a* cellulaire est généralement conservée à l'obscurité, ou se dégrade parfois lentement avant de se stabiliser (Peters et Thomas 1996). Ceci est cohérent avec la nécessité de préserver un niveau de capacité photosynthétique en prévision d'un retour à la lumière. Certains auteurs ont même rapporté une augmentation de la chl *a* lors de la formation des RS et RC (Bunt et Lee 1972 ; Gibson et Fitzsimons 1990 ; Walter et al. 2017). Cette particularité pourrait être bénéfique aux algues au moment de la ré-illumination en permettant aux algues de mieux exploiter de faibles intensités lumineuses (du Preez et Bäte 1992) au début du printemps. Chez les plantes supérieures, une partie de leur contenu pigmentaire peut éventuellement être recyclé (Araújo et al. 2010) pour générer de l'énergie et prolonger la durée de viabilité des cellules lors de stress

énergétiques. Un tel processus n'a cependant, à notre connaissance, jamais été observé chez les diatomées.

Photoprotection

Morin et al. (2019) et Lacour et al. (2019) ont respectivement montré que des souches de *F. cylindrus* et de *C. neogracilis* maintenues un mois à l'obscurité conservaient leurs capacités de photoprotection. Notamment, les teneurs totales en diadinoxanthine et diatoxanthine restaient stables pendant toute l'acclimatation à l'obscurité. Ces deux pigments jouent un rôle majeur dans la photoprotection des diatomées puisque la conversion de la diadinoxanthine en diatoxanthine est associée à la dissipation de l'énergie radiative absorbée en excès (NPQ : *Non Photochemical Quenching*).

Chez les diatomées placées à l'obscurité, la capacité photosynthétique a tendance à être interrompue (sujet évoqué plus haut), et ce malgré le maintien des principaux éléments de l'appareil photosynthétique. En se basant sur différents paramètres photosynthétiques (taux de transport des électrons, NPQ, rendement quantique maximum, pigmentation), certains auteurs ont proposé diverses stratégies susceptibles d'expliquer ce phénomène. Parmi celles-ci figurent la redirection des électrons vers des puits alternatifs, la génération d'un NPQ malgré l'absence de lumière, ou encore le désassemblage partiel des photosystèmes. Ces différentes stratégies offrent théoriquement, aux diatomées placées à l'obscurité, un avantage de taille pour combattre le stress lumineux survenant au retour à la lumière.

Nous pouvons conclure qu'à l'obscurité, les cellules s'adaptent de manière à concilier une réduction des coûts énergétiques nécessaires au maintien de leur appareil photosynthétique à l'obscurité, et la possibilité de profiter très rapidement d'un retour à la lumière, tout en se protégeant efficacement d'un possible choc lumineux (Gibson et Fitzsimons 1990).

Organisme d'étude

Caractéristiques de l'espèce

F. cylindrus (Grunow) Krieger est une diatomée appartenant à la classe des Bacillariophyceae (pennée raphée). Cette espèce marine psychrophile est majoritairement retrouvée aux pôles, mais peut également être observée en abondance à des latitudes inférieures comme dans la Mer de Norvège. *F. cylindrus* fait partie des espèces capables de croître aussi bien à la base de la glace de mer que dans la colonne d'eau. Elle domine d'ailleurs souvent au début des *blooms* de banquise et dans les *blooms* survenant ensuite dans les eaux sous-jacentes, lorsque la glace fond (Kang and Fryxell 1992 ; von Quilfeldt 2000). Elle serait l'une des diatomées dont les populations entament leur croissance le plus rapidement à l'aube du printemps, et parmi celles qui demeureraient actives le plus longtemps pendant la période de production annuelle (voir von Quilfeldt 2000).

Dans la nature, *F. cylindrus* peut mesurer plusieurs dizaines de μm . En revanche, en culture, les individus de cette espèce sont nettement plus petits, ne mesurant que quelques μm (Fig. 9). Cette différence résulte peut-être de l'absence de rétablissement de la taille du frustule *via* la reproduction sexuée. En effet, cette dernière n'est que rarement observée chez les diatomées maintenues en culture. La réduction de taille qui accompagne les cycles successifs de division binaire peut, si la taille initiale des cellules n'est pas régulièrement rétablie, conduire à la mort d'une population, bien que certaines espèces soient connues pour proliférer avec une taille réduite et stable sans reproduction sexuée. Ces différents phénomènes pourraient expliquer la taille réduite des cellules de *F. cylindrus* cultivées en laboratoire, où les conditions de croissance ne sont peut-être pas propices au déclenchement de la reproduction sexuée.

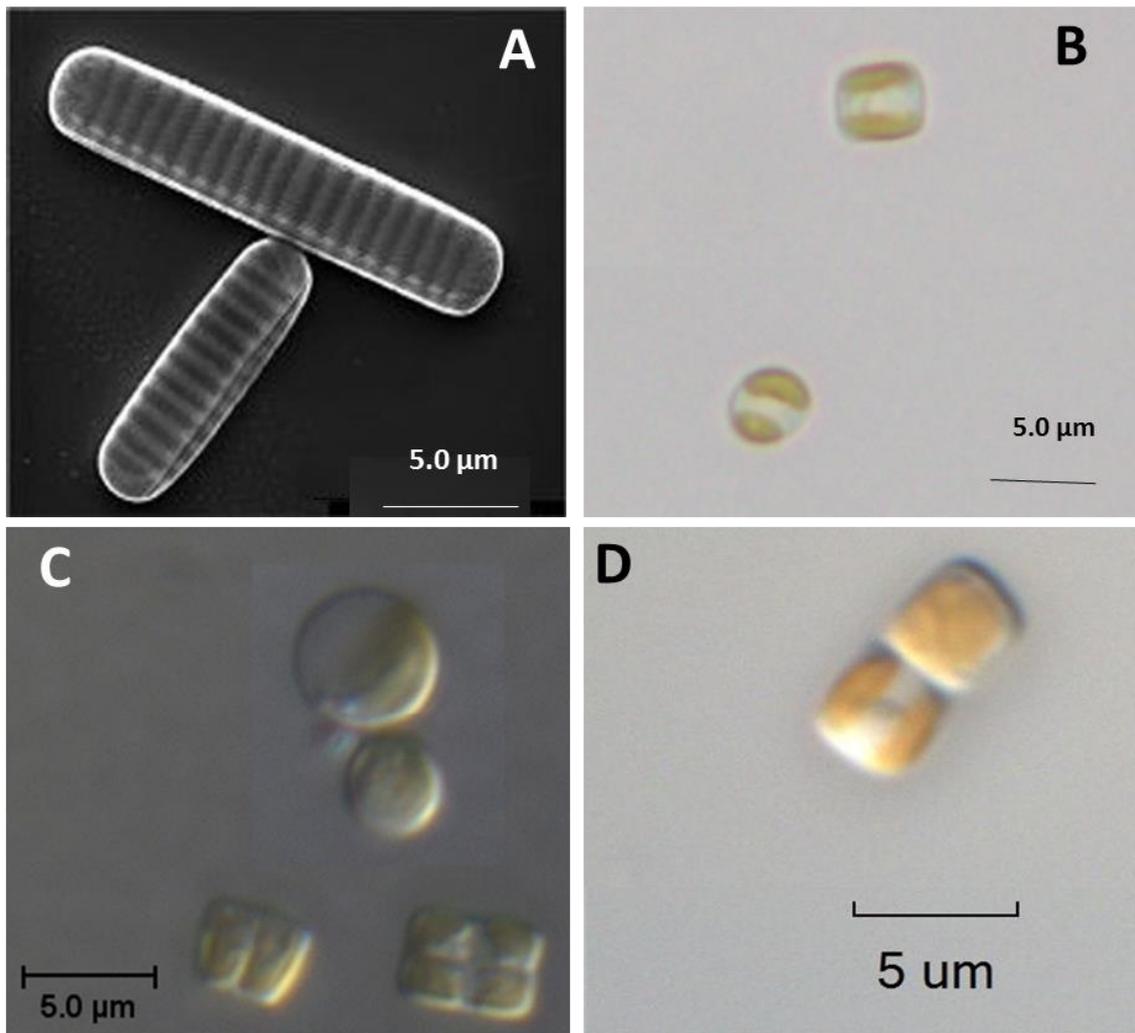


Figure 9. (A) Photo de microscopie électronique à balayage de deux cellules de *F. cylindrus* (Lange et Dieckmann, AWI). (B) Photo de microscopie optique de deux cellules de *F. cylindrus* issues de cultures acclimatées en lumière continue pendant nos expériences. (C) et (D) Photos de microscopie électronique issues de la collection de culture de Roscoff (RCC) de cellules de deux souches de *F. cylindrus* isolées respectivement dans les océans Arctique et Antarctique (crédit : M. Gachenot).

Survie de *Fragilariopsis cylindrus* à l'obscurité, approches des études passées

L'étude de *F. cylindrus* bénéficie aujourd'hui du support de nombreux travaux ayant porté sur sa physiologie et sa génétique (voir Lyon et Mock 2014), certains s'étant focalisés sur la survie de *F. cylindrus* lors d'acclimations à l'obscurité. En 1982, Palmisano et Sullivan ont étudié certaines des modifications physiologiques et biochimiques (taux de croissance, taux d'assimilation de bicarbonate (HCO_3^-) et de glucose, contenus cellulaires

en ATP, en carbohydrates et en lipides) intervenant lors de différents types de transitions été-hiver chez trois souches de diatomées maintenues en culture, dont deux souches de *Nitzschia cylindrus* (synonyme homotypique de *F. cylindrus*). Ils publièrent un second article en 1983 portant sur l'influence du type de transitions été-hiver sur le temps de survie de ces mêmes souches conservées plusieurs mois à l'obscurité. En 2011, Reeves et collaborateurs ont étudié l'influence de la température sur différents paramètres photosynthétiques (teneur en chl *a* et monosaccharides, rendement photosynthétique maximum, taux de transport d'électrons, NPQ) de trois souches de diatomées (dont une souche de *F. cylindrus*) placées deux mois à l'obscurité. En 2019, Morin et collaborateurs ont publié une autre étude sur la survie de *F. cylindrus* à des périodes d'obscurité prolongée (jusqu'à trois mois) en culture, avec un suivi de la reprise d'activité à la lumière après un mois et trois mois d'obscurité. Ils y ont rapporté de nombreux paramètres de la physiologie de *F. cylindrus* : volume et concentration cellulaire, contenus cellulaires en lipides neutres, en protéines photosynthétiques, en carbone et azote particuliers, pigmentation, et paramètres photosynthétiques (fluorescence variable et ¹⁴C).

En 2017, Mock et al. ont permis d'élargir les possibilités en séquençant le génome diploïde nucléaire d'une souche monoclonale axénique de *F. cylindrus* (isolée à partir d'une culture de la souche CMMP1102 (National Center for Marine Algae and Microbiota, Bigelow, USA), elle-même isolée en 1979 by G. Fryxell durant la campagne en mer Islas Orcas dans l'océan Austral : 64,08°S 48,7033°O). Le génome de *F. cylindrus* est caractérisé par un nombre important (30%) d'éléments transposables (i.e., séquence capable de se déplacer dans le génome) et un taux élevé d'allèles hautement divergents : ceci concerne environ 25 % du génome d'une taille totale de 61.1 mégabases, soit 6 071 gènes possédant des allèles divergents sur 21 066 gènes (prédits) codant des protéines (total de 27 137 gènes prédits dans le « Filtered Models1 » dont les identifiants (ID) et annotations automatiques et manuelles disponibles peuvent être trouvées sur la base de données du *Joint Genome Institute* (JGI) à l'adresse suivante :

<https://phycocosm.jgi.doe.gov/Fracy1/Fracy1.home.html>). L'exposition de *F. cylindrus* à différents stress, dont une semaine entière passée à l'obscurité, a révélé que de nombreux allèles pouvaient être différemment exprimés en fonction des conditions de croissance. Ceci offrirait à *F. cylindrus* une importante plasticité dans un environnement où les conditions abiotiques peuvent évoluer rapidement et avec une forte amplitude (Mock et al. 2017). Les données de transcriptomiques produites par Mock et

collaborateurs ont par ailleurs permis de montrer que l'appareil photosynthétique semblait fortement sous-régulé à l'obscurité, tandis que les gènes impliqués dans la dégradation de la chrysolaminarine et des lipides étaient eux, au contraire, surexprimés. Plus récemment, Zheng et al. (2019) ont publié le génome chloroplastique de *F. cylindrus*. Ce dernier, d'une taille de 123 kilobases, coderait 141 gènes dont 104 protéines (les séquences et annotations du génome chloroplastique ont été répertoriées sur GenBank, référence MK217824).

En 2019 Kennedy et al. ont publié les résultats d'une expérience où la reprise d'activité de *F. cylindrus* a été suivie pendant les 24 heures suivant une acclimatation à l'obscurité de quatre mois (voir planification et approche des expériences en Fig. 10a). Cette expérience leur a permis de suivre différents paramètres physiologiques des cultures (concentration cellulaire, fluorescence variable, contenus en chl *a* et en ATP), mais également de combiner ces données à des données de protéomiques, approche encore inédite dans l'étude de la survie des diatomées à l'obscurité. Dans les grandes lignes, leurs résultats de protéomique montrent que, lors de l'acclimatation à l'obscurité, la voie d'Entner-Doudoroff était surexprimée, tout comme la partie inférieure de la glycolyse mitochondriale (Fig. 10b), le complexe pyruvate déshydrogénase, le TCA et les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Tous ces processus permettent la génération d'énergie *via* la dégradation des sucres de stockage. Étaient également surexprimées certaines enzymes de la β -oxydation, une lactate déshydrogénase, un gène codant pour l'enzyme malique, ainsi qu'une méthylmalonyl-CoA mutase. L'ensemble de ces réactions permettent également d'alimenter la respiration de la cellule à partir, respectivement, de lipides, de lactate, de malate, et de certains acides gras ou acides aminés. Certaines enzymes impliquées dans le cycle de l'urée ou dans la protéolyse étaient aussi surexprimées à l'obscurité, suggérant également que certains acides aminés étaient dégradés pour les besoins de la cellule. Globalement, les données de Kennedy et al. (2019) suggèrent que la survie de *F. cylindrus* à l'obscurité repose sur l'association : (1) d'une réduction du métabolisme de la cellule (Fig. 10c) et de ses fonctions non essentielles en l'absence de lumière, et (2) de la consommation de ses réserves de carbone pour alimenter le TCA et la respiration mitochondriale. L'implication de la glycolyse inférieure, du TCA et de la β -oxydation dans la survie à l'obscurité de *F. cylindrus* a également été rapportée par Strauss (2012) qui, grâce à ses données de transcriptomique,

rapporte chez *F. cylindrus* placée à l'obscurité, une surexpression de glucanases et glucosidases impliquées dans la dégradation de la chrysolaminarine.

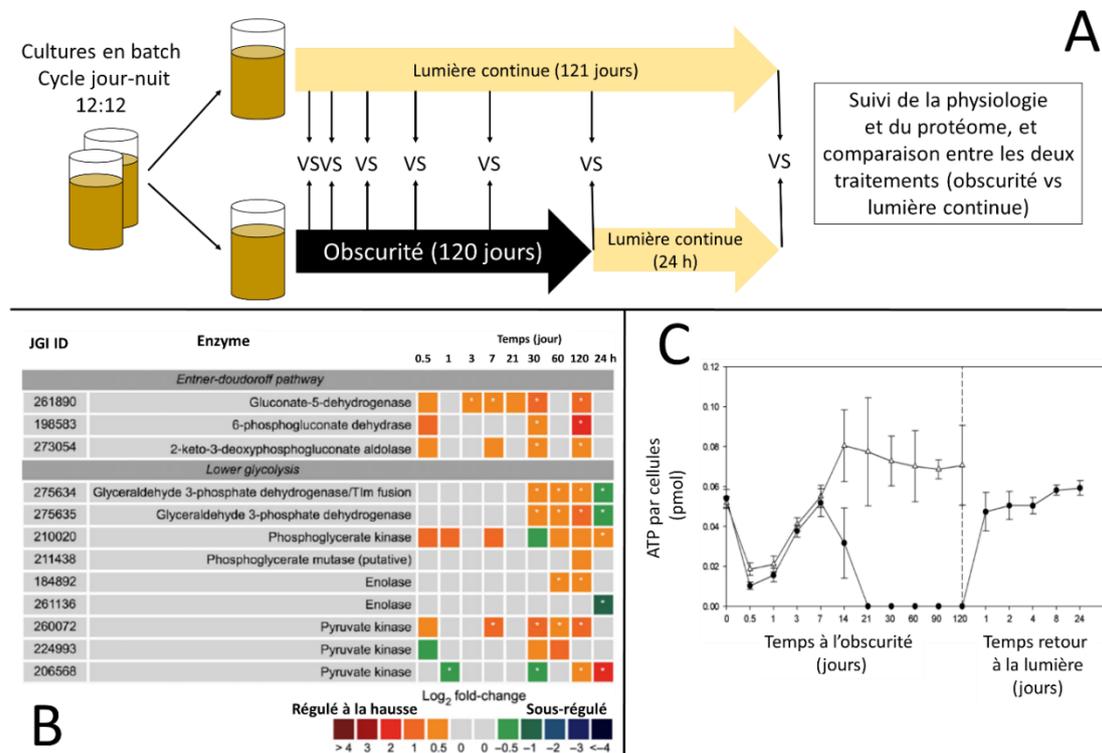


Figure 10. Étude de l'acclimatation à l'obscurité prolongée et au retour à la lumière de *F. cylindrus* par Kennedy et al. (2019). **(A)** Planification et approche expérimentale. **(B)** Comparaison de l'abondance de protéines de la voie Entner-Doudoroff et de la partie basse de la glycolyse mitochondriale après normalisation des chiffres d'abondance avec la concentration cellulaire. **(C)** Quantité d'ATP par cellule en lumière continue (blanc) et à l'obscurité (noir). Les barres d'erreur représentent l'écart type standard. **(B)** et **(C)** ont été modifiés à partir de Kennedy et al. (2019).

Objectifs de l'étude

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet *Green Life in the Dark*, dont le but est de comprendre les processus physiologiques et génétiques impliqués dans la survie à l'obscurité (et la reprise d'activité au retour à la lumière) des diatomées polaires, dans les conditions typiques de la nuit polaire dans les eaux marines arctiques, reproduites en laboratoire. Ce projet de recherche a bénéficié d'un financement alloué en 2016 par le

programme Human Frontier Science Program au Laboratoire International de Recherche Takuvik (Université Laval et CNRS, Québec) et à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS – Paris), qui en pilotent respectivement les volets physiologique et génétique. Une dizaine de personnes ont significativement contribué aux différentes phases du projet (écriture, mise en place des expériences et des protocoles, réalisation des expériences, échantillonnage et analyses), mais de nombreux autres chercheurs, étudiants, et professionnels de la recherche ont également apporté leur expérience et expertise dans de nombreuses facettes du projet, et ont régulièrement fourni une aide précieuse à la réalisation des expériences.

Les problématiques, objectifs et hypothèses scientifiques présentés ci-dessous n'évoquent pas l'ensemble des travaux réalisés au sein du projet *Green Life in the Dark*, mais seulement ceux qui sont directement associés au travail réalisé pendant cette thèse.

Chapitre 1

Problématique – Les cellules d'une même population ont-elles toutes le même destin ? La quasi-totalité des études physiologiques de la survie des diatomées lors d'acclimations à l'obscurité ont employé des méthodes ne renseignant que sur l'état moyen d'une population d'individus maintenus en culture (*bulk methods*). Cette limitation nous prive de la possibilité d'apprécier l'éventuel impact des variabilités inter-individuelles sur la survie au sein des populations.

Objectif – Étudier la réponse physiologique de *F. cylindrus* à un niveau unicellulaire pendant une acclimation à l'obscurité prolongée, ainsi qu'au retour à la lumière et ce, au moins jusqu'à la reprise de la croissance exponentielle des cultures, grâce à différentes méthodes de cytométrie en flux.

Hypothèse – L'utilisation de la cytométrie en flux permettra de distinguer et de suivre différents groupes de cellules dont l'état physiologique se différencie au cours de l'acclimation à l'obscurité et du retour à la lumière.

Chapitres 3 et 4

Problématique – L'implication de la consommation des réserves de carbone (qu'elle accompagne ou non la formation de cellules de résistance) dans la survie de certaines diatomées polaires a déjà été observée par le passé. Cependant, notre niveau de

compréhension de la dynamique du métabolisme du carbone à l'obscurité prolongé, que ce soit au niveau physiologique ou au niveau génétique, reste limité. Une vision globale fait encore aujourd'hui défaut. Par ailleurs, quasiment aucune étude n'a jusque-là exploité le potentiel des techniques biomoléculaires dans ce domaine d'étude.

Objectifs – (1) Intégrer une analyse de la variation de l'expression du génome dans la compréhension du métabolisme du carbone à l'obscurité chez une diatomée. (2) Étudier, avec une meilleure résolution que par le passé, les variations de la taille et de la composition de tous les grands compartiments de carbone intracellulaire dont la dégradation est susceptible de permettre le maintien de la viabilité.

En se basant sur la littérature, on peut penser que *F. cylindrus* pourrait utiliser l'hétérotrophie et/ou une forme de dormance pour survivre à l'obscurité (Palmisano et Sullivan 1982 et 1983). Cependant, ces hypothèses demeurent encore aujourd'hui spéculatives. Dans notre étude, nous avons choisi de priver les cultures de carbone organique.

La possibilité de formation de cellules de résistance n'était pas au cœur du projet, mais a fait l'objet de régulières observations microscopiques. Retenons cependant que la survie des formes de résistance repose, *a priori*, également sur la consommation des réserves.

Hypothèses – Sans apport d'énergie exogène, la survie repose, au moins en partie, sur la consommation des réserves de carbone accumulées avant l'obscurité

– Les sucres et les triglycérides servent de source d'énergie à court et long terme, respectivement, tandis que les protéines et lipides membranaires n'interviennent qu'une fois les deux premiers stocks épuisés.

Résumé de la planification des expériences et des tâches accomplies

Les expériences ont été conduites sur la souche de *F. cylindrus* dont le génome a été publié par T. Mock et collaborateurs en 2017. Une fois acclimatée à une lumière continue, la souche a été placée à l'obscurité totale pour des périodes de un, trois et cinq mois, avant d'être replacée dans le régime lumineux initial (Fig. 11). Ces trois expériences devaient

permettre d'étudier aussi bien l'acclimatation des cellules à l'obscurité que leur reprise d'activité, ainsi que l'effet de la durée d'obscurité sur la survie et la réacclimatation à la lumière. Une quatrième expérience de deux mois d'acclimatation à l'obscurité a été réalisée pour compléter les données.

Un système de culture a été conçu au sein du laboratoire Takuvik (Québec) pour les besoins du projet, incluant des incubateurs d'un volume maximum de 80 L (Fig. 12). Les expériences et la majorité des mesures physiologiques ont été effectuées dans les laboratoires de Takuvik, mais de nombreux échantillons ont également été confiés à d'autres laboratoires pour des analyses complémentaires (mesures biochimiques tels que sucres, lipides et protéines). Les échantillons destinés aux analyses biomoléculaires ont été pris en charge par l'IBENS. Le Tableau 1 donne la liste complète des mesures réalisées.

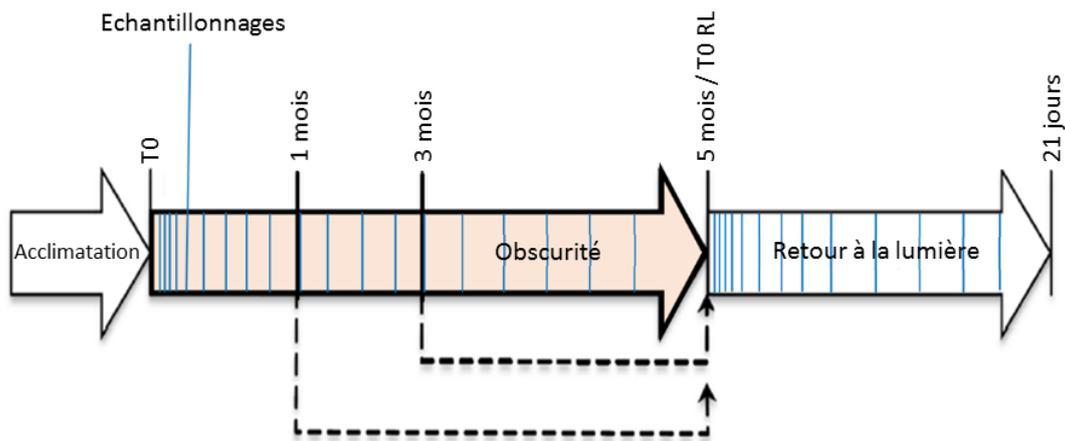


Figure 11. Plan des trois expériences d'acclimatation à l'obscurité prolongée. La fréquence d'échantillonnage est représentée de manière schématique par des barres verticales bleues.

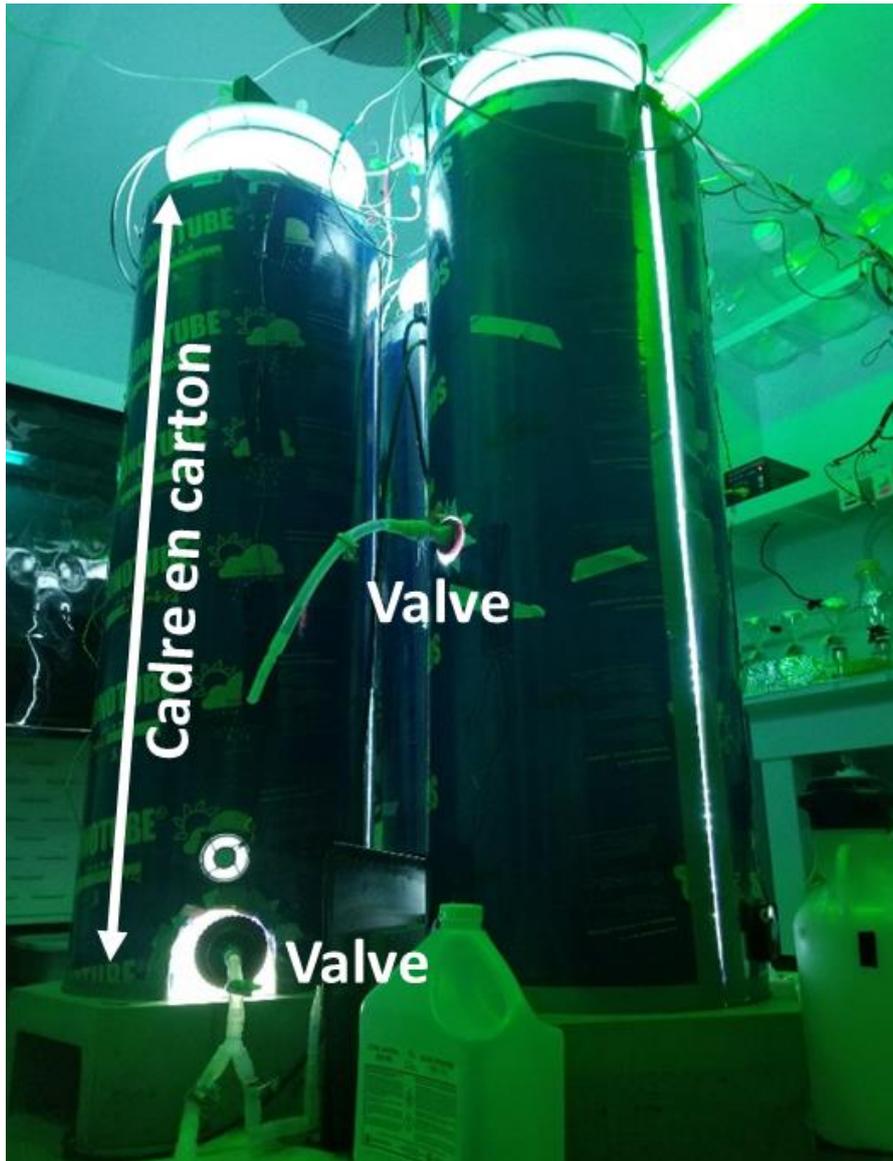


Figure 12. Photo de deux cylindres de 80 L utilisés pour cultiver *F. cylindrus* dans une chambre froide maintenue à 0 °C. Chaque cylindre repose sur un socle en béton. Leurs faces latérales sont isolées de l’environnement lumineux de la pièce par un cadre en carton cylindrique. Sur l’intérieur de ce dernier est apposé un système d’éclairage pour chaque cylindre (allumé ici ; voir détails dans la section Matériel et Méthode du Chapitre 1). Chaque cylindre est équipé de deux valves placées à mi-hauteur et en bas, qui permettent les divers prélèvements, respectivement en début et en fin d’expérience. Les couvercles en téflon (ouverts ici) placés au sommet des cylindres ont été préalablement percés afin d’introduire différentes sondes de mesure ainsi qu’un système de bullage dans les cultures.

Tableau 1. Liste des paramètres suivis pendant les expériences.

Catégories des paramètres	Paramètres
Conditions de culture	Température, salinité, pH, PAR
Nutriments	DIC, DOC, NO ₃ , NO ₂ , NH ₄ , SiO ₄
Population	Concentration, taille et volume cellulaire
Photosynthèse	Fv/Fm, ETR, NPQm
Pigmentation	Spectre absorption, composition pigmentaire (chl <i>a</i> et <i>c</i> , fucoxanthine, β-carotènes, xanthophylles : diadino-, diato-, viola-, zéa-, antéroxanthine)
Respiration	Taux de consommation d'oxygène
Fixation de carbone	Courbe P vs E
Composition élémentaire	Quotas cellulaires en C et N
Sucres	Chrysolaminarine et sucres totaux
Protéines	Protéines totales et photosynthétiques (PsbA, RbcL)
Lipides	Quantité des grandes classes de lipides, composition en acides gras des classes de lipides
Cytométrie en flux	Concentration cellulaire, fluorescence rouge, proxys de viabilité et du contenu en lipides neutres, fluorescence de l'ADN
Transcriptomique	RNAseq (pour l'acclimatation de 3 mois)

DIC : carbone organique dissous ; ETR : taux de transport d'électrons ; Fv/Fm : rendement photosynthétique maximum des photosystèmes II ; NH₄ : ammonium ; NO₂ : nitrite ; NO₃ : nitrate ; NPQm : atténuation non-photochimique maximale de la fluorescence variable; PsbA : protéine D1 du photosystème II ; P vs E : courbe photosynthèse *versus* irradiance ; PAR : rayonnement photosynthétiquement actif; RbcL : grande sous-unité de la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase ; RNAseq : séquençage de l'ARN ; SiO₄ : silicates.

Après avoir suivi une formation sur les cultures de microalgues en grands volumes au NCMA (Bigelow, USA) au début de ma thèse, j'ai été chargé lors de mon séjour au laboratoire Takuvik (deux premières années de thèse) de mettre en place et d'adapter des protocoles destinés à la cytométrie en flux. J'ai effectué les mesures et analysé les données afin de permettre à l'équipe du projet de surveiller l'évolution des cultures durant les expériences. Les résultats présentés dans le premier chapitre de cette thèse valorisent les mesures de tailles et de concentrations cellulaires, de la fluorescence rouge émise naturellement par les cellules, de contenu cellulaire en lipides neutres, de viabilité cellulaire, et de fluorescence de l'ADN après un marquage au SYBR Green. J'ai également compilé et analysé l'ensemble des données de physiologie générées au laboratoire Takuvik, dont une partie a été utilisée dans cette thèse. J'ai aussi interagi avec d'autres équipes de recherche en charge de certaines mesures de biochimie (analyses de lipides et sucres).

À l'IBENS (deux dernières années de thèse), j'ai compilé les connaissances actuellement disponibles sur le métabolisme du carbone des diatomées. Cela m'a permis d'identifier les gènes d'intérêt et de reconstruire les voies métaboliques associées (présentées dans le second chapitre). Ce travail a servi, dans le cadre du troisième chapitre, à l'analyse des données de RNAseq générées par Nathalie Joli (pour la partie laboratoire) et Ouardia Ait-Mohamed (pour la partie bio-informatique), respectivement étudiante postdoctorale et ingénieure de recherche à l'IBENS.

Durant les derniers mois de ma thèse, j'ai pu exploiter les données de biochimie obtenues grâce aux analyses d'échantillons effectuées par les laboratoires de Doug Campbell (Université de Mount Allison, Nouveau-Brunswick ; analyses protéines), d'Angelo Fontana (CNR-ICB, Naples ; analyses lipides) et de Graham Peers (Université de l'État du Colorado, USA ; analyses sucres)

Chapitre 1 - Destins possibles des cellules de *Fragilariopsis cylindrus* lors d'une obscurité prolongée

1.1 Résumé

Aux hautes latitudes, la nuit polaire représente un défi important pour les organismes photosynthétiques qui doivent survivre jusqu'à six mois sans lumière. De nombreuses études ont déjà mis en évidence les changements physiologiques impliqués dans l'acclimatation des microalgues à une obscurité prolongée et à une ré-illumination subséquente. Cependant, ces études, n'ont principalement été menées qu'avec des mesures *bulk* ne prenant pas en compte la variabilité interindividuelle. Par ailleurs, des périodes d'acclimatation aussi longues sont susceptibles d'avoir un impact sur les processus de sélection au sein d'une population. Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que des sous-populations distinctes avec des traits spécifiques peuvent émerger pendant l'acclimatation d'une population de diatomées à l'obscurité. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant la cytométrie en flux qui permet de caractériser individuellement un grand nombre de cellules. La diatomée pennée polaire *Fragilariopsis cylindrus*, écologiquement dominante aux pôles, a été soumise à trois expériences d'acclimatation à l'obscurité d'une durée d'un, trois et cinq mois, au cours desquelles toutes les cultures ont repris leur croissance une fois la lumière de nouveau disponible. Les résultats suggèrent que la survie dans l'obscurité de *F. cylindrus* repose sur la réduction de l'activité métabolique et la consommation des réserves de carbone. En outre, l'emploi de la cytométrie en flux nous a permis d'enregistrer trois causes de mort différentes, chacune étant partagée par un nombre important d'individus. La première a rendu les cellules incapables de survivre au stress causé par le retour à la lumière, probablement en raison d'un manque de défenses photoprotectrices. Les deux autres ont été observées dans deux sous-populations de cellules dont l'état physiologique avait dérivé de celui de la population d'origine. Les données suggèrent qu'un épuisement des ressources énergétiques et la faillite du maintien de la dormance était à l'origine de la mortalité enregistrée dans ces deux sous-populations.

Mots-clefs : Cytométrie en flux, physiologie, diatomée polaire, nuit polaire, obscurité prolongée, survie.

1.2. Abstract

At high latitudes, the polar night poses a great challenge to photosynthetic organisms that must survive up to six months without light. Numerous studies have already shed light on the physiological changes involved in the acclimation of microalgae to prolonged darkness and subsequent re-illumination. However, these studies have never considered inter-individual variability because they have mainly been conducted with bulk measurements. On the other hand, such long periods are likely to impact within-population selection processes. In this study, we hypothesized that distinct subpopulations with specific traits may emerge during acclimation of a population of diatoms to darkness. We addressed this hypothesis using flow cytometry, which allow to individually characterize large numbers of cells. The ecologically dominant polar pennate diatom *Fragilariopsis cylindrus* was subjected to three dark acclimation experiments of one, three, and five months duration, during which all cultures showed signs of recovery once light became available again. Our results suggest that darkness survival of *F. cylindrus* relies on reduction of metabolic activity and consumption of carbon reserves. In addition, flow cytometry allowed us to record three different causes of death, each shared by significant numbers of individuals. The first rendered cells unable to survive the stress caused by the return to light, probably due to a lack of sufficient photoprotective defenses. The other two were observed in two subpopulations of cells whose physiological state deviated from the original population. The data suggest that starvation and failure to maintain dormancy were the cause of cell mortality in these two subpopulations.

Key words: Flow cytometry, physiology, polar diatom, polar night, prolonged darkness, survival.

1.3. Introduction

Rapid and strong abiotic environmental variations occurring in marine polar ecosystems pose a great challenge to microorganisms. At high latitudes, primary production (PP) is mainly generated by diatoms that often dominate blooms below the ice pack and in the water column when the snow and ice start to melt during spring (Poulin et al. 2011; Sakshaug 2004; Von Quillfeldt 2000). These cells typically experience an extreme light cycle over the year due to the high latitudes at the poles: summer is marked by a continuous light period of up to several months, while winter is characterized by an equally long dark period known as the polar night (up to six months) (see Karsten et al. 2012; Cohen et al. 2020). In addition, light availability is drastically influenced by the dynamics of snow and sea ice, among other abiotic factors (e.g., Mundy et al. 2014). In this context, one essential question that remains unsolved is how diatoms, which spend extended periods deprived of any light source, manage to survive and start to proliferate again the following year.

Surviving without being able to perform photosynthesis means firstly being able to maintain metabolism via a durable alternative energy source. The alternative energy source could be intracellular or extracellular (dissolved organic carbon present in the surrounding environment). It has been proposed that diatoms could rely on three different strategies to survive darkness. The first is the consumption of cellular carbon reserves existing mainly as triacylglycerides (neutral lipids; NL) and chrysolaminarin (carbohydrates) (Biersmith and Benner 1998; Darley 1977; Hu et al. 2008; Villanova et al. 2017). In addition, functional biomass (i.e., proteins, nucleic acids and structural lipids) was also observed to be consumed in the dark (Anderson 1976; Handa 1969; Schaub et al. 2017). The second strategy is the formation of resistant/dormant cells, the two forms known for diatoms being resting spores (or resting cysts) and resting cells (see McQuoid and Hobson 1996). Both are characterized by a reorganization of cytoplasmic material (Pitcher 1990; du Preez et Bäte 1992; Sicko-Goad et al. 1986 and 1989), the function of which is yet to be understood, but spores differ from resting cells by the presence of thicker frustules, and sometimes the addition of siliceous spines on its surface (Pitcher 1990; Sugie et al. 2010). While spores have already been reported during darkness acclimation (Smayda and Mitchell-Innes 1974), they are mostly observed during nutrient stresses (see McQuoid and Hobson 1996), unlike resting cells (Anderson 1976; Palmisano and Sullivan 1983; du Preez and Bäte 1992; Sicko-Goad et al. 1989). The third and last strategy is the use of secondary heterotrophy. Although diatoms are generally

considered as obligate autotrophic organisms, it has long been known that some species can assimilate certain sources of organic carbon present in the surrounding environment (Hellbust and Lewin, 1977; Lewin 1953; Zhang et al. 1998). Bowler et al. (2008), in sequencing the genome of *Phaeodactylum tricornutum*, found that the complex evolutionary history of diatoms has resulted in them retaining some genes from a heterotrophic ancestor, and has also been punctuated by lateral transfers of bacterial genes that enable diatoms with heterotrophic potential. In 2016, Traller et al. sequenced the nuclear genome of *Cyclotella cryptica*, a diatom capable of heterotrophic growth (see Pahl et al. 2010 and references therein) and revealed the presence of a wide range of sugar transporters. In 2017, Villanova et al. also showed in a light-grown strain of *P. tricornutum* that the addition of a dissolved organic carbon (DOC) source could drastically affect the management of its carbon metabolism, both at the physiological and molecular levels. In particular, the addition of glycerol to the culture medium led to an increase in the storage and consumption of lipids (TAG reserves in particular) and carbohydrates. More recently, studies have been conducted to improve industrial production processes of molecules of interest by using a DOC source such as glycerol to induce mixotrophic growth in diatom cultures (see Yang and Wei 2020 and references therein). These studies suggest that heterotrophy may, in addition to supporting basal metabolism in the dark, increase survival potential based on mobilization of reserves when they are built up prior to the complete disappearance of light.

Although some diatoms may actively grow on external sources of DOC, the very low cell concentrations observed in water and ice during the polar winter (Horner and Schrader 1982) suggest that most species do not possess a strong enough heterotrophic potential, or that the availability of DOC is not high enough to support significant growth. All of the three strategies mentioned above are likely accompanied by a cessation of growth as well as a significant slowing of metabolism. This would decrease the rate of consumption of available resources and increase survival time.

To be able to resume normal activity when light returns, it is necessary for cells to have been able to maintain the integrity of essential functions during darkness. Photosynthesis is obviously one of them. Preparation for resumption of growth therefore involves maintaining a viable photosynthetic apparatus as well as the ability to survive light stress. Various studies have shown that the chl *a* and ribulose-1,5-biphosphate

carboxylase/oxygenase content of diatoms only decreases slightly during a period of prolonged darkness (Lacour et al. 2019; Peters and Thomas 1996). The same is true for diadinoxanthin and diatoxanthin contents (Lacour et al. 2019; Morin et al. 2019), which are responsible for generating a strong non-photochemical quenching (NPQ) during light stress (Lavaud et al. 2002). In addition to the maintenance of NPQ in darkness, other reported mechanisms that may help diatoms to successfully recover from long periods of darkness include the management of reactive oxygen species generated during reillumination, partial restructuring of PSII that can be rapidly reversed when light returns, maintenance of active ATP synthase mediated by chlororespiration, and possible alternative electron sinks to limit photodamage (Lacour et al. and references therein). Finally, it should be noted that cellular recovery likely has an energy cost that must be met by the resources available at the end of the dark period to rebuild what was lost/compromised during darkness (Peters and Thomas, 1996).

While long term dark survival of polar (and temperate) microalgae has already been extensively studied (see Wulff et al. 2008 for review; Kamp et al. 2011: nitrate respiration in dark and anoxic conditions; Kennedy et al. 2019: respiration of lipids, carbohydrates and proteins; Kvernvik et al. 2018: maintenance of the activity of the photosynthetic machinery; Lacour et al. 2019: influence of light intensity on recovery after darkness and photosynthesis management; Martin et al. 2012; Reeves et al. 2011: influence of temperature on dark survival and photosynthesis capacity; Morin et al. 2019: photosynthesis management; Schaub et al. 2017: influence of temperature on carbohydrate and lipid consumption; Veuger and Oevelen 2011: pigment degradation, Walter et al. 2017: influence of short light periods during darkness on survival), the mechanisms triggering each of these strategies as well as their relative importance remain however unclear. Studies are typically based on a rather narrow set of key physiological parameters (e.g., pigmentation, growth rate, cell size), and most, if not all, previous studies, with the exception of Naik and Anil (2018) which deals with *Tetraselmis indica* (chlorophyte) survival in darkness, have based their approach on classical physiological techniques used to obtain bulk values of measured properties, rather than single-cell properties. This can greatly limit the ability to understand survival strategies in the dark. Indeed, previous studies only provide access to the mean values of the parameters studied, whereas any change in growth conditions could trigger a spectrum of responses and physiological states within a population. The inability to take this inter-individual

variability into account can significantly affect interpretation of the data, especially if part of the population loses viability during the treatment.

Here, we use single-cell data obtained by flow cytometry (FCM), combined with more conventional physiological methods, to better assess the different fates of a polar diatom during long term dark acclimation (DA) and subsequent re-illumination. FCM systems offer the advantage of being able to rapidly analyze a large number of cells (i.e., hundreds per second). They also benefit from the availability of numerous off-the-shelf fluorescent dyes that allow diverse physiological analyses to be performed, such as cell viability, cell cycle progression, apoptosis occurrence, reactive oxygen species detection, membrane potential, etc. Three long term acclimation experiments to total darkness of one, three, and five months were carried out on axenic batch cultures of the polar pennate diatom *Fragilariopsis cylindrus*. Each dark treatment was followed by up to three weeks re-acclimation to light. FCM measurements allowed us to follow the survival of *F. cylindrus* during each of these treatments and permitted us to identify different subpopulations during darkness. They were distinct from the initial population and experienced different fates following the return to light.

1.4. Materials and methods

1.4.1 Biological material

The experiments were conducted on a monoclonal axenic strain of *F. cylindrus* (Grunow) Krieger isolated from the strain CMMP1102 (National Center for Marine Algae and Microbiota, Bigelow, USA). This psychrophilic microalga is one of the dominant species regularly recorded at the poles, both within ice and in subsequent planktonic blooms (Kang and Fryxell 1992, Gleitz and Thomas, 1993, Von Quilfeldt 2000).

1.4.2. Culture system and experimental planning

Before the experiments, *F. cylindrus* was cultivated in semi-continuous stable conditions in different vessels of incremental volumes that allowed to reach sufficient biomass

required for the experiments (see supplementary methods section 1.8.1). For each of the three experiments, triplicates of cultures were cultivated in 80 L glass cylinders (diameter: 30 cm, height: 140 cm) that were placed in a cold room (0° C). *F. cylindrus* was grown in artificial seawater enriched with Aquil medium (Price et al. 1989). The culture medium was filtered successively on two polypropylene felt filter bags of 0.1 µm and 1 µm (Cole parmer, CAT# OF-01516-04 and CAT# OF-01516-20) and two pleated filter cartridges of 0.2 µm (GE Memtrex MP E filter, MMP921AAE-E; Cole parmer, FV- 06479-60) before it was sterilized with a UV lamp (Q30IL, Aquamerik, QC, Canada). Cultures were kept homogeneous through agitation with a magnetic stirrer. Temperature was maintained at 0 ± 1 °C for the whole duration of the experiments. The cultures were bubbled with air successively filtered through a carbon filter (Carbon Cap 75, Whatman®) and an integral venting 0.2 µm filters (PolyVENT 500, Whatman®) to avoid limitation in dissolved inorganic carbon and dissolved oxygen. After a minimum of two weeks acclimation at $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in semi-continuous cultivation, triplicates of cultures growing exponentially were transferred to total darkness after they reached a cell concentration close to $1.0 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$. The cultures were submitted to DA of either one month (29 days), three months (88 days), or five months (145 days). At the end of each DA phase, cultures were re-exposed to the initial light conditions to follow the recovery of growth (return to light = RL). Experiments were terminated either three weeks after RL, or when the growth began to be nutrient-limited, whichever came first. The sampling frequency was high after the two light shifts and was progressively reduced as cell physiology stabilized over time (see section 1.4.3. about studied parameters below). Overall, at least two samplings were conducted per week.

The lighting system consisted of a cardboard cylinder adapted to the shape of the cylindrical tanks. On the inside, evenly spaced LEDs generated cold white light that passed consecutively through five filters: a non-polarizing diffuser filter, three gelatin-colored filters (LEE filters, ref 138, 007, 137) and a 30%-transmittance neutral filter. The light spectrum can be found in supplementary methods section 1.8.2. Ventilation systems were installed at the basis of the cylinders to evacuate the heat generated by the light system.

In acclimation experiments, control cultures are often monitored in parallel with cultures subjected to the treatment being studied to ensure that the observed responses are solely

due to the treatment. For long periods of time such as those tested in this study (i.e., one to five months), cells exposed to constant light in a closed system would continue to grow until they quickly become limited by one or more nutrients. Therefore, the cultures would not only be compared based on the light conditions to which they are exposed, but also based on their different nutrient status. Another option would have been to regularly dilute cultures exposed to constant light with fresh media to maintain exponential cell growth (semi-continuous system). But this would also imply a difference in nutritional status. In addition, dilutions are known to sometimes temporarily disrupt the physiology of microalgae. Therefore, the control cultures in this study were considered inappropriate.

1.4.3. Studied parameters

1.4.3.1. Flow cytometry

Cell concentration and proxies for cell size, chlorophyll *a* (chl *a*) and neutral lipid contents (NL), viability, axenicity and DNA fluorescence were measured at least two times a week (see details in supplementary methods section 1.8.3) using a flow cytometer (Guava® easyCyte™ BGV HT, Millipore-Merck KGaA, Darmstadt, Germany, catalog No. 0500-4030) equipped with a blue laser (488 nm, 150 mW) for excitation of chl *a* and the different molecular probes. Fluorescence emissions were measured with red (695/50 nm) and green (512/18 nm) filters, for chl *a* and the different dyes, respectively. This implies that double staining with different dyes could not be made. The stability of the cytometer readings was checked regularly by addition of calibration microbeads to every sample (Fluoresbrite® Polychromatic Red Microspheres 2.0 µm, catalog No. 19508-2, Polysciences Inc, Warrington, USA). Prior to each measurement, dye solutions of various molecular probes and suspensions (see details below) containing calibration microbeads were prepared with salted filtered Milli-Q® water (S = 40; purification system Thermo Scientific Barnstead Nanopure). The dye working solutions were thawed at room temperature and a few microliters of each solution were transferred in a 2 mL Eppendorf microtube® safe lock containing water (see details below). The dye solutions were then cooled in ice prior to cell inoculation. The samples were prepared in flat bottom clear sterile 96-well microplates (ref: 655161, Greiner Bio-One International, Austria) placed on ice. The dye solutions were distributed in the microplates before 40 to 125 µL of

culture were added to reach a cell concentration between 3.0 and 4.0×10^5 cell mL^{-1} in $250 \mu\text{l}$ of sample. The samples were mixed gently with a pipette a first time after cell inoculation, and a second time before the analysis. All the staining protocols were performed in darkness. Prior to each series of measurements, the dye solutions were used as blanks and also served to check the cleanliness of the cytometer. Each measurement was performed in triplicate for each of the biological replicate (i.e., three cultures for each DA treatment) and a minimum of 5,000 events were counted. For contaminant detection we used SYBR Green (see protocol below), and 20,000 events were counted in order to increase the probability of detecting any contamination, but only one replicate was performed for each culture due to time constraints (see Figure S1.1 for examples of cytograms from each of the four sample types described below). Data were analyzed with the Guava InCyte™ Software (version 3.1).

All equipment was either UV-sterilized or autoclaved prior to use, and sample handling was conducted under a laminar flow hood when necessary.

Cell concentration, cell size and chlorophyll *a* – Cell concentration, forward scattering (FSC, cell size proxy) and red fluorescence naturally emitted by chl *a* excited with blue light, were assessed without the addition of any dye.

Neutral lipids – To estimate the NL cell content, BODIPY® 505/515 (4,4-Difluoro-1,3,5,7-Tetramethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene; ThermoFisher, catalog No: D3921) was used. This type of BODIPY is a membrane permeant that can bind to NL. Upon binding NL, it emits a green fluorescence (em. 500/510 nm) when excited with blue light (max. ex. 488 nm). Some studies have shown that BODIPY® 505/515 has a particularly good affinity for cytoplasmic lipid droplets that mainly contains triacylglycerides (see Rumin et al. 2015 and references therein). Measurement of BODIPY fluorescence thus allowed a semi-quantitative estimation of NL since the intensity of fluorescence is correlated with the amount of stained reserve lipids. The BODIPY commercial solution was dissolved in 99% anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO) in order to produce a stock solution of $500 \mu\text{M}$. We used the final concentration determined as optimal by Morin (2017) whose Master's degree also focused on the survival of *F. cylindrus* in extended darkness. Working solutions of 1.5 mL were prepared by dissolving the stock solution 20-fold in 99 % DMSO in 2 mL Eppendorf tubes® (final concentration $25.4 \mu\text{M}$), and stored in darkness at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. During the analysis, the volume of BODIPY working

solution added into the dye solution was adjusted to reach a final concentration of 0.33 μM and 1.32% DMSO once mixed in the culture sample. Samples were stained during one hour in a styrofoam box filled with ice.

Viability – Within a highly concentrated culture, there is no simple way of knowing how many cells are either alive, dying, or already dead. Different proxies of viability are thus routinely utilized, including membrane permeability and enzymatic activity, sometimes combined together, in order to obtain more accurate results (Olsen et al. 2016). Because it was expected that metabolism would be dramatically diminished during long periods of DA, we decided to monitor viability by checking the membrane permeability of cells with SYTOXTM Green Nucleic Acid Stain - 5 mM Solution in DMSO (ThermoFisher, catalog No: S7020) (Peperzack and Brussaard 2011). When the cytoplasmic membrane is damaged and has lost its integrity, SYTOX Green can penetrate the cells and bind to the DNA. The latter then emits a green fluorescence (504/523 nm) when excited with blue light (max. ex. 588 nm), that allows to distinguish dead/dying cells from the viable ones. Viability is then expressed as the percentage of non-stained cells. The efficiency of the protocol was verified with mixtures of healthy and heat-treated cultures. Surprisingly, the protocol worked much better at room temperature (22 °C). Keeping cells at high temperatures (i.e., compared to culture conditions) during the staining did not introduce a bias by affecting the viability of the samples. SYTOX Green working solutions were prepared by diluting the commercial solution one hundred-fold in 35 % DMSO in Milli-Q water and were stored in the dark at -20 °C. During the analysis, the volume of SYTOX Green working solution added to the dye solution was adjusted to reach a final concentration of 1 μM once mixed in the culture sample. Samples were stained for one hour at room temperature.

Axenicity control and DNA fluorescence – We monitored for possible bacterial contamination of cultures with SYBRTM Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO (ThermoFisher, catalog No: S7563). SYBR Green is membrane permeant and stains nucleic acids once it has entered the bacterial (or microalgal) cells (with the following preferential affinity: double stranded DNA >> single stranded DNA > RNA). Once bound, it emits a green fluorescence (max. em. 520) when excited with blue light (max. ex. 497 nm). This dye allows detection of organisms (usually bacteria) that may be mingled with the noise if they are too small or not characterized by any auto-

fluorescence emission. SYBR Green working solutions were prepared by diluting the commercial solution one hundred-fold in 35 % DMSO in Milli-Q water and stored in darkness at -20 °C. During the experiments, the volume of SYBR Green working solution added to the dye solution was adjusted to reach a final concentration of 2X once mixed in the culture sample. Samples were stained for one hour in a styrofoam box filled with ice.

1.4.3.2. Measurement of other physiological parameters

The sampling frequency of the following parameters was the same as for FCM analysis (see supplementary methods section 1.8.3).

Cell concentration and cell size – Cell concentration and cell size (in μm) were also estimated in triplicates with a Beckman Multisizer 4e Coulter Counter (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) equipped with a 50 μm aperture tube. The culture aliquots were diluted in salted Milli-Q water ($S = 36$) 40 or 80 times depending on the cell concentration. The Coulter Counter was calibrated using 10 μm latex beads (COULTER CC Size Standard L10, REF: 6602796, Beckman Coulter).

Particulate carbone – Twenty milliliters of culture were filtered onto precombusted (450 °C for 4 hours) glass-fiber filters (Cytiva® GF/F, 25mm, 0.7 μm nominal porosity) before they were dried and kept desiccated until analysis. The cell carbon quota was estimated in triplicate with a CHN analyzer (2400 Series II CHNS/O; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

Pigment content – One aliquot of 10 mL was sampled for each culture and filtered on glass-fiber GF/F filters (0.7 μm , 25 mm, Whatman®) for pigment analysis. The filters, conserved in 2 mL polypropylene cryovials (internal thread cap), were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Chlorophylls *a* and *c*, β -carotenes, zeaxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, fucoxanthin, diadinoxanthin and diatoxanthin contents per cell were estimated by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Ras et al. (2008) using a Zorbax Eclipse XDB-C₈ 3.5 μm column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

1.4.4. Statistical methods

Statistical tests were conducted on R v. 3.6.2 (R Core Team, 2021). In the following paragraph, packages to which functions belong are only mentioned if the functions are not included in the base-R package stats v. 3.6.2 (R Core Team, 2019). Shapiro-Wilk test (function `Shapiro.test()`) showed that the data compared with statistical tests were not following a normal distribution. Significance of the differences between data collected at different time points was tested with a paired Wilcoxon's test (function `wilcox.test()`). When different populations of cells of a same CMF sample were compared, unpaired Wilcoxon's test was used. When time series of a parameter for different cell populations were compared, the test was applied to the values of the time point for which the average difference between populations was smallest. One-sided alternative hypotheses were mentioned when used. To test the significance of correlations between parameters, Spearman's correlation coefficient (ρ) were calculated with the associated p-value (function `cor.test(method = "spearman")`). The stationary character of time series have been tested with Kwiatkowski-Phillips-Schmidt-Shin test (`kpss.test()`) from the package `tseries` v. 0.10-48; Trapletti and Hornik, 2020). Multimodality of cell size distributions was tested with Hartigans' Dip Test (function `dip.test()`) of the package `diptest` v. 0.76-0; Maechler, 2021). To test the significance of differences between treatments (i.e., DA length) a Kruskal-Wallis test was applied (function `kruskal.test()`). The significance level was set at 5 % ($\alpha = 0.05$).

1.5. Results

1.5.1. Influence of DA length and re-illumination on cell survival and recovery

In each of the three treatments the *F. cylindrus* cultures survived darkness and, following re-illumination, we were able to detect an increase in cell volume (data not shown) and concentration (see Table 1.1). The latency time prior to cell division increased with the darkness phase duration (p-value < 0.02), as already observed in previous studies (Karsten et al. 2012; Naik and Anil 2018; Peters 1996; Peters and Thomas 1996; see Table 1.1).

Table 1.1. Average viability, survival rate and growth parameters upon re-illumination. Each point is the mean of technical replicates of the three biological replicates (n = 9) ± standard deviation.

Survival and growth indexes	1 month	3 months	5 months
Viability (%) at T0	99.0 ± 0.16	99.2 ± 0.16	97.9 ± 0.62
Viability (%) cells before RL ^a	98.5 ± 0.35	98.9 ± 0.40	50.0 ± 0.50
Viability decrease (%) during RL ^b	2.21 ± 2.93	28.33 ± 3.78	46.9 ± 4.50
Days before increase of the concentration ^c	0.80	5	7
Growth rate (d ⁻¹) ^d	0.31 ± 0.00	0.31 ± 0.02	0.27 ± 0.12

^a Viability at T0_{RL}, just before the light system was turned back on.

^b Viability difference between T0_{RL} and the lowest value recorded during RL.

^c Time of RL at which the first increase of viable cells concentration was recorded.

^d Calculated by linear regression on natural logarithm transformed concentration of viable cells data corresponding to the exponential growth phase (i.e., linear part of log transformed concentrations curve).

In darkness, cell viability decreased significantly in the 1 and 5-month DA treatments according to statistical tests (p-values: 0.004, 0.9, 0.002 for 1, 3 and 5 months, respectively, with viability at T0 “greater” than viability at day 87 of DA) but was only important in the latter. In the 5-month DA, the decrease began around day 30 and tended to accelerate exponentially over time (see Figure S1.2). Viability did not decrease significantly during the 3-month DA treatment. The proportion of cells dying during RL also increased with DA length, to the extent that the FCM data from the 5-month DA treatment were often too noisy due to large amounts of dead/dying cells. On the other hand, the one-month DA treatment was too short to see changes in cell populations that were observed over the course of the other experiments (3- and 5-month DA). We therefore chose to focus on the results of the 3-month DA treatment.

1.5.2. Carbon consumption

Overall, the NL content and carbon quota appeared to decrease continuously during DA (Fig. 1.1). The steeper decrease observed for these two parameters between the beginning of DA and day 3 results in part from some cells still dividing early in DA (see below). Indeed, when not normalized by cell concentration, the DOC data do not follow a significantly different trend during the first few days than the rest of the DA (data not shown, trend KPPS test p-value > 0.1).

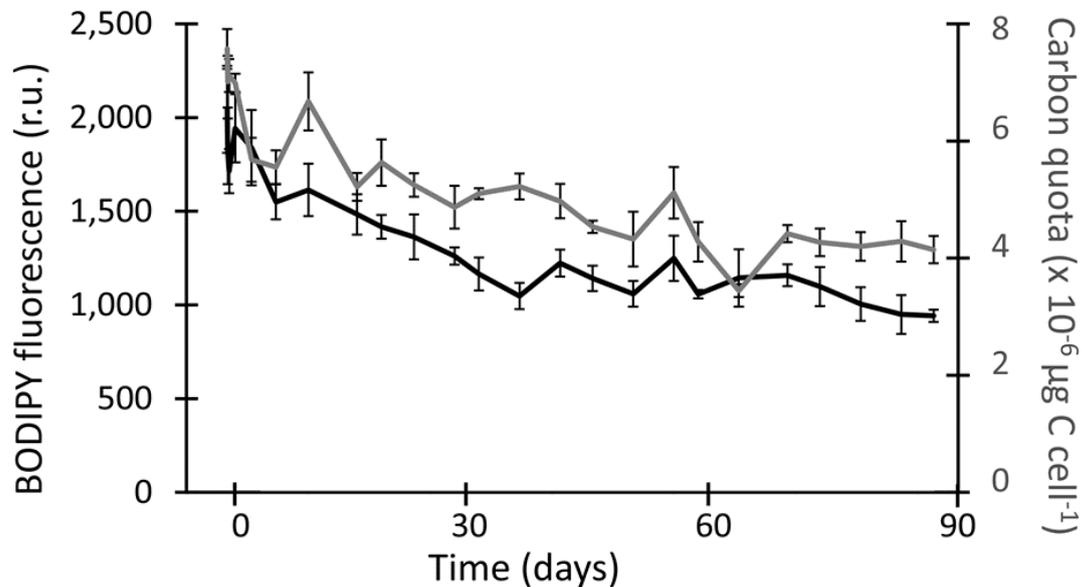


Figure 1.1. Mean BODIPY green fluorescence (neutral lipids) and carbon quota during the 3-month DA. Each point is the mean of technical replicates of the three biological replicates (n = 9) with their standard deviation as the error bars. Neutral lipid content is expressed as relative units (r.u.).

1.5.3. Cells experience different fates

Cytometry data showed that two subpopulations, respectively named P2 and P3, that did not exist at the beginning of the darkness period, emerged from the initial population (P1) over time during DA (Fig. 1.2). P2 was characterized by its lower red fluorescence (chlorophyll) and FSC (size proxy) values, whereas P3 displayed a higher green fluorescence upon staining with SYBR Green. This section focuses mainly on what characterizes and distinguish P1, P2 and P3.

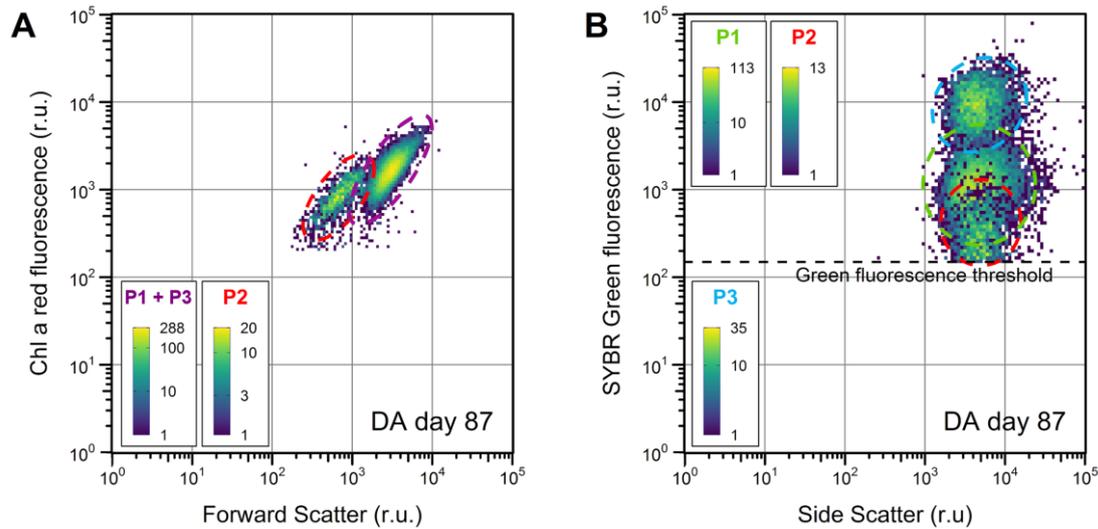


Figure 1.2. Density scatter plot showing P1, P2 and P3 after three months of darkness. **(A)** Plotting the red fluorescence as a function of the forward scatter allows to distinguish P2 from P1 and P3. **(B)** Plotting the SYBR Green data as a function of the side scatter allows to distinguish P3 from P1 and P2. The procedure used to statistically confirm the existence of three distinct populations as they are defined here is detailed in supplementary methods section 1.8.4. Relative units (r.u.).

1.5.3.1. P1: Cells that survived darkness

Between the beginning and the 6th day, cell concentration increased by $14.1 \pm 9.2 \%$, indicating that some cells continued to divide (Fig. 1.3; p-value < 0.005 , with average cell concentration “greater” at T0). Nymark et al. (2013, and references therein) have previously reported that *P. tricornutum* cells complete an ongoing cell cycle when placed in the dark. Morin et al. (2019) and Lacour et al. (2019) made the same observation with *F. cylindrus* and *Chaetoceros neogracilis*, respectively. The total cell concentration then remained stable until the end of DA but after 30 days in the dark, the abundance of P1 cells began slowly to decrease while P2 and P3 populations began to emerge (Fig. 1.3).

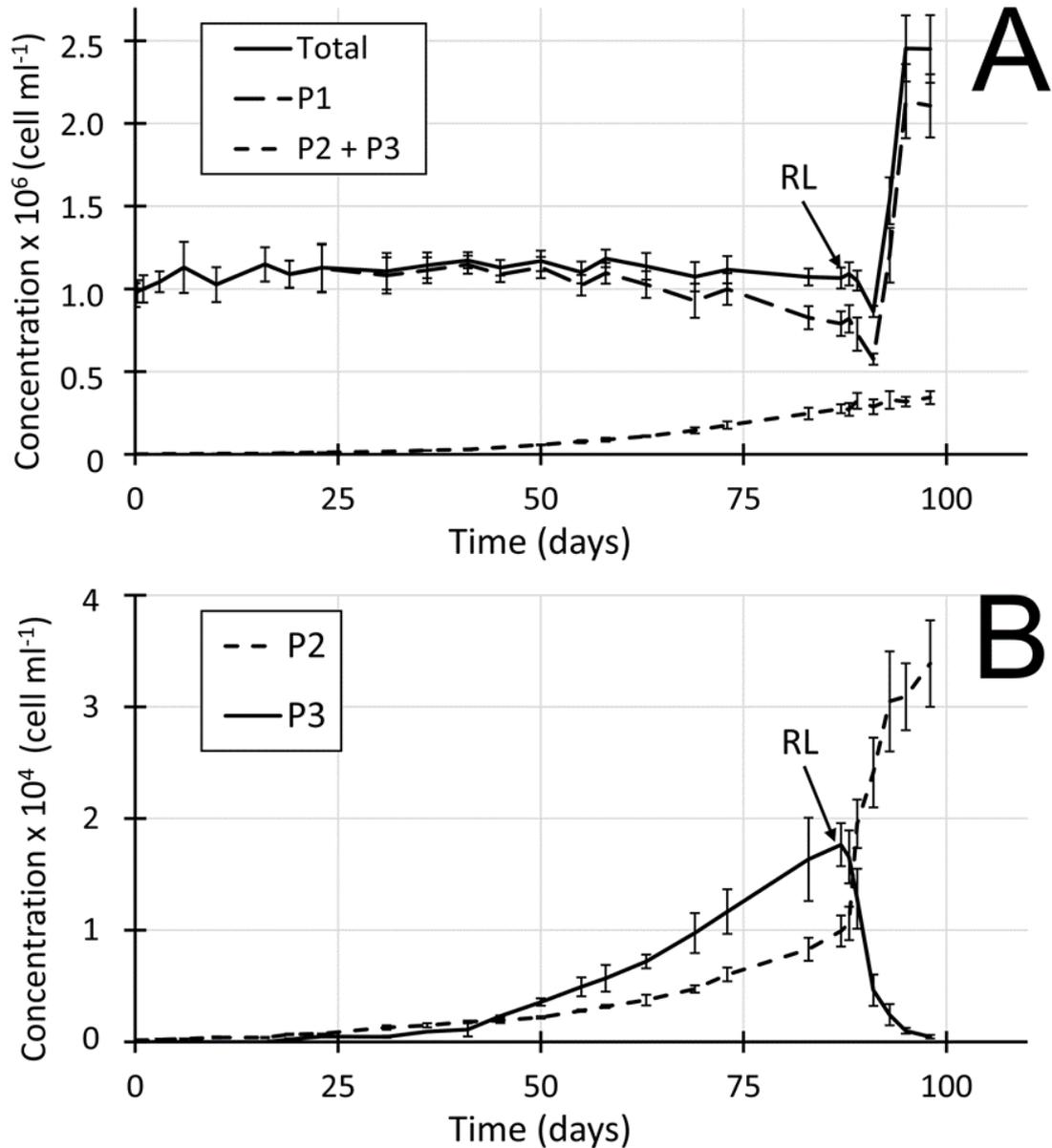


Figure 1.3. Mean cell concentrations during 3-month DA and subsequent RL. The first panel shows that the growth of P2 and P3 and the decrease observed in P1 are concomitant and of similar magnitude during DA. P2 and total cell concentrations were estimated in flow cytometry samples without addition of dye. Each point is the mean of technical replicates of the three biological replicates ($n = 9$). Cells belonging to P1 and P3 could only be distinguished from each other in SYBR Green samples in which the number of cells detected may vary slightly with staining efficiency. Therefore, for each sampling time and each culture, P1 and P3 concentrations were first estimated in the SYBR Green samples before the concentrations were corrected by being multiplied by the ratio of (P1+P3) concentrations measured in SYBR Green and samples without dye. For these two populations, each point is the mean of the three biological replicates ($n = 3$) as only one technical replicate was made for SYBR Green. Error bars represent the standard deviation.

Average FSC and chlorophyll fluorescence of the P1 population slowly decreased during DA, and then increased during the first 24 h of RL before they stabilized between 3 and 5 days post re-illumination (Fig. 1.4).

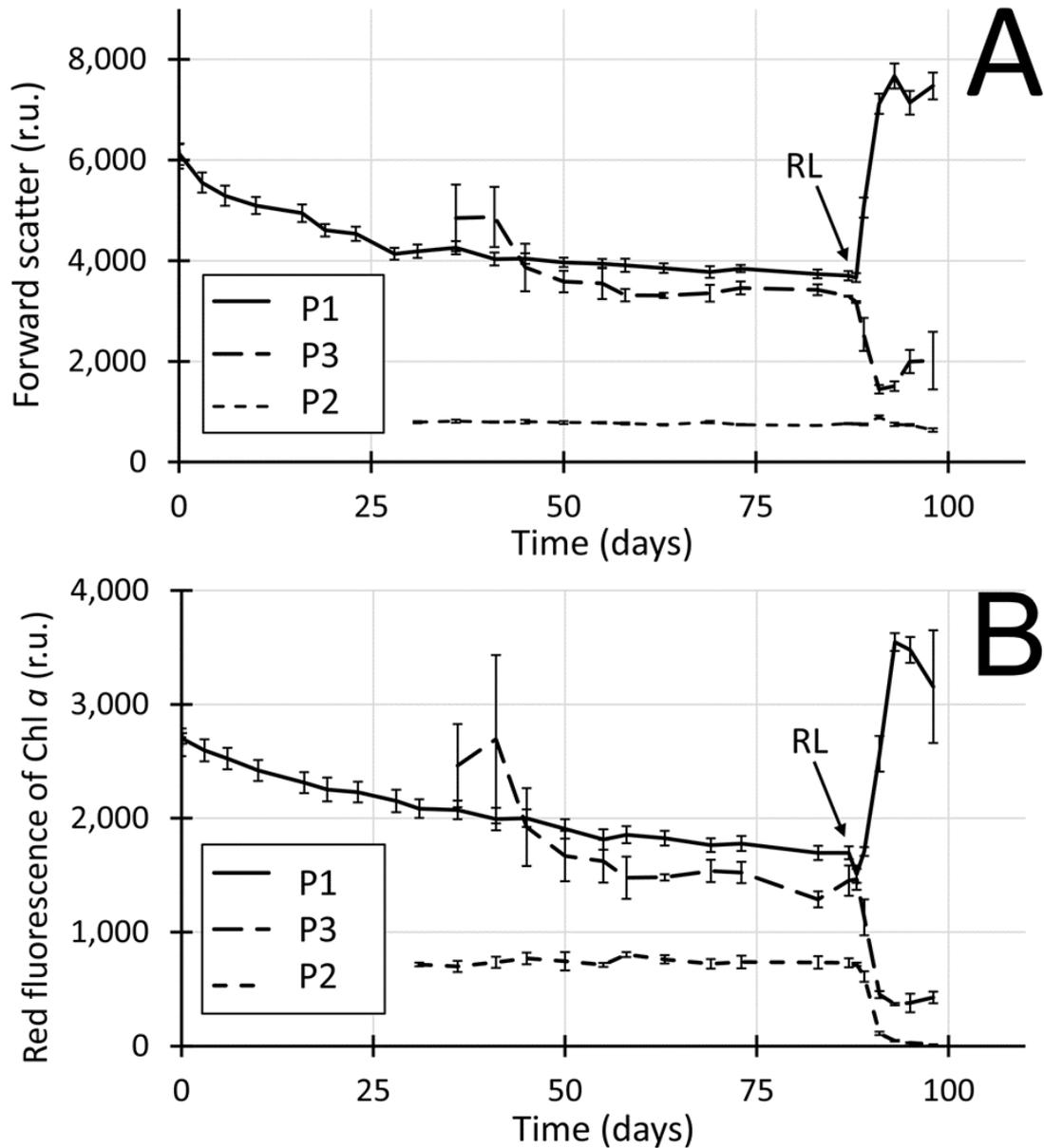


Figure 1.4. Mean forward scatter and red fluorescence during the 3-month DA and subsequent RL. Data for P2 and P3 were only plotted from the day they represented at least 1 % of the total cell concentration (i.e., day 31 and 36 of the DA, respectively). SYBR Green samples have been used to retrieve data of P1 and P3 which could only be distinguished in these samples. The red fluorescence was not affected by staining with SYBR Green. The average of the ratio of the values obtained for samples with SYBR Green and without die was of 1.00 ± 0.04 . FSC was, on the other

hand, systematically underestimated by approximately 17 % in SYBR Green samples (ratio: 0.83 ± 0.02). For each of the two parameters, values retrieved from the SYBR Green data have been corrected by being divided by the corresponding average ratio. Each point is the average of three biological replicates ($n = 3$) with their standard deviation as the error bars. Because P2 was characterized by a very low SYBR Green fluorescence, some cells were below the threshold set in the protocol and were not detected. Therefore, data for P2 were retrieved from the samples without die. Each point is the mean of three technical replicates of the three biological replicates ($n = 9$) with their standard deviation as the error bars. Forward scatter and red fluorescence are expressed as relative units (r.u.).

SYBR Green allows to stain and detect DNA. It was originally used to detect the possible presence of contaminating organisms, but because the DNA staining of *F. cylindrus* changed unexpectedly during the experiment, and followed an intriguing pattern (Fig. 1.5), we decided to include it in the analysis. The average green fluorescence of P1 decreased from 20,000 to less than 8,000 counts during the first 24 hours of darkness. It then decreased at a lower rate before stabilizing at around 3,000 counts at around day 23 of DA. Afterward, it did not change significantly until RL (level KPSS test p-value = 0.08), when it began to increase and reached values similar to the initial ones after a few days (Fig. 1.5).

Note that because the different fluorescent probes used in this study are characterized by similar excitation and emission wavelengths, double staining was not possible. Moreover, it will be shown later that two of the populations identified as P3 could only be distinguished from P1 after being stained with SYBR Green fluorescence. Consequently, obtaining BODIPY fluorescence for only P1 or P3 populations was not possible.

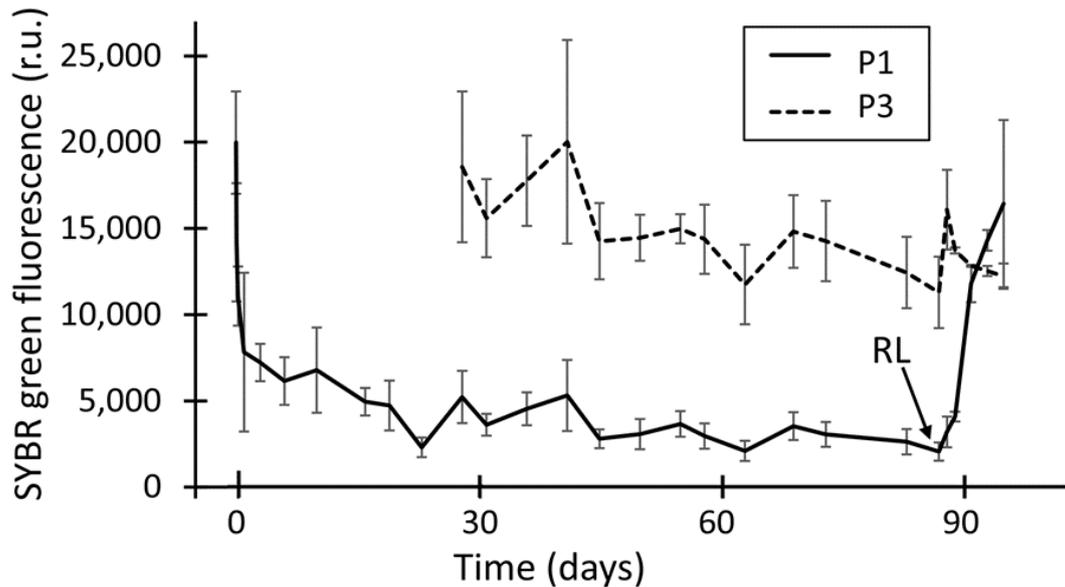


Figure 1.5. Mean SYBR Green fluorescence of P1 and P3 during the 3-month DA and subsequent RL. Because some cells of P2 were characterized by a very low SYBR Green fluorescence, they were below the threshold and not detected. Data for P2 are therefore not available. Each point is the mean of the biological replicates ($n = 3$). SYBR Green fluorescence is expressed as relative units (r.u.).

1.5.3.2. P2: Population characterized by low red fluorescence, FSC and lipid content

After a few weeks, a distinct cloud of cells (denoted P2) began to appear on cytograms and grew exponentially ($\mu = 0.045 \text{ d}^{-1}$) (Fig. 1.3B, see Figure S1.3). This new subpopulation accounted for approximately 1% of the whole population after 31 days of DA, and for $9.31 \pm 1.08 \%$ after 3 months of DA. Since the total cell concentration was stable during DA (Fig. 1.3A), we can conclude that the P2 (as well as P3) population was composed of cells derived from P1. Red fluorescence and FSC of P2 remained stable for the whole DA duration (Fig. 1.4; level KPSS test p-values for red fluorescence and FSC: 0.056 and > 0.1). Also, the values of these two parameters were significantly lower in P2 than in the P1 population (Fig. 1.4; p-values < 0.005 and < 0.01 for red fluorescence and FSC, respectively, with values of P1 “greater” than those of P2). Forward scatter is commonly used as a proxy for cell size. However, Coulter counter data suggested that these cells were not actually smaller than P1 cells, as we could not distinguish two size populations (see Figure S1.4; Hartigan Dip’s test p-value for each culture: 0.91, 0.71, 0.49). Rather, because the average FSC was strongly correlated with the average red

fluorescence and BODIPY fluorescence during DA (i.e., chl *a* and NL contents, see Figure S1.5) (ρ for each culture at T0: 0.96, 0.95, 0.97; p -values < 0.001), we propose that the FSC signal was mainly driven by changes in the cellular content of dense material and related changes in the refractive index that modulate light scattering (e.g., Bricaud et al. 1988).

The viability of P2 cells estimated with SYTOX Green, although slightly lower than that of P1, remained high until the end of DA (above 90 %, see Figure S1.6A). However, a careful examination of the SYBR Green data revealed that the DNA of these cells was not properly stained because its average green fluorescence values were close to background levels (see Figure S1.7).

Before and during the whole DA, the shape of the cloud regrouping P1 and P3 indicates that the cells had a NL content proportional to their chl *a* content (Fig 1.6A; Spearman correlation coefficients for P1 at T0 and at the end of DA: 0.76 and 0.71; p -values < 0.001). This is not surprising considering that larger cells have, on average, higher chl *a* and carbon quotas. However, this relationship between the BODIPY fluorescence and chl *a* was much lower for P2 as data points were further spread apart and losing their collective “droplet” shape (Fig. 1.6A; Spearman correlation coefficients for P2 at the end of DA: 0.39; p -values < 0.001). Moreover, the mean BODIPY green fluorescence of P2 never varied in the dark (level KPSS test p -value > 0.1), was much lower than in P1 and P3 (p -value < 0.001 with P1 and fluorescence “greater” than P2 fluorescence), and was very similar to background noise (between 100 and 400 counts; Fig. 1.6B).

During RL, the red fluorescence of P2 decreased rapidly (Fig. 1.4B) and the relationship between autofluorescence and FSC observed in healthy populations was partially lost (see Figure 1.S8). Note that P2 cells were neither stained by SYTOX Green (see Figure S1.6B) nor SYBR Green during RL. The cell concentration of P2 increased during the first days of RL because some cells from other populations (mostly P3 cells, see next section about P3) transitioned the same physiological state (i.e., low red fluorescence and FSC).

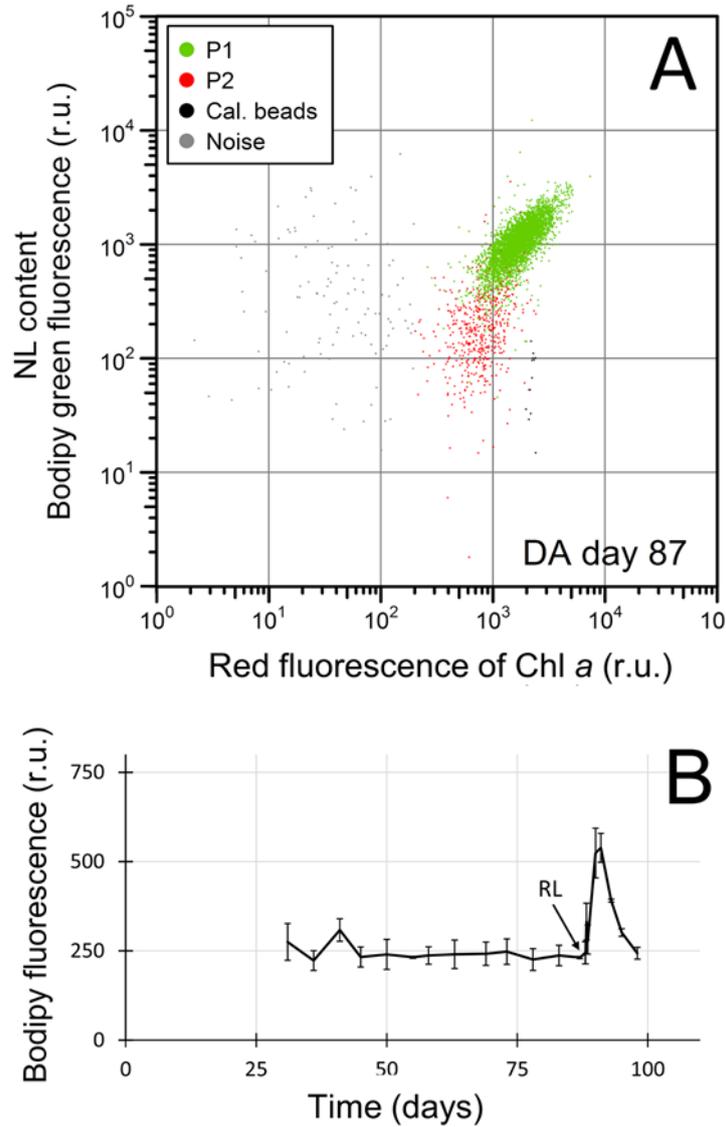


Figure 1.6. BODIPY fluorescence of P2. Relative units (r.u.). **(A)** Cytogram showing the pattern of BODIPY green fluorescence of P1 and P2 at the end of DA after staining with BODIPY. Cal. beads = calibration beads. **(B)** BODIPY fluorescence for P2 during the 3-month DA and subsequent RL. Data have been plotted after P2 had grown enough to represent more than 1 % of the total cell concentration (i.e., day 31). Each point is the mean of the technical replicates of all biological replicates ($n = 9$) with their standard deviation as the error bars. Vertical bars represent the standard deviation.

1.5.3.3. P3: A population with high SYBR Green fluorescence

Concomitant with the appearance of the P2 population, another population distinct from P1 appeared and grew exponentially ($\mu = 0.053 \text{ d}^{-1}$) up to RL (Fig. 1.3B, see Figure S1.9).

It accounted for more than 1 % of the culture after 36 days of DA, and 16.71 ± 2.94 % after three months. Cells belonging to P3 could be distinguished from the others by a much stronger SYBR Green staining (p-value < 0.005 with P3 fluorescence “greater” than P1 fluorescence) whose values were very close to those of P1 prior to darkness and a few days after RL (Fig. 1.5, see Figure S1.9). Although lower on average, values of FSC and red fluorescence were very close to those of P1 (Fig. 1.4), to the extent that P3 could not be differentiated from P1 on cytograms based only on FSC or red fluorescence (Figure S1.10). Like for P2, these two parameters did not vary significantly during DA (level KPSS test p-values > 0.1). The decreases observed between day 36 and day 58 (Fig. 1.4) were probably due to some cells of P1 being counted as P3 cells. Indeed, two cells from P1 bound together can be counted as one event by the FCM. Such an event would be characterized by a very high SYBR Green fluorescence (parameter used to distinguish the two populations) and attributed to P3. Because the concentration of P3 was very low during this time, a small amount of P1 cells could markedly influence the red fluorescence and FSC averages. Such a bias is visible in the decrease of standard deviation between day 36 and 58 (Fig. 1.4). Because double staining was not an option, P3 could not be distinguished from P1 based only on SYTOX Green data. However, the viability of the population containing P1 and P3 was still close to 99 % at the end of DA (data not shown), so we can assume that P3 cells were still healthy.

During RL, while P1 showed signs of recovery (increase in FSC, red fluorescence, and DNA fluorescence; Fig. 1.4 and Fig. 1.5) the FSC and red fluorescence of P3 rapidly decreased to low levels (Fig. 1.4) and cells from P3 became progressively indistinguishable from P2 in terms of red fluorescence and FSC (see Figure S1.11). Finally, cell concentrations of P3 also decreased rapidly (Fig. 1.3B, see Figure S1.12). During the first three days of RL, before any growth could be observed and while P2 concentrations increased by $1.42 \pm 0.25 \times 10^5$ cell mL⁻¹, P3 concentrations decreased by $1.35 \pm 0.18 \times 10^5$ cell mL⁻¹ (Fig. 1.3B).

1.6. Discussion

The aim of this study was to assess the evolution of carbon and NL contents in *F. cylindrus* during DA, as well as to examine the fate of individual cells. Overall, the data

suggest that *F. cylindrus* cells rely on metabolic downgrading and carbon consumption for dark survival. Moreover, flow cytometry offered valuable insights into the possible fates of *F. cylindrus* cells when they undergo long periods of darkness such as encountered during the polar night. It allowed us to identify distinct cell subpopulations, each characterized by different survival capabilities. Evidence is presented here for three potential physiological states that rendered some of the cells unable to recover upon re-illumination.

1.6.1. Metabolic slowdown and carbon consumption

The consumption of carbon reserves associated with a reduction of metabolism is thought to be one of the strategies on which diatoms could rely to survive prolonged darkness. Gleitz and Kirst (1991) showed that diatom-dominated assemblages could significantly increase their investment of newly fixed carbon in lipids when light exposure was severely reduced (from 81 or more to less than 20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Their results suggest that lipids may account for more than 30 % of total fixed carbon and thus may be a major energy source for survival during the polar night. Like Morin et al. (2019) and Schaub et al. (2017), our results do indicate that consumption of reserve lipids is part of the survival strategy of diatoms exposed to prolonged darkness. However, in our experiments, the summer to winter transition was simulated by immediate transfer of cultures from constant light to total darkness. Therefore, cells did not benefit from a gradual decrease in light before the start of DA like in the natural environment or as in the study by Gleitz and Kirst (1991). Under non-limiting growth conditions, lipids for example make up only a small percentage (10 %) of macromolecular dry weight of *P. tricornutum* cells, with less than 50 % of it being found in TAGs (Remmers et al. 2018). This is supported by the results of Gleitz and Thomas (1993), Thomas and Gleiz (1993), Palmisano et al. (1988) and Tillman et al. (1989), who showed that in polar diatoms (both in the field and in cultures), the relative amount of photosynthetically assimilated carbon invested into lipids is between 5 and 20 % when temperature is at or below 0 °C. In contrast, low molecular weight metabolites (primarily free amino acids and monosaccharides) are almost systematically the compartment in which carbon is most invested, sometimes accounting for more than 50 % of total fixed carbon. Fahl and Kattner (1993) showed that although TAGs may represent the most abundant lipid class

in polar diatom cells in both water and ice communities, lipids do not, however, represent a large portion of the dry weight (less than 15 % in ice assemblages, and less than 5 % in pelagic communities).

Excluding the three first days of DA during which some cells were still dividing, the carbon quota decreased on average by 29.11 ± 6.15 %. Given the observations reported above, a decrease in carbon quota as large as measured here probably exceeded the initial amount of storage lipids in *F. cylindrus* at the beginning of DA. This suggests that *F. cylindrus* may have consumed other types of carbon-rich molecules to fuel its metabolism, as reported by Handa (1969) in *Skeletonema costatum* during a 10-day DA. The potential of other carbon compartments should therefore be investigated in the future.

At the beginning of DA, the SYBR Green data revealed an unexpected two-step decrease (within 24 h and 3 weeks). While the last rounds of cell division in some cells within the first three days of DA may explain part of this decrease, it cannot account for all of it. The decrease in SYBR Green fluorescence could have resulted from a decrease in plasma membrane permeability that could slow the staining. However, extending the staining time from 30 min to 2 h made no difference. In addition, the efficiency of SYTOX Green and BODIPY staining were never affected. A wide variety of processes acting on DNA, RNA and proteins are known to be involved in the regulation of cellular activity (review by Talbert et al. 2019). Some of these, such as histone (de)acetylation and (de)methylation, can alter the DNA landscape by condensing or expanding chromatin to varying degrees. The most packed areas of the genome are known as heterochromatin whereas the least packed are denoted euchromatin. Formation of densely packed heterochromatin is suspected to provide a rapid means of making DNA physically unavailable to the transcription machinery. During nucleosome packing, the minor groove in the DNA, where SYBR Green binds, tends to be compressed and curved (Alberts et al. 2002). As a consequence, it can be “*kinked or alternately shifted*”, reducing its accessibility (Richmond and Davey 2003; Ong et al. 2007). We therefore propose that the observed changes in SYBR Green fluorescence in darkness (that were reversed rapidly upon re-illumination) are the indirect sign of a higher degree of DNA packaging that allows *F. cylindrus* to shut down non-essential functions and to lower metabolic activity (i.e., a decrease in the consumption rate of its reserves) in the dark. This would increase

its survival time but, as a consequence, also prevent the fluorescent molecule from binding to large areas of the genome.

1.6.2. P1: Survival during darkness does not guarantee growth recovery following re-illumination

While surviving without any external source of energy is the first challenge met by microalgae during the polar night, they can only participate in the new production season if they also manage to recover growth when light is available again. According to the viability data, most cells survived a 3-month DA. However, some of them, showing signs of degradation before and during RL (for P2 and P3, respectively), did not recover during RL. These cells were dead or virtually dead (i.e., unable to recover activity). This partly explains the significant decrease in viability observed during RL (-28.2 ± 4.1 % after three days). In addition to cell death within the P2 and P3 populations, 20.7 ± 4.7 % of the cells were no longer detectable after three days (day at which the viability reached a minimum). Assuming that all P2 and P3 cells died, and knowing their concentrations before RL, we can deduce that P2 and P3 populations represented 21.0 ± 1.8 % and 37.8 ± 6.9 % of the total cells that died during RL, respectively. Therefore, the remaining 41.2 ± 8.0 % of the dead cells (or approximately 18 % of all cells) died as a result of light stress. Because no cells died after one-month of DA we can conclude that this percentage increases with the length of DA, indicating that the cells weaken over time in darkness. The size of the remaining carbon pools may be of great importance during prolonged DA as it may help the cells to withstand light stress and rebuild what is necessary (i.e., pigment content, consumed and recycled material) to fully and quickly recover when light becomes available. However, NL content and carbon quota data showed a constant decrease during DA. Conversely, red fluorescence and HPLC dosages of pigments showed that the amounts of chl *a* and *c*, β -carotenes, fucoxanthin and diadinoxanthin linearly decreased during DA (the total amount of these pigments decreased by 28.9 ± 10.4 % between day 3 and the end of DA, see Figure S1.13). The loss of pigments involved in photoprotection could have led to a decrease in photoprotective defenses over time, making them less likely to survive RL.

1.6.3. P2: Neutral lipid depletion and metabolic reduction

Cells belonging to P2 formed a population characterized by lower red fluorescence and NL content that grew exponentially following four weeks of darkness. They remained in a stable state until RL, after which they did not survive or show any sign of activity, their content being promptly degraded or released in the medium. The temporary increases of both P2 FSC and BODIPY fluorescence were probably the consequence of other cells (i.e., cells from P1 and P3) dying and entering the P2 physiological state. Indeed, while the concentration of P1 and P3 decreased, that of P2 increased.

The low and stable values of red fluorescence may reflect a partial degradation of chlorophyll to primary degradation products occurring when the cells enter the P2 state. These degradation products, such as pheophytin, may require photo-oxidation to further degrade to non-fluorescent metabolites, as observed during RL. During DA, SYBR Green seemed to be unable to stain these cells, indicating that the nucleic acid within P2 cells was probably degraded. If the DNA could not be stained by SYBR Green, it also means that the viability estimates obtained by SYTOX Green, which suggested that P2 was mostly viable, were actually not reliable for this population. During RL, the cells remained unstained with SYTOX Green or SYBR Green, confirming that they lost their DNA. We therefore consider that these cells were likely to be dead.

BODIPY measurements showed that the green fluorescence emitted by cells belonging to the P2 population was probably not generated upon binding with NL. Instead, we can assume that green fluorescence was generated by the presence of non-bound dye (see Rumin et al. 2015 and references therein). Govender et al. (2012) showed that, while concentrations of BODIPY 505/515 of 0.058 and 0.067 $\mu\text{g mL}^{-1}$ resulted in insufficient and optimal staining of NL in *Chlorella vulgaris*, respectively, a concentration of 0.083 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was too high and generated a “bright background fluorescence” that hindered data collection. The concentration used in the present study was close to 0.082 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the end, P2 cells appeared to be devoid of NL.

Collectively, all these elements suggest that these cells died during darkness. As *F. cylindrus* slowly consumed its NL content during DA, one possible limitation to its survival would be the size of its initial NL pool. Cells belonging to P2 could have died due to a depletion of their NL and could represent the fate of cells that exceeded their

survival capacities. Interestingly, at the beginning of the 5-month DA, the mean NL content of the cells was only around 60 % of the values obtained in the 3-month DA (mean green fluorescence value before darkness: 1206.26 ± 215.56 vs 2043.50 ± 215.56 ; p-value < 0.001 with 3-month DA values “greater” than 5-month DA values). The average carbon quota at T0 was also lower and represented around 84 % that of the 3-month DA cultures (mean carbon quota value before darkness: $5.89 \times 10^{-6} \pm 6.97 \times 10^{-7}$ vs $7.02 \times 10^{-6} \pm 5.04 \times 10^{-7}$ $\mu\text{g C cell}^{-1}$; p-value < 0.001 with 3-month DA values “greater” than 5-month DA values). If *F. cylindrus* does indeed rely on its NL content to survive darkness, this could explain why the cultures seemed to have a lower survival success during the 5-month DA, as they started to die after one month of darkness according to the viability data (see Table 1.1 and Figure S1.2).

1.6.4. P3: Sleepwalker cells

Like P2 cells, the P3 population started to appear and to become more apparent following a couple weeks of darkness. But unlike P2, they were very similar to P1 in which they were evenly distributed and could not be distinguished on the basis of FSC, red fluorescence or NL content. They could only be identified based on higher SYBR Green fluorescence.

In some organisms, the increase of DNA fluorescence upon SYBR Green staining could be explained by a duplication of the genome that can offer different advantages to a cell such as an increased metabolic activity (Frawley et Orr-Weaver 2015). But even though observations of polyploid diatom cells have been made in the past (see von Dassow et al. 2008 and references therein; Koester et al. 2010; Mann 1994; van Tol et al. 2017), there is no solid evidence that diatoms are actually capable of endoreduplication (Huysman et al. 2014). The decrease in SYBR Green fluorescence observed in P1 at the beginning of DA can therefore be interpreted as a consequence of metabolic reduction. The finding that SYBR Green values of P3 were very close to those observed in active cells before DA could illustrate a change in chromatin structure synonymous with reactivation of cellular activity. P3 may be composed of cells whose dormancy system failed and led cells to death as they were not able to recover during RL.

During RL, FSC and red fluorescence of P3 cells decreased very rapidly to reach values similar to those of P2. While the concentration of P3 was dramatically decreasing (before they completely disappeared), the P2 population was increasing. This suggests that during RL, P3 lost their DNA and could not be detected on this criterion anymore, becoming therefore indistinguishable from P2. On the basis of Figure S1.12 it could be argued that we cannot be sure whether or not the population identified as P3 was really composed of cells from P3, and whether P3 cells were really converted to P2 cells. But the relative positions of these clouds during RL (see Figure S1.12), the variations of their parameters (Fig. 1.4), as well as their respective cell concentrations (Fig 1.3B), suggest that the blue cloud (see Figure S1.12) was indeed P3 and that cells belonging to this population all died and entered into a state similar to that of P2. In support of this, it should be noted that at the end of the darkness period of the 5-month DA experiment, when P3 and P2 represented a large majority of the cells in all cultures (data not shown), only 8 % of the cells survived in the culture in which cell survival rate was the highest, indicating that a vast majority of the cells did not survive.

Finally, one might consider that P3 cells in darkness could be an intermediate state of P2 cells. At the end of the 5-month DA, most of the cells belonged to P2 or P3 (data not shown). If the above hypothesis was verified, we probably should have seen the P3 concentration decrease to P2 before the end of DA, which did not happen. While more evidence is needed, P2 and P3 therefore do not appear to be related.

1.7 Conclusion

In the present study, microscopic observations did not visually reveal the presence of any resting cells or spores. During acclimation experiments mimicking summer to winter transitions, Palmisano and Sullivan (1982) measured an increase of the heterotrophic potential of *F. cylindrus*. The ability of *F. cylindrus* to use heterotrophy is also suggested by transcriptome data of Mock et al. (2017). In the present study, however, no source of DOC was added to the culture medium and so heterotrophy was presumably not an option. Instead, our results suggest that *F. cylindrus* relies on a lowered metabolism combined with low consumption of neutral lipid reserves (and potentially other carbon pools), the depletion of which ultimately condemns the cells that were no longer stained by BODIPY.

A biochemical analysis of the main carbon reservoirs, and in particular triacylglycerides, would be necessary to support this hypothesis. The fate of P3 cells is more obscure.

It should also be kept in mind that the strain studied was isolated over 40 years ago. It was deposited in the NCMA culture collection in 1982 by G. Fryxell. It has been cryopreserved since 2007 but has likely been in culture since then, so it is possible that it has drifted genetically from the original strain and is no longer representative of individuals found in their natural habitat. Despite this caveat, the choice was made to study this strain because it is the only polar diatom whose genome has been sequenced (Mock et al., 2017).

Flow cytometry has been instrumental for allowing the single cell approach reported here, and combining the information from different fluorescent probes has proven to be extremely useful. In the future, FCM could be an even more valuable tool as some cytometers are equipped to sort cells. Isolating different populations in order to observe them separately with different microscopic devices, for instance, could help us better understand the precise changes that occur in the different populations observed as well as the different cellular parameters on which selection pressure is exerted during the polar night.

1.8. Supplementary methods

1.8.1. Preparation of cultures: *F. cylindrus* growth conditions before the start of the experiments

Table 1. 2. Prior to experiments, *F. cylindrus* cells were maintained in stable semi-continuous culture conditions and cultivated in incremental volumes to reach a final volume of 80 L of acclimated culture in each cylinder.

Culture vessels	Culture medium	Incubator	Temperature and light intensity	Culture volume	Cultivation time	[Cell] range (cell ml ⁻¹)	Dilution in fresh medium	Growth rate (day ⁻¹)	Ventilation	Stirring
Glass tube (50 mL)	Aquil ^a	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE ^{b,c}	25 mL	NA	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	NA	Screw cap not closed	No
Erlenmeyer (250 mL)	Aquil	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE	125 mL	NA	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	NA	Permeable foam plug	No
Erlenmeyer (500 mL)	Aquil	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE	250 mL	NA	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	NA	Permeable foam plug	No
Erlenmeyer (1 L)	Aquil	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE	500 mL	NA	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	NA	Permeable foam plug	No
Erlenmeyer (2 L)	Aquil	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE	1 L	NA	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	NA	Permeable foam plug	No
Erlenmeyer (4 L)	Aquil	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE	2 L	NA	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	0.27 ± 0.05	Filtered bubbled air ^d	Bar magnet
Polycarbonate Carboys (8 L)	Aquil	Percival E-36VL	0 ± 1 °C 30 µE	2 L	1 week	0.5 – 6.0 x 10 ⁶	Twice a week	0.32 ± 0.03	Filtered bubbled air	Bar magnet

Polycarbonate	Aquil	Percival	0 ± 1 °C	4 L	1 week	0.5 – 6.0	Twice	a	0.32	±	Filtered	Bar
Carboys (8 L)		E-36VL	30 μ E			$\times 10^6$	week		0.03		bubbled air	magnet
Polycarbonate	Aquil	Percival	0 ± 1 °C	8 L	1 week	0.5 – 6.0	Twice	a	0.32	±	Filtered	Bar
Carboys (8 L)		E-36VL	30 μ E			$\times 10^6$	week		0.03		bubbled air	magnet
Glass cylinders	Aquil	Cold room	0 ± 1 °C	20 L	1 week	0.5 – 6.0	Twice	a	0.35	±	Filtered	Bar
(80 L)			30 μ E			$\times 10^6$	week		0.12		bubbled air	magnet
Glass cylinders	Aquil	Cold room	0 ± 1 °C	50 L	1 week	0.5 – 6.0	Twice	a	0.35	±	Filtered	Bar
(80 L)			30 μ E			$\times 10^6$	week		0.12		bubbled air	magnet
Glass cylinders	Aquil	Cold room	0 ± 1 °C	80 L	2 weeks	0.5 – 6.0	Twice	a	0.35	±	Filtered	Bar
(80 L)			30 μ E		before DA	$\times 10^6$	week		0.12		bubbled air	magnet

^aPrice et al. (1989)

^b1 μ E (micro Einstein) = 1 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$

^cLight system and other spec of the Percival model E-36VL (Percival, Iowa, USA) can be found on the reference sheet: <https://www.percival-scientific.com/product/e-36vl/>

^dBubbled air filtered on a carbon filter (Carbon Cap 75, Whatman®) and an integral venting filter 0.2 μ m (PolyVENT 500, Whatman®)

1.8.2. Light spectrum in the cylinders

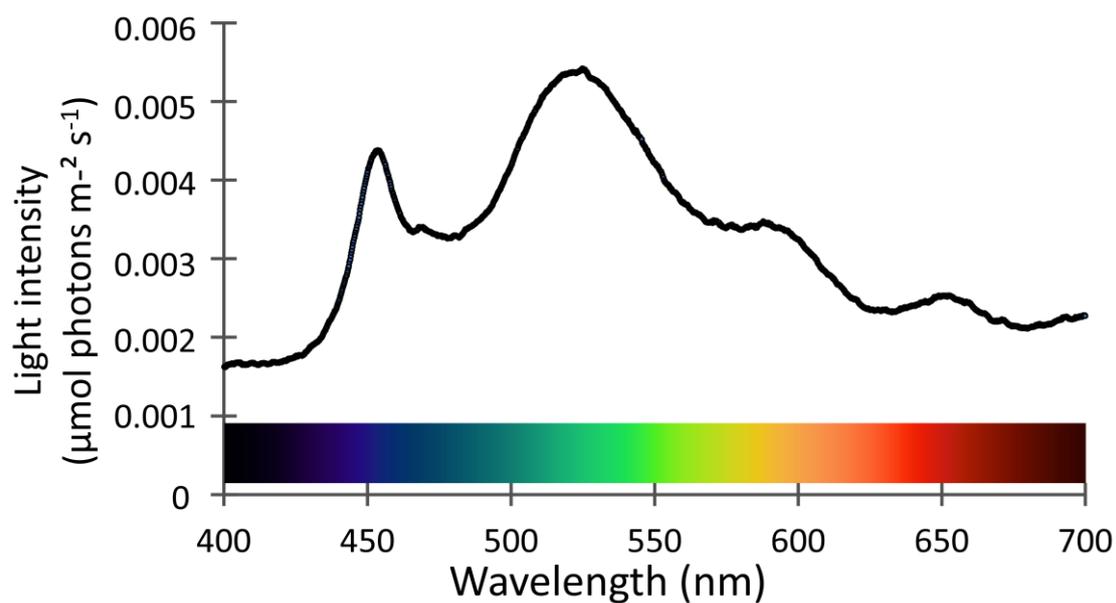


Figure 1.7. The integral of the curve equals 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The light intensity was measured with a radiometer USB-4000 (Ocean Insight) every 21 nm. The light probe was placed in the middle of the cylinders.

1.8.3. Sampling timeline

Table 1.3. Sampling timeline for each of the two experiment phases of the three DA. For RL, the sampling times mentioned are the times since re-illumination. In each experiment, the light system was started 24 hours after the last sampling time of DA.

Experiment phase	1-month DA	3-month DA	5-month DA
Sampling times during darkness acclimation (days)	0, 1, 3, 7, 13, 16, 20, 26, 29	0, 0.8 ^a , 0.25 ^a , 1, 3, 6, 10, 16, 19, 23, 28, 31, 36, 41, 45, 50, 55, 58, 63, 69, 73, 78 ^{a,b} , 83, 87	0, 1, 5, 7, 12, 16, 23, 30, 37, 42, 47, 51, 56 ^b , 61, 63, 69, 72, 77, 82, 91, 97, 100, 105, 110, 113, 118, 121, 126, 131, 135 ^b , 140, 145
Sampling times for return to light (days)	0.02 ^b , 0.08 ^b , 0.25 ^b , 0.5 ^b , 1, 3, 5, 7	0.02, 0.08 ^b , 0.25 ^b , 0.5 ^b , 1, 2 ^b , 3, 5, 7	0.02, 0.08 ^b , 0.25 ^b , 0.5 ^b , 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 ^a

^aNo HPLC sample

^bNo SYBR Green samples. Because the sampling frequency was high during RL, and because SYBR Green was originally used only to monitor contaminating organisms, it was decided, for time reasons, to analyze SYBR Green samples only once on day one.

1.8.4. Identification of distinct cell populations on the cytograms

1. The beads and the noise were manually removed from the data to allow the clustering of the cells
2. Manual selection of the parameters allowing to distinguish putative distinct populations based on observations of the cytograms generated with Guava InCyte™ Software (version 3.1): FSC, red fluorescence and green fluorescence for samples stained with SYBR green. Red fluorescence and FSC for other treatments.
3. On R (v. 3.6.2), the function `mclustICL()` from the package `mclust` (v. 5.4.2) was used to determine the optimal number of clusters (n) in each cytogram based on the integrated complete-data likelihood criterion for model-based hierarchical clustering (Biernacki et al. 2000, Scrucca et al. 2016).

4. Because the concentrations of P2 and P3 were most of the time much smaller than those of P1, the clustering method often considered P2 and P3 as P1 cells. In order to overcome this issue, the concentration of P1 was decreased to match the smallest concentration: thresholds that allow to approximately discriminate the populations were set on the available FCM parameters. The concentration of P1 was then reduced by randomly removing cells from the data. Cells were attributed to their respective population by clustering. The cells that were previously removed were attributed to P1.
5. The function `hclust()` from the `stats` package (v 3.6.2) were used to define the `n` clusters (i.e. attribute each event to a cluster) (distance = Euclidean, method = ward.D). The `mclustICL()` and `hclust()` functions was applied on `log10` transformed data.
6. The density scatter plots presented in Figure 1.1 were drawn with the function `geom_bin2d()` from the package `ggplot2` (v. 3.1.0). Cytograms from other figures were also made with `ggplot2`.

Chapitre 2 – Métabolisme du carbone chez les diatomées et chez *Fragilariopsis cylindrus*

2.1. Résumé

Les chapitres 3 et 4 de cette thèse vont respectivement aborder la gestion du métabolisme du carbone d'un point de vue génétique et biochimique. Pour être appréciés, ils nécessitent de connaître un certain nombre de notions qui sont d'abord présentées dans ce second chapitre. Il a été écrit en se basant sur une large revue de littérature jugée pertinente vis-à-vis des problématiques et hypothèses des deux derniers chapitres de cette thèse. Il décrit entre autres les grands réservoirs riches en carbone trouvés chez les diatomées, ainsi que les tendances observées lors d'expériences passées d'acclimatation à l'obscurité. Il décrit également les voies métaboliques importantes impliquées dans le métabolisme du carbone qui ont pu être identifiées chez les diatomées. La réalisation du troisième chapitre a nécessité d'identifier, dans le génome de *F. cylindrus*, les gènes participant aux voies métaboliques d'intérêt. Le chapitre 2 évoque donc également ce qui a pu être ou ne pas être trouvé chez *F. cylindrus* en comparaison des autres génomes de diatomées qui ont été séquencés.

Mots-clefs : Réserves intracellulaires, carbohydrates, lipides, acides aminés, voies métaboliques, diatomées.

2.2. Abstract

Chapters 3 and 4 of this thesis will respectively address the control of carbon metabolism from a genetic and biochemical point of view. To be appreciated, they require knowledge of a number of concepts that are presented in this second chapter. It was written on the basis of a broad review of the literature deemed relevant to the problems and hypotheses of Chapters 3 and 4. Among other things, it describes the large carbon-rich reservoirs found in diatoms, as well as trends observed in previous darkness acclimation

experiments. It also describes the important metabolic pathways involved in carbon metabolism that could be identified in diatoms. The third chapter required that the identification of genes in the *F. cylindrus* genome involved in the metabolic pathways of interest. Chapter 2 therefore also discusses what has or has not been found in *F. cylindrus* compared to other diatom genomes that have been sequenced.

Keywords: Intracellular reserves, carbohydrates, lipids, amino acids, metabolic pathways, diatoms.

2.3. Les réservoirs de carbone intracellulaire

2.3.1. Fixation de carbone inorganique

Durant le processus de photosynthèse, l'énergie solaire est d'abord convertie en énergie chimique dans le stroma des chloroplastes. L'énergie absorbée par les pigments photosynthétiques est transmise à la chaîne de transport d'électrons localisée dans les membranes des thylakoïdes. Le fonctionnement de cette dernière permet de produire de l'énergie sous forme d'ATP, et du pouvoir réducteur sous forme de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (phase claire de la photosynthèse). Cette énergie peut ensuite être exploitée par le cycle de Calvin pour fixer et réduire le carbone inorganique (CO₂), ce qui conduit à la production de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) (phase sombre de la photosynthèse). Le G3P peut être utilisé (1) par le cycle de l'acide citrique (TCA) qui produit de l'énergie et alimente la chaîne respiratoire mitochondriale avec du succinate, ou (2) pour la synthèse *de novo* des molécules nécessaires au fonctionnement de la cellule (protéines entre autres), sa croissance et sa division. Enfin, (3) le G3P excédentaire peut également être stocké sous forme de molécules plus complexes, sucres et lipides, pour une utilisation ultérieure.

2.3.2. Compartiments cellulaires majeurs de carbone

Dans une cellule de diatomée, une grande partie du carbone est trouvée sous forme de sucres, de lipides et de protéines (voir Fig. 2.1). La taille relative des différents compartiments évolue avec les conditions de croissance. Lorsqu'une population de

cellules croît de manière exponentielle, la majorité du carbone est investie dans la biomasse fonctionnelle et structurelle (lipides membranaires, protéines). Lors d'une limitation nutritive, davantage de carbone est investi dans la biomasse de stockage (sucres et lipides de stockage).

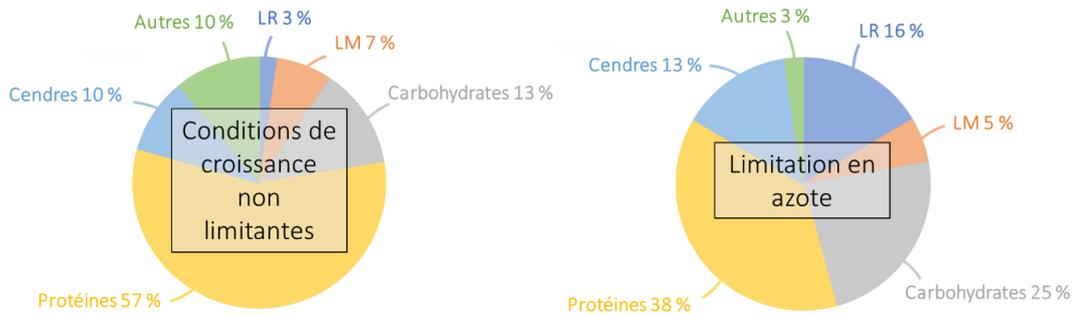


Figure 2.1. Pourcentages des masses sèches moyennes (%) des réservoirs de carbone chez *Phaeodactylum tricornutum* au cours d'un cycle jour nuit (16:8) **(A)** en conditions de croissance non limitantes, **(B)** lors d'une limitation en nitrates (modifiée d'après Remmers et al. 2018). LR = lipides de réserve, LM = lipides membranaires.

Les voies de synthèse et de dégradation de ces différents composés sont organisées de manière complexe autour de différents carrefours qui leur permettent de communiquer. C'est par exemple le cas du pyruvate qui intervient dans la synthèse et la dégradation du glucose et de certains acides aminés, qui peut alimenter le cycle du TCA, et qui peut être converti en acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras, par exemple. Ces points clés du métabolisme, en permettant à l'organisme de réorganiser ses réserves sous différentes formes en fonction des conditions environnementales, lui confèrent une grande plasticité métabolique.

Lors de périodes prolongées d'obscurité, la survie des diatomées qui ne possèdent pas un potentiel hétérotrophe assez développé, repose sur la formation de cellules de résistance ou sur la consommation des réserves de carbone. Les diatomées stockent principalement le carbone fixé excédentaire sous forme de lipides et de carbohydrates (Armbrust et al. 2004 ; Wilhelm et al. 2006). Lorsque nécessaire, la dégradation des réserves de sucres et des lipides libère l'énergie et/ou les molécules qui alimentent le métabolisme et la synthèse de nouveaux composés cellulaires. D'autres éléments de la cellule, comme certaines protéines et certains lipides de structure peuvent, s'ils ne sont pas indispensables

à sa survie, parfois être également recyclés pour soutenir le métabolisme. Dans les prochaines sections, seront présentées les compartiments intracellulaires de carbone d'intérêt pour la survie des diatomées à l'obscurité prolongée ainsi que les voies métaboliques qui leur sont associées.

Les diatomées représentent aujourd'hui une importante source de produits riches en carbone d'intérêt pour de nombreuses industries. L'importance d'apports suffisants en oméga-3 pour notre santé est par exemple bien connue (Calder et Yaqoob 2009). Les triglycérides (lipides de réserve) sont utilisés pour produire des biocarburants (Long et al. 2021) et les caroténoïdes comme compléments alimentaires aux multiples vertus (Rao et Rao 2007). Les carbohydrates, eux, peuvent-être utilisés à des fins extrêmement diverses (Harun et al. 2010). Pour cette raison, beaucoup d'efforts ont été investis dans la compréhension du métabolisme du carbone des diatomées. Il n'a pas été encore entièrement résolu mais des progrès sont régulièrement réalisés depuis que le premier génome a été séquencé en 2004 par Armbrust et collaborateurs (2004). Les outils biomoléculaires ont permis de révéler que l'histoire évolutive des diatomées avaient entremêlé divers évènements d'endosymbiose et de transferts horizontaux de gènes impliquant des organismes autotrophes et hétérotrophes (voir Fig. 5 de l'Introduction de la thèse) (Bowler et al. 2008 ; Deschamps et Moreira 2012 ; Dorrell et al. 2021 ; Dorrell et al. 2017). Les diatomées ont en effet hérité d'un ensemble de caractéristiques uniques comme la possession d'un cycle complet de l'urée, normalement uniquement présent chez les organismes hétérotrophes (Allen et al. 2006 ; Allen et al. 2011).

2.4. Carbohydrates

2.4.1. La chrysolaminarine, carbohydrate de stockage

Les carbohydrates (CH) de stockage, sont universellement présents dans le domaine du vivant. Ils sont généralement composés d'une longue chaîne ramifiée de glucose. Chez les diatomées, la principale forme de CH de stockage est un composé hydrosoluble β -1,3-glucane (dérivé du D-glucose) ramifié en β (1 \rightarrow 6) appelé chrysolaminarine (CHY) (Ford et al. 1965). Le glucose est synthétisé à partir du G3P issu du cycle de Calvin, ou *via* la gluconéogenèse qui, par définition, est alimentée par des précurseurs non glucidiques. La

production de glucose peut, en effet, également être alimentée par différentes voies dont les produits entrent dans la gluconéogenèse sous forme de pyruvate, d'oxaloacétate ou de glycérol (ce dernier étant issu de la dégradation de certains lipides, voir section 2.5.1 sur les lipides de réserves plus bas). Une fois produits, les résidus de glucose sont recrutés dans le cytosol et peuvent être assemblés en chaînes linéaires par des liaisons glycosidiques auxquelles sont ajoutées des ramifications latérales de manière irrégulière dans les vacuoles (où la chrysolaminarine est ultimement stockée) et dans les tonoplastes (Chiovitti et al. 2004 ; Huang et al. 2018 et 2016 ; Waterkeyn et Bienfait 1897).

L'accumulation de CHY chez les diatomées peut être observée lors de stress nutritifs (Guerrini et al. 2000 ; Magaletti et al. 2004 ; Remmers et al. 2018). Plus généralement, la CHY semble être destinée principalement à un usage à court terme, sa dynamique étant fortement influencée par le cycle diurne (Granum et al. 2002 ; Handa 1969 ; Varum et Myklestad 1984). Elle s'accumule grâce à la photosynthèse, et est consommée la nuit pour alimenter la respiration et renouveler certaines protéines en prévision du jour suivant (Fernandez et al. 1997 ; Granum et Myklestad 1999 ; Hitchcock 1980 ; Oijen et al. 2003 ; Smith et al. 1990). La consommation des sucres est, par ailleurs, également souvent observée chez les diatomées maintenues à une obscurité prolongée (Gibson et Fitzsimons 1990 ; Handa 1969 ; Kennedy et al. 2019 ; Martin et al. 2012 ; Schaub et al. 2017 ; Walter et al. 2017). L'hydrolyse de la CHY libère du glucose dont la dégradation permet aux cellules de générer rapidement de l'énergie et produire les métabolites nécessaires à la synthèse d'autres composés cellulaires (protéines par exemple). La dégradation du glucose est principalement assurée par la glycolyse, mais aussi par d'autres voies : la voie des pentoses phosphates (PPP), la voie Entner-Doudoroff (ED) et la voie de la phosphocétolase. Toutes ces voies de dégradation aboutissent à la production de pyruvate. Ce dernier peut être utilisé directement pour la synthèse des acides aminés, des chlorophylles et des terpénoïdes (précurseurs des caroténoïdes et stéroïdes), ou peut être converti en acétyl-CoA par le complexe (d'enzymes) pyruvate déshydrogénase (PDC). L'acétyl-CoA peut alors (1) entrer directement dans le cycle du TCA pour générer du succinate utilisable par la respiration mitochondriale, (2) alimenter la synthèse des terpénoïdes, ou (3) servir à la production des acides gras (FA) constitutifs des lipides de structure, de signalisation et de réserve (Fig. 2.2).

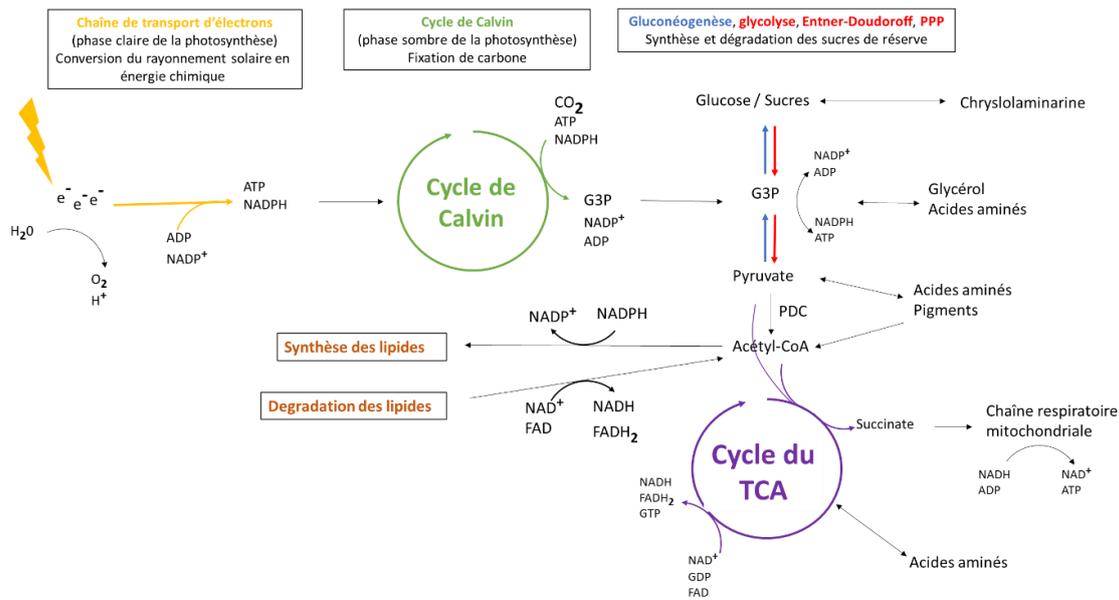


Figure 2.2. Représentation simplifiée des connexions entre photosynthèse, métabolisme des carbohydrates, du pyruvate et des acides aminés, cycle du TCA, et respiration mitochondriale, montrant les principales voies du carbone fixé ainsi que les échanges possibles entre les principaux réservoirs de carbone et les processus qui génèrent de l'énergie et du potentiel réducteur. CHY : chrysolaminarine ; EPS : exopolysaccharides ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; PDC : complexe pyruvate déshydrogénase, PPP : voie des pentoses phosphates.

2.4.2. Glycolyse, gluconéogenèse et chrysolaminarine

La glycolyse est souvent présentée comme une gluconéogenèse inversée (Fig. 2.3). Ces deux voies métaboliques partagent bien un certain nombre d'enzymes capables d'accomplir des réactions réversibles. Elles font cependant aussi intervenir des enzymes qui leur sont propres et catalysent des réactions clés irréversibles. Ces étapes sont régulées par allostérie et agissent comme point de contrôle.

La partie « haute » de la glycolyse consomme de l'ATP pour convertir le glucose en G3P. Elle démarre grâce à l'activité d'une glycoquinase, qui permet la conversion du glucose en glucose-6-phosphate. La glucose-6-phosphate isomérase permet alors de convertir ce dernier en fructose-6-phosphate. Celui-ci est ensuite converti en fructose-1,6-biphosphate par la phosphofruktokinase, avant que le fructose-1,6-biphosphate ne soit converti en G3P par la fructose biphosphate aldolase. La suite de la voie (appelée partie basse de la glycolyse), génère de l'ATP en convertissant successivement le G3P en 1,3-

biphosphoglycérate, en 3-phosphoglycérate et en phospho*énol*pyruvate. Ce dernier sera finalement converti en pyruvate capable d'entrer dans le cycle du TCA. Ces quatre étapes sont assurées par la phosphoglycérate kinase, la phosphoglycérate mutase, l'énolase, et la pyruvate orthophosphate dikinase, respectivement. La conversion de phospho*énol*pyruvate en pyruvate peut également être accomplie par une pyruvate kinase. Dans la glycolyse, les étapes irréversibles sont assurées par la glucokinase (première étape de la glycolyse), par la phosphofructokinase (troisième étape) et par la pyruvate kinase (neuvième étape).

La néoglucogénèse est globalement accomplie par les étapes inverses de celles de la glycolyse, à quelques étapes près, accomplies par des enzymes qui lui sont propres et qui effectuent des étapes irréversibles. Premièrement, le pyruvate ne pouvant pas être directement converti en phospho*énol*pyruvate, il doit d'abord être converti en oxaloacétate (intermédiaire du cycle du TCA), qui lui peut être converti en phospho*énol*pyruvate. Ces deux étapes sont accomplies par la pyruvate carboxylase et la phospho*énol*pyruvate carboxykinase, respectivement. La conversion de fructose-1,6-biphosphate est, elle, accomplie par la fructose-1,6-biphosphatase. Finalement, la glucose-6-phosphatase permet normalement la réaction inverse de celle accomplie par la glucokinase de la glycolyse. Elle n'a cependant pas été trouvée chez les diatomées (Kroth et al. 2008) qui possèdent à la place des glucomutases qui peuvent interconvertir le glucose-6-phosphate et le glucose-1-phosphate (ce dernier pouvant ensuite être utilisé pour la synthèse de sucres complexes). La position des étapes irréversibles de la glycolyse et de la gluconéogénèse est illustrée dans la figure 2.3.

Une fois le glucose-1-phosphate synthétisé, l'action d'une glucose-1-phosphate uridylyltransférase (UDP-glucose pyrophosphorylase) permet de produire de l'UDP-glucose. Les résidus de glucose peuvent alors être assemblés en 1,3- β -glucane par une 1,3- β -glucane synthase. D'avantage de résidus de glucose y sont ajoutés par une 1,6- β -transglycosylase pour former la chrysolaminarine. Lorsque nécessaire, la chrysolaminarine peut être dégradée par des 1,3- β -exo- et endo-glucanases ainsi que des β -glucosidases pour en récupérer le glucose qui la compose.

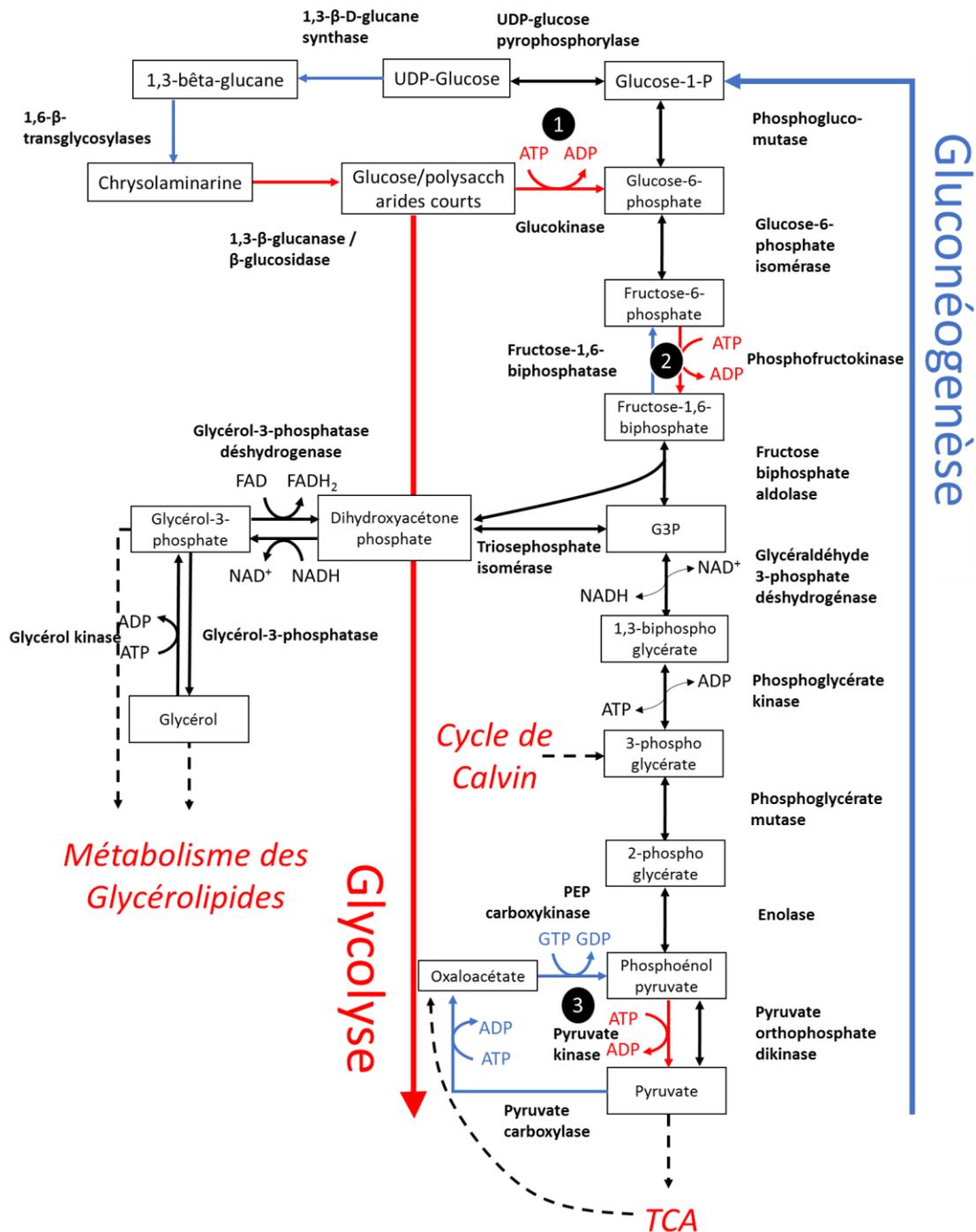


Figure 2.3. Métabolisme de la chrysolaminarine chez les diatomées. Les flèches noires représentent les réactions réversibles. Les flèches bleues et rouges sont les étapes irréversibles qui participent respectivement à la synthèse et à la dégradation des sucres. Sur la gauche est illustré le lien direct entre le métabolisme des sucres et celui des lipides grâce au glycérol, constituant de nombreux lipides d'importance (voir section 2.5.1 sur les lipides de réserve). Les flèches noires pointillées illustrent les liens existants entre les voies métaboliques présentées et le reste du métabolisme. Les étapes irréversibles présentées précédemment sont numérotées de 1 à 3. G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate.

Chez les diatomées, la glycolyse et la gluconéogenèse semblent être assez bien conservées d'une espèce à l'autre (Smith et al. 2012). Elles sont caractérisées par un nombre anormalement élevé d'isoenzymes qui pourraient avoir été acquises par transfert de gènes latéraux ou endosymbiotiques (Smith et al. 2012). Smith et al. (2012) ont montré que *T. pseudonana* (diatomée centrique), *P. tricornutum* et *F. cylindrus* (diatomées pennées) possèdent des gènes de la glycolyse et de la gluconéogenèse dans trois compartiments cellulaires différents : le cytosol, les chloroplastes et les mitochondries. Leur génome possède chacun les enzymes de la partie inférieure de la glycolyse (qui va du G3P au pyruvate) dans les mitochondries. Dans le cytosol sont retrouvés tous les gènes de la glycolyse et de la gluconéogenèse à l'exception de l'énolase chez *P. tricornutum* et *F. cylindrus*. Dans le chloroplaste, seule la glucokinase est absente des trois génomes. La phosphofructokinase en est également absente chez *F. cylindrus* et *T. pseudonana*. L'intérêt de ces caractéristiques est discuté en détail par Smith et al. (2012) ainsi que par Kroth et al. (2008), notamment en rapport avec une possible augmentation de la plasticité métabolique des diatomées. Les auteurs accordent une attention particulière à l'importance de la distribution des gènes dans leur compartiment respectif.

2.4.3. Voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates comprend une phase irréversible, dite oxydative (OPPP, Oxidative Pentose Phosphate Pathway), et une phase réversible non-oxydative (NOPPP) (Fig. 2.4). L'OPPP se produit dans le cytosol chez la plupart des organismes, mais dans le chloroplaste chez les plantes et les algues vertes. Chez les diatomées, les gènes candidats identifiés agiraient dans le cytosol (Kroth et al. 2008 ; Fabris et al. 2012). Cette voie permet la production de NADPH lors des étapes de conversion de glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate (intermédiaire du cycle de Calvin). La phase NOPPP est composée d'étapes réversibles qui permettent la conversion du ribulose-5-phosphate en deux intermédiaires de la glycolyse : le fructose-6-phosphate et le G3P. En cours de route, différents monosaccharides sont par ailleurs produits. Certains d'entre eux constituent des intermédiaires nécessaires à la production de molécules importantes :

l'érythrose-4-phosphate pour certains acides aminés, le ribose-5-phosphate pour les nucléotides, le xylulose-5-phosphate et le sédoheptulose-7-phosphate.

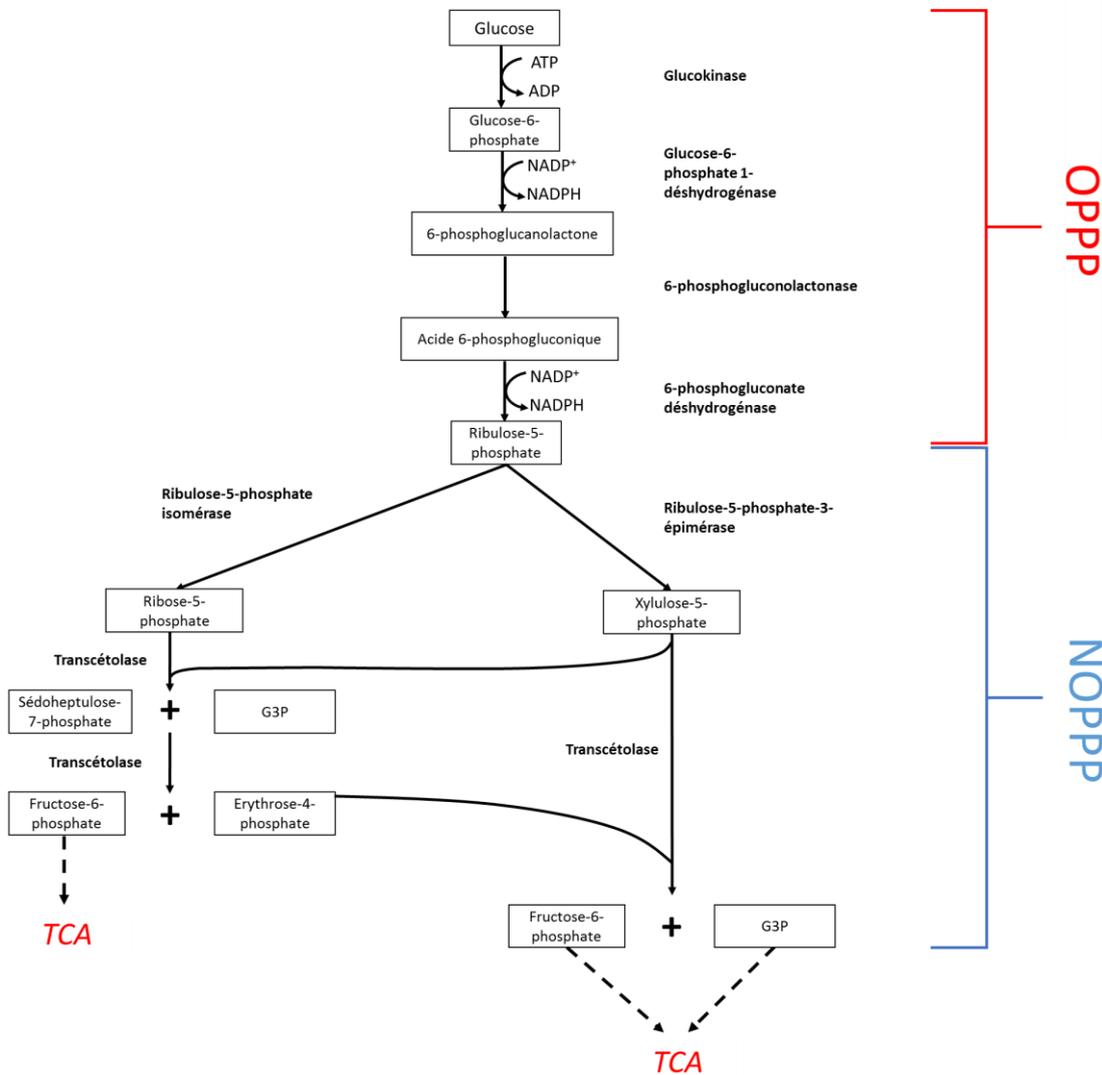


Figure 2.4. Voies des pentoses phosphates oxydatives (OPPP) et non-oxydatives (NOPPP). La PPP offre une alternative à la glycolyse dotée d'un rendement énergétique moindre mais permettant en revanche la synthèse de produits essentiels au fonctionnement de la cellule. Alors que l'OPPP permet la synthèse de NADPH et de ribose-5-phosphate, nécessaires respectivement à la synthèse des acides gras et des nucléotides, la phase NOPPP permet de produire différents intermédiaires de la glycolyse ainsi que de l'érythrose-4-phosphate qui sert à la synthèse de certains acides aminés. G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate.

2.4.4. Entner-Doudoroff

La voie d'Entner-Doudoroff (ED) est considérée comme la plus ancienne des trois voies glycolytiques (Romano et Conway 1996). On a d'abord pensé qu'elle était spécifique aux procaryotes, mais on l'a ensuite identifiée chez de nombreux eucaryotes, dont les diatomées. En effet, Fabris et collaborateurs (2012) ont trouvé chez *P. tricornutum* un groupe de gènes de l'ED agissant dans les mitochondries. Ces gènes, combinés à l'ensemble de gènes de glycolyse inférieure mitochondriale mentionnée plus haut, permettraient une dégradation complète du glucose dans ce compartiment de la cellule (Fig. 2.5). Comme la glycolyse, l'ED permet de produire de l'ATP et du NADPH grâce à la conversion du glucose en pyruvate. Son rendement est cependant plus faible. Peu de choses sont connues à propos de la régulation de l'ED, mais un coût protéique moindre pourrait expliquer qu'elle se substitue à la glycolyse sous certaines conditions nécessitant une gestion particulière de l'énergie (Flamholz et al. 2013). La cinquième et dernière étape de la voie ED, qui produit du pyruvate et du 3-phosphoglyceraldéhyde à partir du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (KDPG), est assurée par la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase, seule enzyme spécifique de cette voie. Fabris et al. (2012) ont remarqué que le niveau d'expression de ce gène clé est fortement lié au cycle diurne chez *P. tricornutum*, étant fortement surexprimé la nuit, et de moins en moins exprimé au fil de la journée.

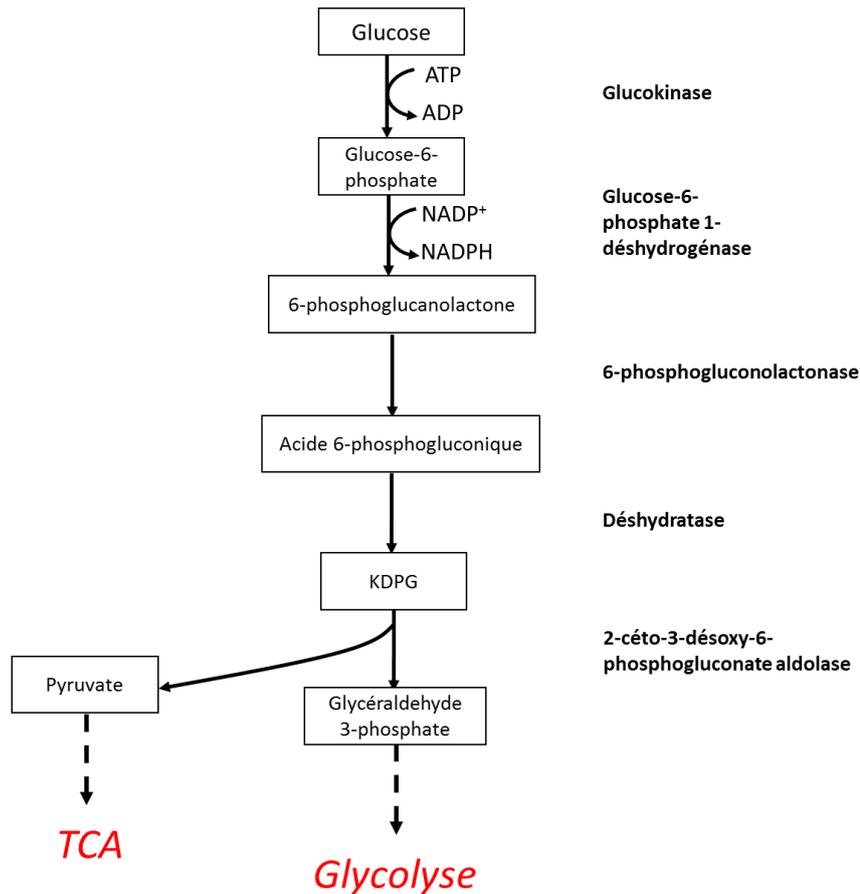


Figure 2.5. La voie d'Entner-Doudoroff est considérée comme la plus ancienne des voies glycolytiques. Moins énergétique que la glycolyse, elle pourrait être préférentiellement utilisée lors de périodes de croissance particulières, offrant l'avantage d'un coût protéique faible. La KDPG est la seule enzyme intervenant uniquement dans cette voie métabolique. KDPG : 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate.

2.4.5. Voie phosphocétolase

La voie phosphocétolase a été majoritairement identifiée chez les procaryotes et les champignons. La phosphocétolase, enzyme clé de cette voie, peut convertir le xylulose-5-phosphate en G3P plus phosphate d'acétyle, le fructose-6-phosphate en érythrose-4-phosphate plus phosphate d'acétyle, et le sédoheptulose-7-phosphate en ribose-5-phosphate plus phosphate d'acétyle (Krüsemann et al. 2018 ; Tittmann 2014). Cette voie est donc étroitement liée au PPP ainsi qu'à la gluconéogenèse. Le phosphate d'acétyle produit peut être converti en acétate pour la synthèse d'acides gras. Fabris et al. (2012) ont trouvé ce qu'ils pensent être une xylulose/fructose phosphocétolase d'origine bactérienne dans le génome de *P. tricornutum*. Cependant, ils n'ont pu identifier un

orthologue de cette enzyme chez *T. pseudonana*, de la même manière que nous en avons été incapables chez *F. cylindrus*. On trouvera une représentation schématique de l'organisation et des liens qui existent entre la glycolyse, le PPP, l'ED et la voie phosphocétolase dans la figure 4 de Fabris et al. (2012).

2.5. Lipides

2.5.1. Lipides de réserve

Dans cette section, les connaissances actuelles du métabolisme des lipides des diatomées sont présentées. Des informations complémentaires peuvent être trouvées dans deux articles de revue publiés récemment par Zulu et al. (2018) et Li-Beisson et al. (2019) qui traitent respectivement du métabolisme des lipides des diatomées, et de celui des microalgues en générale.

Les lipides de réserve, comme les carbohydrates, peuvent être dégradés pour générer l'énergie et les métabolites utiles au fonctionnement et à la croissance de la cellule. Les acides gras (FA) ainsi produits peuvent être dégradés pour régénérer les réservoirs d'acétyl-CoA et de glycérol. Ce dernier peut entrer dans la glycolyse ou la gluconéogenèse après avoir été converti en G3P (Fig. 2.3). Chez les diatomées, comme dans la plupart des organismes, les principaux lipides de stockage sont les triglycérides (TAG), qui sont emmagasinés dans des gouttelettes lipidiques (LD) cytoplasmiques associées au réticulum endoplasmique où les TAG sont synthétisés. Les LD sont produites en grandes quantités chez les microalgues lors de stress abiotiques de diverses natures (voir revue dans Zienkiewicz et al. 2016). Leur formation participe à l'homéostasie de la cellule en constituant un puits d'électrons qui permet de palier un déséquilibre énergétique (Murphy 2012). Lorsque les cellules sont soumises à des conditions de croissance sous-optimales, les LD permettent aussi d'emmagasiner de l'énergie en attendant le rétablissement de meilleures conditions, lors desquelles elles sont dégradées pour générer l'énergie nécessaire à la reprise de la croissance (Valenzuela et al. 2013). Les LDs sont composées d'une membrane de lipides monocouche contenant divers types de molécules. Chez les *P. tricornutum*, la membrane est majoritairement composée des lipides sulfoquinovosyldiacylglycerol, phosphatidylcholine et de

diacylglycérilhydroxyméthyltriméthyl- β -alanine (Lupette et al. 2019), et contiennent majoritairement des TAGs (Yoneda et al. 2016). Le métabolisme de ces réservoirs de TAGs reste mal connu chez les diatomées, chez lesquelles peu de protéines ont pu être isolées et identifiées (voir Maeda et al. 2017).

A l'instar des sucres, les TAG sont synthétisés le jour et consommés la nuit, en quantité moindre cependant. Ils peuvent être produits en grande quantité lors de différents stress, et plus particulièrement lors de stress nutritifs (nitrate et silicate : Eizadora et al. 2009 ; phosphate et silicate : Lombardi et Wangersky 1991 ; stress oxydatif combiné à une limitation en nitrate : Burch et Franz 2016 ; stress pH combiné à une limitation en nitrate : Mus et al. 2013 ; Hu et al. 2008). Cette surproduction de TAG peut permettre de compenser un éventuel déséquilibre énergétique et fournir un stock d'énergie important qui peut être lentement consommé après un arrêt de la croissance ou un ralentissement du métabolisme. À cet égard, outre un rapport énergie/masse plus élevé que celui de la CHY, le caractère hydrophobe des TAG accroît l'efficacité de leurs réserves en cas de limitation nutritive prolongée (Berg et al. 2003 ; Lehninger 1975). La consommation des lipides a également souvent été observée chez des diatomées soumises à des périodes prolongées d'obscurité (Gibson et Fitzsimons 1990 ; Handa 1969 ; Kennedy et al. 2019 ; Schaub et al. 2017).

2.5.2. Autres classes majeures de lipides

Les connexions entre les principales voies métaboliques des lipides et des sucres sont assurées par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA et du glycérol. Le glycérol constitue l'épine dorsale des glycérolipides (dont les TAG), et de nombreux lipides membranaires/structurels (phospholipides, bétaine lipides et glycolipides). L'acétyl-CoA est le précurseur des FA, éléments constitutifs de toutes les classes de lipides. Chez les diatomées, il est probablement principalement généré à partir de pyruvate par le PDC dans le chloroplaste (Zulu et al. 2018), mais peut l'être aussi à partir d'acétate ou de citrate (intermédiaire du TCA). Il est utilisé dans le chloroplaste pour synthétiser des FA simples qui peuvent ensuite être modifiés de différentes manières.

2.5.2.1. Acides gras

Les FA ne constituent pas, à proprement parlé, une classe de lipides. Ils peuvent cependant être retrouvés libres en relativement grande quantité chez les diatomées et peuvent constituer un réservoir important pour la survie à l'obscurité (Schaub et al. 2017). Les FA sont des acides carboxyliques à longue chaîne hydrocarbonée linéaire appelée chaîne aliphatique. Leur importante diversité est définie par :

- leur longueur (nombre d'atomes de carbone). Les FA à chaîne courte, moyenne, longue et très longue possèdent respectivement 5 atomes de carbone ou moins, 6 à 12 atomes de carbone, 13 à 21 atomes de carbone et 22 atomes de carbone ou plus.
- le degré d'insaturation de la chaîne d'hydrocarbures (nombre de doubles liaisons carbone-carbone).
- la configuration des hydrogènes autour de chacune des insaturations (cis- ou trans-)
- la position de chaque insaturation sur la chaîne aliphatique depuis son début (noté delta) ou sa fin (notée oméga).

À titre d'exemple, la structure de l'acide docosahexaénoïque (ou DHA, un oméga-3), également appelé acide tout-cis- Δ 4,7,10,13,16,19 22:6, est représentée dans la figure 2.6. Sa chaîne, longue de 22 carbones, possède 6 insaturations en configuration cis positionnées sur les carbones 4, 7, 10, 13, 16 et 19, en comptant depuis le début de la chaîne aliphatique.

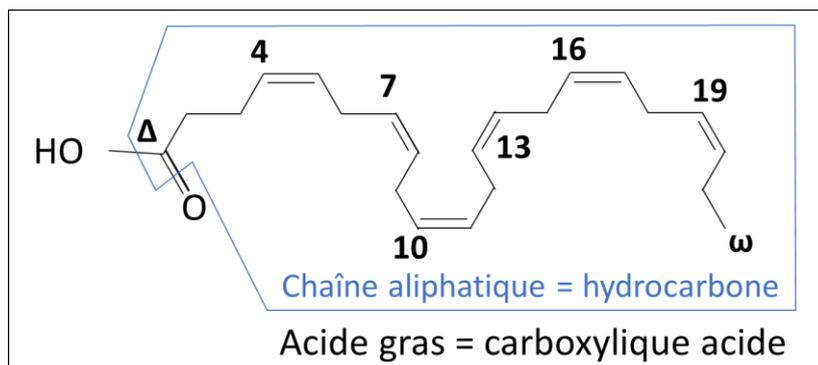


Figure 2.6. Structure de l'acide gras docosahexaénoïque. Le Δ et l' ω marquent respectivement les carbones de tête et de queue de la chaîne aliphatique. Les nombres marquent le premier carbone de chaque double liaison en comptant à partir de la position delta.

2.5.2.2. Glycérides

Chez les diatomées, les glycérides sont composées de monoglycérides (MAG), diglycérides (DAG) et triglycérides (TAG). Les glycérides sont des molécules hydrophobes de glycérol estérifié par un, deux et trois FA, respectivement (Fig. 2.7).

Les MAG sont précurseurs des DAG. Les DAG (tout comme les MAG) sont rarement présents en très grandes quantités, mais sont extrêmement importants en tant que précurseurs de la plupart des lipides. Ils se trouvent par ailleurs au point de rencontre de nombreuses voies métaboliques des lipides. Ils offrent une grande polyvalence au métabolisme dans des situations qui exigent une acclimatation rapide des organismes (en recyclant une classe de lipides vers une autre, par exemple). En outre, les DAG, en tant que produit de dégradation de certaines molécules de signal, les phosphatidylinositol phosphate, constituent d'importants seconds messagers. Les TAG permettent de stocker le carbone fixé excédentaire, et peuvent représenter une part importante du carbone particulaire chez les diatomées soumises à diverses conditions de stress (voir Hu et al. 2008 et les références qui y figurent).

2.5.2.3. Glycérophospholipides

Les glycérophospholipides (GPL) sont les phospholipides (PL) les plus représentés chez les diatomées. Les GPL les plus abondants sont principalement des lipides structuraux, constituants majeurs des membranes cellulaires. Ces molécules amphiphiles s'organisent naturellement en bicouche lipidique : leur partie hydrophobe est orientée vers le centre de

la membrane tandis que leur partie hydrophile est tournée vers les parties externes et internes des compartiments qu'elles délimitent (dont la cellule elle-même). Les GPL sont constitués d'un glycérol estérifié par deux FA (comme les DAG dont ils dérivent) et portent un groupement phosphate sur leur troisième groupe hydroxyle (Fig. 2.7). La nature et le nom d'un phosphoglycéride sont déterminés par la molécule qui est liée au phosphate. Les phosphoglycérolipides trouvés chez les diatomées sont l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).

Le PG, le PE et la PC sont principalement des lipides structurels retrouvés dans les membranes plasmiques.

Le PA est principalement un intermédiaire de la synthèse du DAG (et donc un précurseur de la majorité des lipides). Il est également impliqué dans d'importantes voies de signalisation chez de nombreux organismes (Jenkins et Frohman 2005).

Le PI est un lipide utilisé pour synthétiser de nombreuses espèces de phosphatidylinositol mono-, bi- et triphosphates, qui sont ancrées dans les membranes. Des signaux environnementaux de diverses natures, qui peuvent provoquer la phosphorylation des phosphatidylinositols phosphate, permettent ainsi le déclenchement de cascades de signalisation (voir Heck et al. 2008).

La PS est parmi les lipides les plus abondants chez les levures et les mammifères. Elle joue chez ces organismes de nombreux rôles importants (Vance et Steenbergen 2005), comme celui de cofacteur de la protéine kinase C, en plus d'être un constituant majeur des membranes. Cependant, son rôle chez les diatomées et les plantes supérieures où elle est peu représentée, demeure inconnu, car peu étudié (Yaffe et Elia 2001).

Enfin, les FA des phospholipides peuvent également être hydrolysés par l'action de phospholipases, aboutissant à la production de lysophospholipides (LPL) (PL ayant perdu un FA). Les LPL exercent cependant un grand nombre d'action dans la régulation cellulaire (Ishii et al. 2004).

2.5.2.4. *Galactolipides*

Les galactolipides sont synthétisés *via* la liaison d'un sucre à un DAG par différentes ose transférases. Les plus abondants chez les diatomées sont les galactolipides mono- et

digalactosyldiacylglycérol (MGDG, DGDG), ainsi que les sulfolipides diacylglycérides de sulfoquinovosyl (SQDG) (Fig. 2.7). Ils représentent la majorité des lipides membranaires des thylakoïdes. Malgré cela, leurs fonctions n'ont pas été étudiées de manière approfondie chez les diatomées. Chez *Arabidopsis thaliana*, ils jouent différents rôles dans (1) la stabilité membranaire (ratio MGDG:DGDG) (Demé et al. 2014), (2) la substitution des phospholipides dans les chloroplastes de cellules limitées en phosphore (Kobayashi 2016), (3) l'importation de protéines dans les chloroplastes, (4) la photoprotection (Aronsson et al. 2008), et (5) dans le maintien des charges à la surface des membranes des thylakoïdes (Kobayashi 2016). En outre, Manoharan et al. (1999) ont montré que chez *Prorocentrum minimum* (*Dinophyceae*), les MGDG, probablement concentrés dans les membranes des thylakoïdes, pouvaient être utilisés comme une source d'énergie alternative aux TAG lors d'une période prolongée d'obscurité.

2.5.2.5. *Sphingolipides*

Les sphingolipides résultent de la liaison d'un FA sur une molécule de sphingosine (Fig. 2.7). Peu étudiés chez les diatomées, ils sont néanmoins connus pour être abondants dans les membranes (sous forme de sphingomyéline qui est une phosphocholine ou une phosphoéthanolamine attachée à une sphingosine) et pour jouer des rôles importants dans la signalisation et les communications cellulaires chez d'autres organismes (voir Dickson 2008 ; Dunn et al. 2004 ; Ohanian et Ohanian 2001). Plus précisément, la céramide et la sphingosine 1-phosphate peuvent être impliquées dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que la sénescence pour la première, et la prolifération cellulaire pour la seconde.

2.5.2.6. *Lipides bétaines*

Les lipides bétaines sont des molécules zwitterioniques (ayant des charges électriques formelles positives et négatives de 1 situées sur des atomes non adjacents et dont la somme est égale à zéro). Ils sont composés d'une tête polaire reliée au glycérol d'un DAG (Fig. 2.7). Les lipides bétaine chez les diatomées ont également été peu étudiés, mais on sait qu'ils peuvent se substituer aux phospholipides membranaires lors de limitation en phosphore (Huang et al. 2019). Chez d'autres organismes, ils jouent un rôle dans l'osmorégulation et la cryoprotection, en plus d'être impliqués dans les réponses de résistance à divers stress (Ashraf et Fooland 2007). Les trois bétaines les plus souvent

identifiés chez les diatomées sont le diacylglycérol-triméthyl-homosérine, le diacylglycérol-carboxy-hydroxyméthyl-choline, et le diacylglycérol-hydroxyméthyl-triméthyl-β-alanine (DGTA).

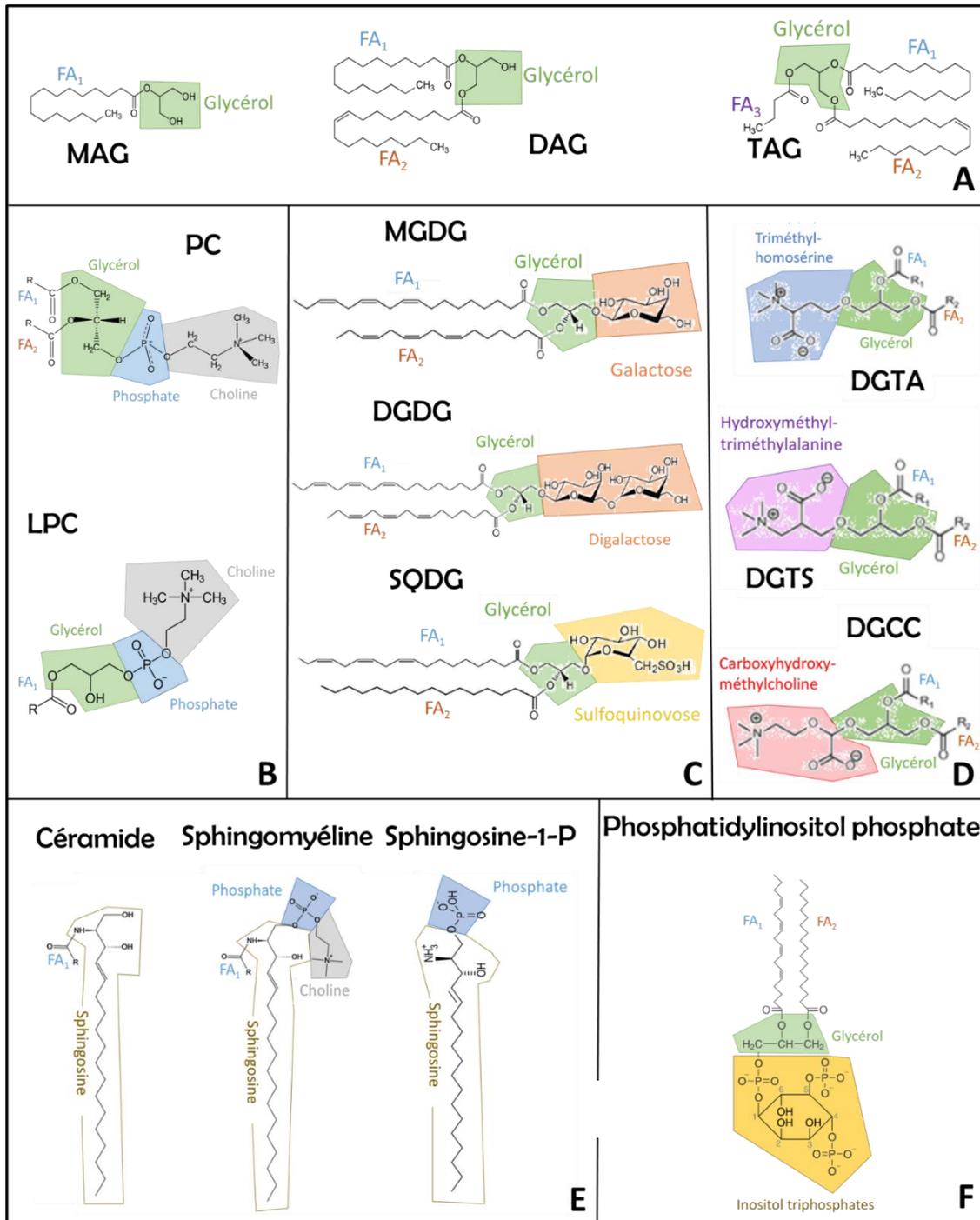


Figure 2.7. Structure des principales classes de lipides présentes chez les diatomées. (A) Glycérides. (B) Glycérophospholipides et lysoglycérophospholipides. (C) Glycolipides, (D) Lipides bêtaïne. (E) Sphingolipides.

2.5.3. Voies de synthèse

Grâce aux premiers séquençages de génomes de diatomées, ainsi qu'à l'intérêt croissant porté à la production industrielle de certains lipides, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension du métabolisme des glycérides, des glycérophospholipides et des glycolipides des diatomées. Les métabolismes des PI-phosphate, des sphingolipides et des lipides bétaines n'ont été, quant à eux, que peu étudiés. Ils ne seront donc pas présentés dans les sections suivantes. Il est à noter qu'Abida (2015) a commencé à identifier des enzymes impliquées dans le métabolisme des sphingolipides appartenant au génome de *P. tricornutum* (voir pp. 122-125 dans Abida 2015). Il a également identifié une lipide bétaine synthase possiblement impliquée dans la synthèse de la DGTA (voir pp. 112-113).

2.5.3.1. Synthèse des acides gras

Chez les diatomées, la voie de synthèse des FA produit principalement un FA à longue chaîne linéaire saturée : l'acide palmitique (16:0). La synthèse des FA repose sur la consommation de NADPH par un processus cyclique opéré par le complexe d'enzymes FA synthase II (FASII), aussi trouvé chez les bactéries (la FASI trouvée chez les champignons et les vertébrés se distingue par la présence d'une seule protéine multifonctionnelle). La FASII réalise la condensation successive de plusieurs malonyl-CoA sur un acyl-ACP (initialement un acétyl-ACP ; ACP = protéine porteuse d'acyle) en construction, chaque cycle entraînant l'ajout de deux carbones sur la chaîne aliphatique (Fig. 2.8). L'initiation se fait par la conversion d'un acétyl-CoA en malonyl-CoA par une acétyl-CoA carboxylase. Le malonyl-CoA est ensuite activé par une ACP S-acétyltransférase en malonyl-ACP pour permettre sa condensation sur l'acyl-ACP en cours de synthèse (initialement un acétyl-ACP issu de l'activation d'un acétyl-CoA). L'étape de condensation est réalisée par une β -cétoacyl-ACP synthase. Ensuite, le β -cétoacyl-ACP est réduit par une β -cétoacyl-ACP réductase en hydroxyacyl-ACP qui est déshydraté par une hydroxyacyl-ACP déshydratase. L'énoyl-ACP qui en résulte est alors réduit par une énoyl-ACP réductase pour produire un acyl-ACP. Ce dernier est finalement prêt à entrer dans un nouveau cycle de FASII. Ce processus aboutit à la production de 16:0-ACP et de 18:0-ACP. Les acides palmitique et stéarique, après élimination de l'ACP par une acyl-ACP: glycérol-3-phosphate acyltransférase, peuvent être utilisés pour la synthèse de lipides après d'éventuelles modifications. Ces modifications peuvent inclure

une ou plusieurs désaturations dans le réticulum endoplasmique (RE), ainsi que l'élongation de la chaîne aliphatique qui peut s'effectuer dans le chloroplaste ou le RE. Les voies de désaturations/élongations et le métabolisme des FA polyinsaturés à très longue chaîne des diatomées sont présentés dans les figures 2 et 3 de Zulu et al. (2018), et dans la figure 3 de Beisson et al. (2019). Les FA peuvent aussi être libres (FFA : *free fatty acids*), généralement en très petites quantités. Leur présence ne serait cependant la plupart du temps que le résultat de l'hydrolyse de lipides en cours.

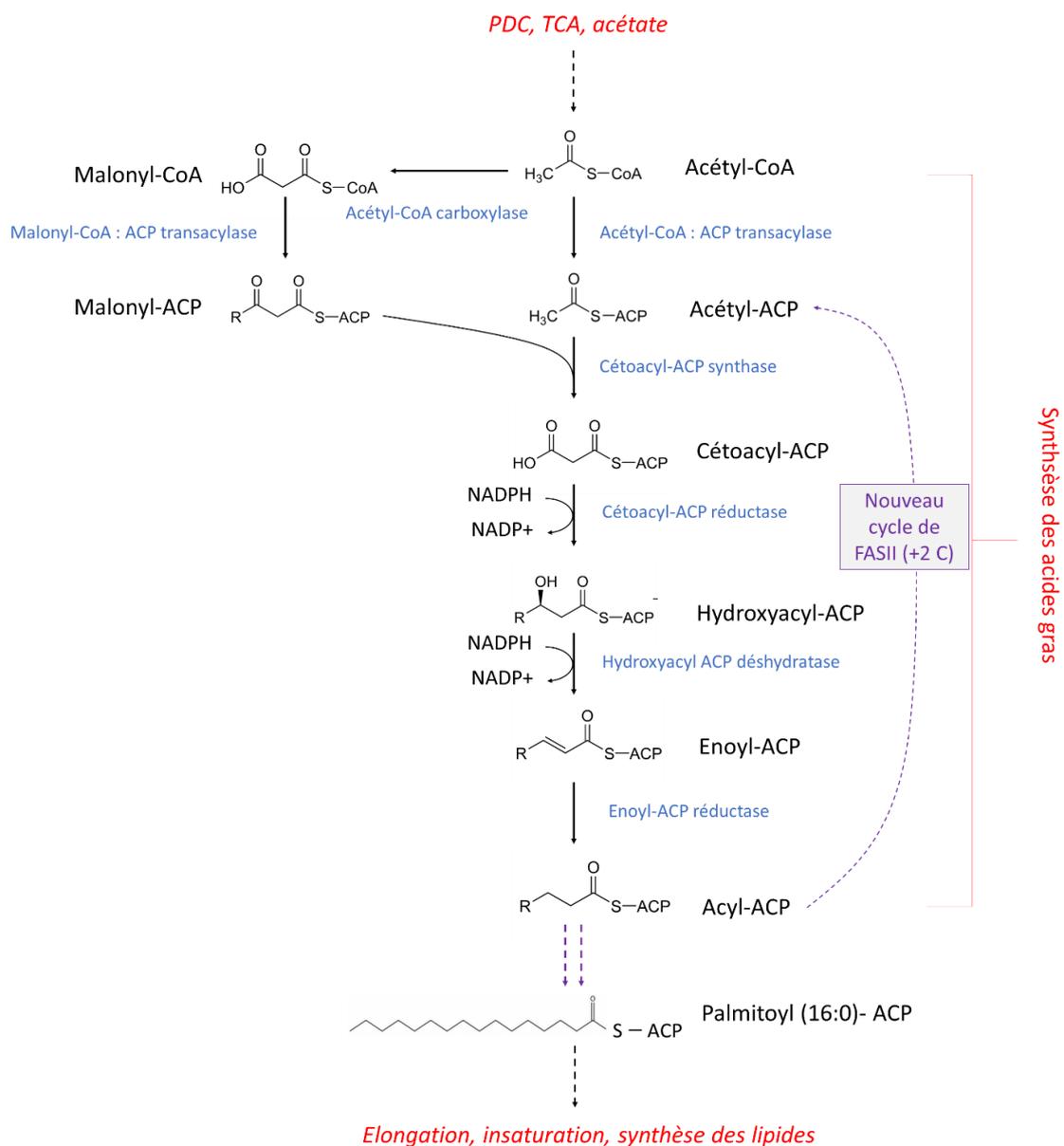


Figure 2.8. La synthèse des acides gras dans les diatomées est opérée par la FASII, un processus cyclique qui aboutit à la formation d'un acyl-ACP grâce à la condensation successive de malonyl-CoA sur un acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut être fourni par le TCA à partir de citrate, par le PDC à partir de pyruvate, ou par la conversion d'acétate. Chez les diatomées, la FASII produit

majoritairement de l'acide palmitique qui peut ensuite être modifié par des élongases et désaturases avant d'être intégré dans des lipides complexes. FAS : acide gras synthase ; PDC : complexe pyruvate déshydrogénase.

Comme chez les plantes à graine, la synthèse des classes majeures de lipides chez les diatomées suit deux voies distinctes, respectivement appelées procaryotique et eucaryotique (Fig. 2.9). Ces deux voies débutent de la même manière : les actions successives d'une glycérol-3-phosphate acyltransférase et d'une lisophosphatidate acyltransférase transfèrent un acyl-ACP (issu de la synthèse des FA) sur deux des groupes hydroxyles du glycérol d'une molécule de glycérol-3-phosphate, produisant respectivement un lisophosphatidate et un PA. Le PA peut ensuite être converti soit en DAG par une PA phosphatase, soit en cytidine diphosphate-DAG (CDP-DAG) par une PA cytidyltransférase. Ces deux produits sont alors utilisés pour synthétiser différents lipides.

2.5.3.2. Voie procaryotique

La voie procaryotique se déroule dans le chloroplaste et ses membranes. Le DAG y est utilisé pour synthétiser les glycolipides grâce à l'action de la MGDG synthase, de la DGDG synthase et de la sulfoquinovosyl transférase. La première de ces trois enzymes transfère un résidu de galactose d'un galactose uridine diphosphate (UDP-galactose) vers le dernier groupe hydroxyle disponible du glycérol d'un DAG. La seconde fixe un second galactose sur le galactose d'un MGDG. Le troisième transfère le sulfoquinovose d'un UDP-sulfoquinovose sur un DAG. Le CDP-DAG peut, quant à elle, être convertie en PG par l'action d'une PG-phosphate synthase et d'une phosphatidylglycérophosphatase.

2.5.3.3. Voie eucaryotique

La voie eucaryotique prend place dans le RE et dans le cytosol. Les DAG peuvent être utilisés pour produire de la PE, de la PC et des DGTA. La PC et la PE sont synthétisées par une CDP-choline/éthanolinephosphotransférase qui transfère la choline/éthanoline d'une CDP-choline/éthanoline à l'hydroxyle disponible d'un DAG. Les DAG synthétisés à partir du glycérol-3-phosphate peuvent également servir à produire des TAG par simple addition d'un FA sur le glycérol par une DAG-acyl

transférase (voie de Kennedy). Enfin, une PI synthase permet de fabriquer des PI par addition d'un inositol sur une CDP-DAG après le retrait de la CMP.

2.5.3.4. Voies alternatives

Cycle de Lands – Parallèlement à la voie de Kennedy qui appartient à la voie eucaryotique, les diatomées possèdent également une voie indirecte de production des TAG (Tanaka et al. 2015). Sous l'action d'une PL:DAG acyltransférase, un FA peut être transféré de la PC vers un DAG afin de produire un TAG. La molécule de lysophosphatidylcholine (LPC) qui résulte du retrait d'un FA de la molécule de PC peut être utilisée pour régénérer cette dernière grâce à l'action d'une lysophospholipide acyltransférase. La PC est fournie ici par le cycle de Lands qui interconvertit la PC et la LPC grâce à l'action d'une phospholipase A et d'une acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransférase.

Voies de la CDP-choline et de la CDP-éthanolamine – La voie de la CDP-choline et la voie de la CDP-éthanolamine permettent la synthèse de CDP-choline/éthanolamine nécessaires à la synthèse de PC et PE de la voie eucaryotique à partir de choline et d'éthanolamine. Elles s'effectuent par l'action séquentielle (1) d'une choline/éthanolamine kinase qui produit de la phosphocholine/éthanolamine et (2) d'une CTP-phosphocholine/éthanolamine cytidyltransférase qui produit la PE et la PC.

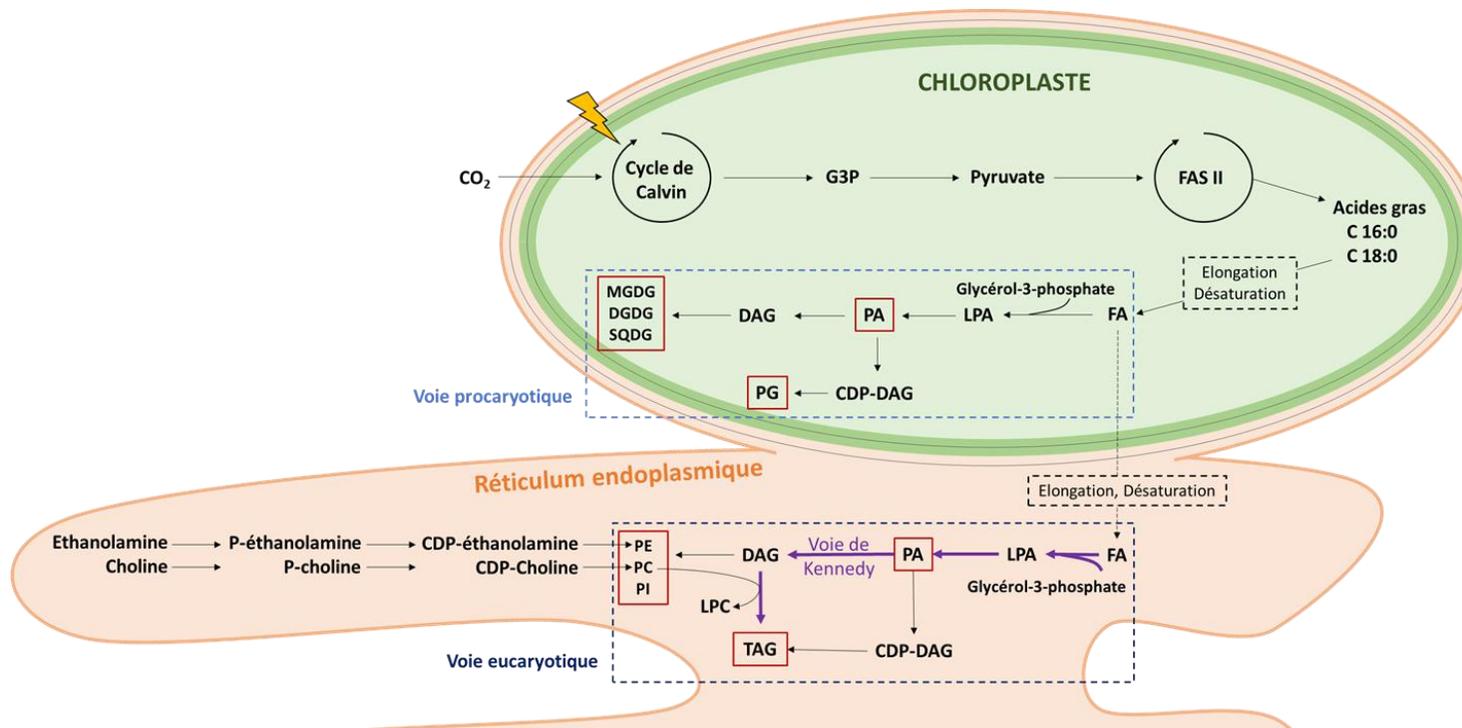


Figure 2.9. Représentation simplifiée des principales voies du métabolisme des lipides dans une diatomée. Le pyruvate provenant de la glycolyse est converti en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA alimente ensuite la FASII qui synthétise les FA dans les chloroplastes. Les FA peuvent rester dans le chloroplaste pour entrer dans la voie procaryotique ou être envoyés vers la voie eucaryotique dans le réticulum endoplasmique après d'éventuelles étapes d'élongation et/ou de désaturation. La voie procaryotique permet de produire du PA, des glycolipides (MGDG, DGDG, SQDG) et du PG. La voie eucaryotique permet de produire des PA, PI, PC, PE ainsi que des TAG. Le TAG peut être produit soit par l'ajout d'un acyl-CoA sur un DAG (voie de Kennedy appartenant à la voie procaryotique), soit par le transfert d'un acyl-CoA d'un PC vers un DAG. Après avoir été synthétisés, les TAG sont stockés dans des gouttelettes de lipides formées à la surface du réticulum endoplasmique. CDP-DAG : cytidine diphosphate diacylglycérol ; DAG : diacylglycérol ; FA : acides gras ; FAS : acide gras synthase ; LPA : acide lysophosphatidique ; DGDG : digalactosyldiacylglycérol ; MGDG : monogalactosyldiacylglycérol ; P-éthanolamine : phospho-éthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PG : phosphatidylglycérol ; PI : phosphatidylinositol ; SQDG : sulfoquinovosyl diacylglycérol.

2.5.4. Voies de dégradation

2.5.4.1. Lipolyse

Lorsque les microalgues sont dans l'incapacité de faire de la photosynthèse ou que cette dernière ne fournit pas assez d'énergie, les cellules peuvent puiser dans leurs réserves de carbone, dont les TAG, pour générer de l'énergie. La dégradation complète des TAG commence par la lipolyse : les FA des TAG sont successivement clivés par des lipases pour former un DAG, un MAG, et finalement, des FA libres (FFA) plus un glycérol. Les FFA rejoignent ensuite la β -oxydation pour être recyclés (voir section suivante), tandis que le glycérol peut être envoyé vers la glycolyse (Fig. 2.10). Sous l'action d'une glycérol kinase, le glycérol est converti en glycérol 3-phosphate. Ce dernier est ensuite transformé en phosphate de dihydroxyacétone par une glycérol 3-phosphate déshydrogénase. Enfin, une triose-phosphate isomérase permet de produire du G3P (voir Fig. 2.3).

Bien qu'ils ne soient normalement pas destinés à être consommés, d'autres lipides, comme les PL, les LPL et les galactolipides, peuvent, lors de périodes de stress, subir le même sort grâce à l'action de lipases spécifiques. Le recyclage des lipides structurels non essentiels à la survie peut en effet aider les organismes à s'acclimater à des changements environnementaux en générant de l'énergie ou en se substituant à d'autres lipides. Chez les diatomées, certaines lipases agissant sur les TAG ont été identifiées mais, plus généralement, les substrats des lipases n'ont pas encore été identifiés.

2.5.4.2. β -oxydation

Comme les mammifères, les diatomées possèdent deux jeux de gènes impliqués dans la β -oxydation, l'un agissant dans le peroxysome, l'autre dans les mitochondries (Pereté et al. 2005). La β -oxydation est un processus cyclique qui agit, à peu de choses près, à l'inverse de la FASII. Contrairement à cette dernière, la β -oxydation enlève des atomes de carbone d'un acyl-CoA jusqu'à ce que l'acétyl-CoA soit régénéré (Fig. 2.10). Tout d'abord, un acyl-CoA est produit à partir d'un FFA et d'une CoA par une acyl-CoA synthase. L'acyl-CoA est déshydrogéné par une acyl-CoA déshydrogénase qui produit un énoyl-CoA et une molécule de FADH_2 (qui peut être envoyée à la chaîne respiratoire mitochondriale pour générer de l'ATP). L'énoyl-CoA est ensuite converti en hydroxyacyl-CoA par une énoyl-CoA hydratase. La troisième étape produit un cétoacyl-CoA et du

NADH grâce à l'action d'une hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Enfin, l'action d'une β -céthiolase produit un acétyl-CoA qui peut entrer dans le TCA, et un acyl-CoA qui réintègre la boucle de la β -oxydation.

Dans les FA insaturés, la présence de doubles liaisons carbone-carbone nécessite l'intervention d'isomérase et de réductase agissant sur les énoyl/diénoyl-CoA. Ces enzymes permettent de convertir le groupe acyle en trans- Δ^2 -énoyl-CoA, substrat de l'hydratase énoyl-CoA de la β -oxydation.

Nombre d'éléments restent encore à découvrir et à confirmer concernant le métabolisme des lipides chez les diatomées (Zulu et al. 2018), mais des progrès importants ont été réalisés depuis que les génomes des diatomées *T. pseudonana* (Armbrust et al. 2004) et *P. tricornutum* (Bowler et al. 2008) ont été séquencés. Une grande partie des gènes impliqués dans les voies décrites précédemment a été identifiée, principalement par homologie.

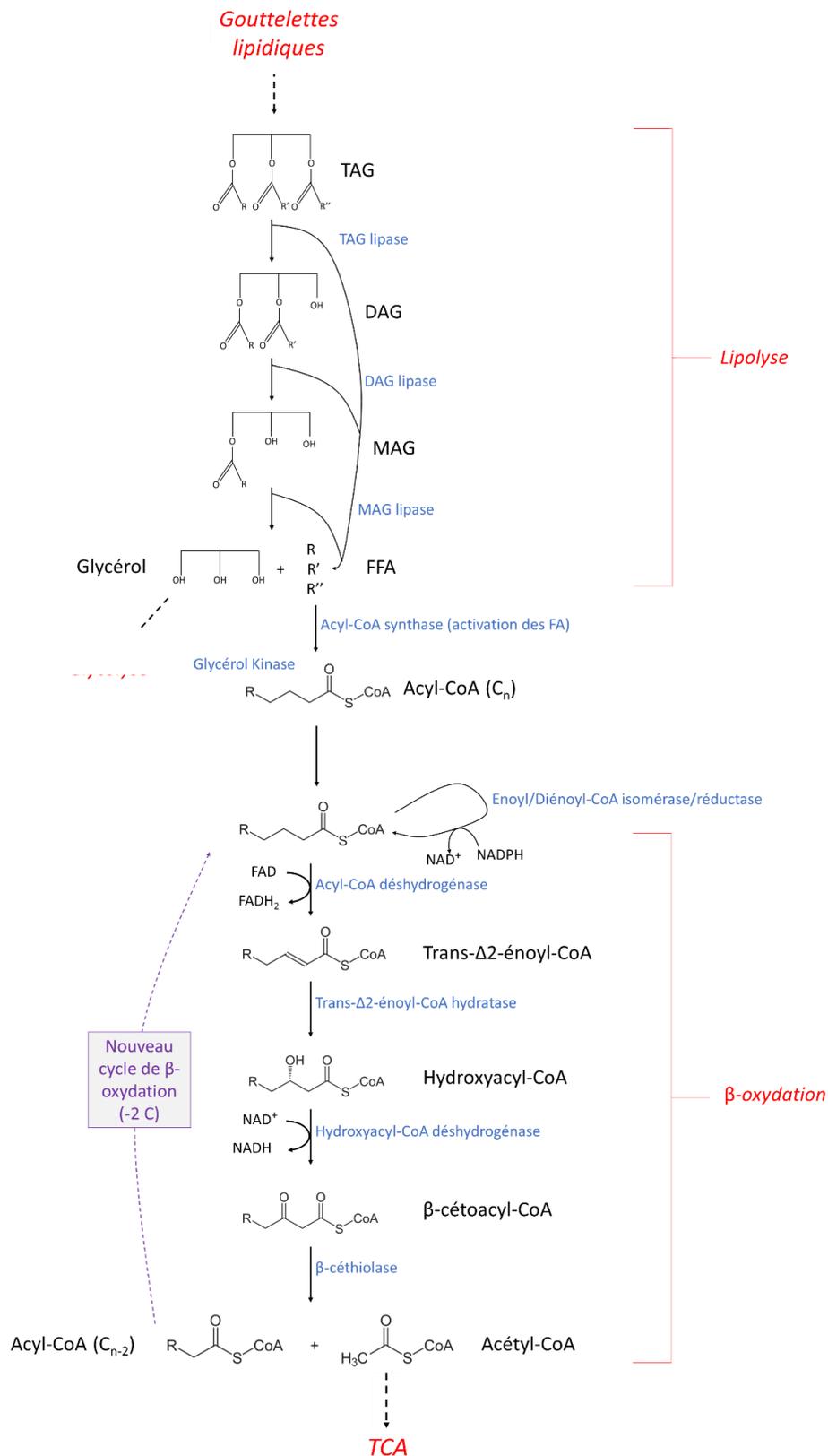


Figure 2.10. Schéma de la β -oxydation. La dégradation des TAG commence par l'élimination des FA du glycérol pendant la lipolyse. Elle se poursuit par dégradation des FA via la β -oxydation qui régénère l'acétyl-CoA initialement utilisé pour la synthèse des FA. Le glycérol peut être envoyé dans la glycolyse pour y être dégradé (voir Fig. 2.3).

2.6. Réservoirs de carbone alternatifs

Deux autres réservoirs de carbone importants sont présents chez les diatomées : les substances polymériques extracellulaires, ou exopolysaccharides (EPS), et les protéines. Ces molécules ont chacune des rôles spécifiques à jouer mais pourraient en théorie être recyclées, au moins en partie, lorsque la survie de la cellule en dépend. En situation de stress important, leur dégradation peut en effet offrir aux diatomées un apport d'énergie supplémentaire qui leur permettrait de survivre, même après l'épuisement des CHY et des TAG.

2.6.1. Protéines

Lorsque certaines protéines sont endommagées ou inutilisées, elles peuvent être décomposées en acides aminés, lesquels sont remobilisés pour la synthèse de nouvelles protéines ou bien dégradés pour générer de l'énergie. Une fois ciblées par ubiquitination (liaison de protéines ubiquitines), les protéines sont reconnues par le protéasome, organelle au sein de laquelle les liaisons peptidiques seront clivées par des protéases. D'autres protéases peuvent également assurer le clivage des liaisons peptidiques dans le milieu acide des vacuoles. Les acides aminés ainsi libérés peuvent ensuite être réassemblés en de nouvelles protéines par les ribosomes ou transformés en différents intermédiaires du TCA : pyruvate, acétyl-CoA, acétoacétate, α -cétoglutarate, succinyl-CoA, fumarate et oxaloacétate (Fig. 2.11).

Plusieurs études ont déjà observé que la teneur des diatomées en protéines diminue pendant une obscurité prolongée (Anderson 1976 ; Gibson et Fitzsimons 1990 ; Handa 1969). Certaines protéines pourraient donc bien constituer une source alternative d'énergie durant la nuit polaire si elles ne sont plus nécessaires à la survie à court terme. Notons que la première étape de dégradation des acides aminés, catalysée par des désaminases, produit également de l'ammonium qui peut être métabolisé par le cycle de l'urée. Ce dernier n'est généralement pas présent dans les plantes mais a été identifié chez les diatomées. Allen et collaborateurs (2011) ont suggéré que le cycle de l'urée pourrait jouer un rôle important lors de limitations en azote en permettant de le recycler.

Dans les prochaines sections, les voies cataboliques des acides aminés protéinogènes seront présentées. Les voies métaboliques de nombreux acides aminés sont reliées entre elles d'une manière complexe (Peng et al. 2015). Certains acides aminés ne peuvent être dégradés « directement », et nécessitent d'être préalablement convertis en un autre acide aminé. Bien qu'ils possèdent une voie de dégradation directe, certains acides aminés étant intermédiaires de synthèse d'autres acides aminés, pourraient, en théorie, être d'abord convertis en ces acides aminés afin d'être dégradés. L'aspartate, par exemple, en tant que précurseur de la lysine, de la glycine, de la sérine, de la thréonine, et de l'arginine, qui peuvent toutes être dégradées d'une manière spécifique, pourrait bien être converti en l'un de ces acides aminés afin d'être dégradé. Mais étant donné que pour être dégradé et rejoindre le métabolisme central, l'aspartate peut être directement converti en oxaloacétate, il semble peu probable que ces voies de biosynthèse coûteuses puissent intervenir dans sa dégradation. Pour cette raison, ne seront présentées ici que les voies de dégradation les plus directes.

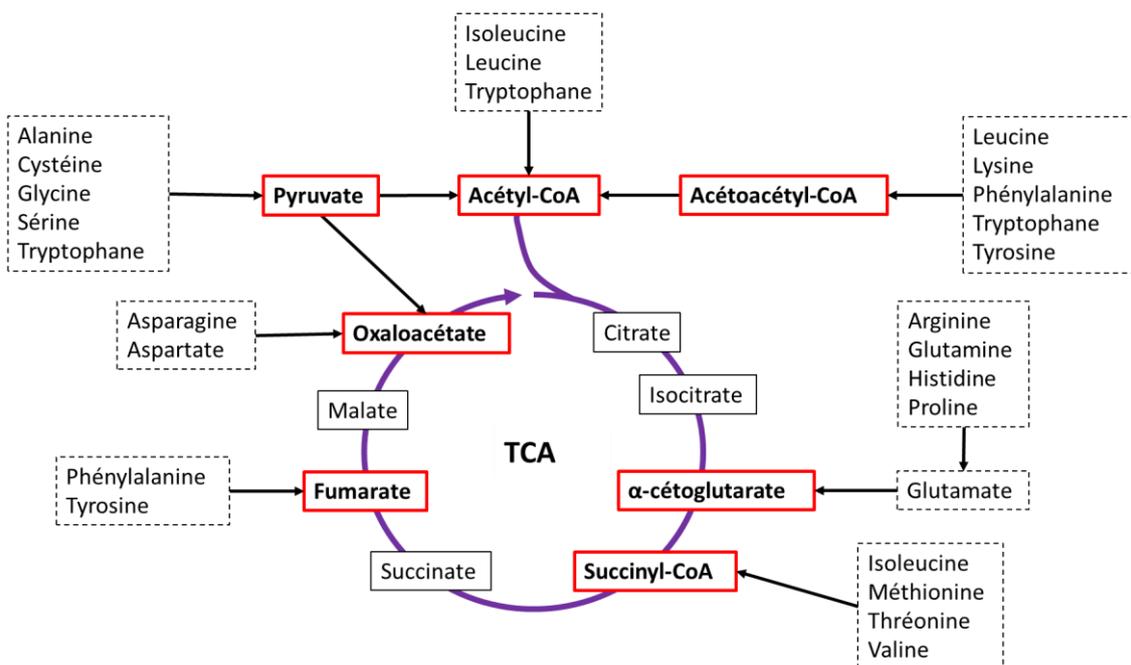


Figure 2.11. Points d'entrée des acides aminés (rectangles en pointillés) protéinogènes dans le TCA. Les cases rouges représentent les produits de dégradation des acides aminés qui entrent dans le TCA ou qui sont directement convertis en intermédiaires du TCA. Les cases noires représentent le reste des intermédiaires du TCA (modifié à partir de Nelson et al. 2008).

2.6.1.1. Acides aminés à chaîne latérale ramifiée

Chez les plantes supérieures, les acides aminés dont on a le plus fréquemment observé le recyclage sont les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (acides aminés ayant une chaîne latérale aliphatique avec une branche : valine, leucine et isoleucine, BCAA = *branched chain amino acid*, Fig. 2.12). En effet, leur dégradation est souvent observée lors de limitations énergétiques, en particulier chez des plantes sénescentes maintenues à une obscurité prolongée (mais simplement aussi pendant la nuit), traitement qui peut conduire à un épuisement des réserves de sucres (Araújo et al. 2010 ; Hirota et al. 2018 ; Ishizaki et al. 2005 ; Peng et al. 2013). Ce mécanisme se produit parfois parallèlement à la consommation des lipides et au recyclage de la chlorophylle chez *A. thaliana* (Araújo et al. 2010). Le recyclage des BCAA a également été observé chez une souche de *P. tricornutum* soumise à un cycle jour-nuit (Smith et al. 2016) et lors d'une limitation en azote (Ge et al. 2014).

Le catabolisme des acides aminés permet d'alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale, directement lors de leur dégradation *via* la production d'accepteurs d'électrons, mais aussi *via* la production d'intermédiaires du TCA (voir Araújo et al. 2010). Les BCAA sont à cet égard particulièrement intéressants puisque leur oxydation est caractérisée par un rendement énergétique parmi les plus importants. Les rendements énergétiques figurant dans la Tableau 2.1 ont été calculés par Hildebrandt et collaborateurs (2015), dont le travail a porté sur le métabolisme des acides aminés chez *A. thaliana*.

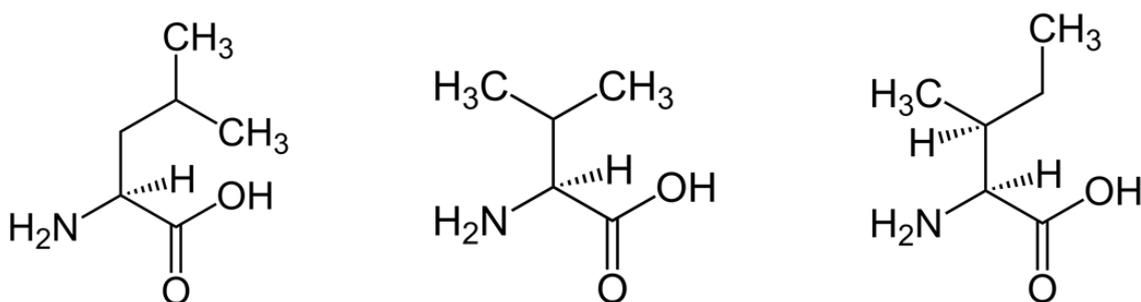


Figure 2.12. Leucine, valine, et isoleucine.

Tableau 2.1. Estimés des rendements énergétiques (nombres de molécules) générés par l'oxydation des acides aminés chez *A. thaliana*. D'après Hildebrandt et al. (2015).

ACIDES AMINES	NADH	FADH ₂	ATP	ATP TOTAL
---------------	------	-------------------	-----	-----------

Tyrosine	11	3	2	34
Leucine	10	4	1	32
Lysine	10	3	2	31.5
Isoleucine	9	3	2	29
Proline	8	3	1	25.5
Arginine	8	2	1	24
Valine	8	2	1	24
Glutamate, glutamine	7	2	2	22.5
Méthionine, thréonine	6	1	1	17.5
Aspartate, asparagine	4	1	1	12.5
Alanine, sérine, cystéine	4	1	1	12.5
Glycine	1	0	0	2.5
Glucose	10	2	4	32

NADH/FADH₂/ATP : nombre de molécules produites au cours du catabolisme et au cours du passage des produits de dégradation dans le TCA ; ATP total : équivalent en ATP du total de l'énergie produite par la dégradation des acides aminés.

Les BCAA sont synthétisés dans les chloroplastes et dégradés dans les mitochondries. La dégradation commence par la désamination des acides aminés par une BCAA aminotransférase qui produit un α -cétoacide et un glutamate (Fig. 2.13). Notons que cette enzyme accomplit également la réaction inverse lors de la synthèse des BCAA. Certaines enzymes peuvent utiliser un, deux ou trois des BCAA comme substrat. L' α -cétoacide est alors soumis à une décarboxylation oxydative qui génère un acyl-CoA grâce à l'action du complexe déshydrogénase α -cétoacide à chaîne ramifiée (BCKDH), complexe composé de trois sous-unités : la sous-unité E₁, appelée α -cétoacide déshydrogénase, permet la décarboxylation du cétoacide, puis l'oxyde pour former un groupe acyle. Elle transfère ensuite ce dernier sur le domaine lipoyle de la sous-unité E₂. E₂ est une dihydrolipoyl transacylase qui transfère le groupe acyle à un CoA. E₃ régénère finalement le domaine lipoyle de l'E₂ par oxydation, ce qui génère du NADH. L'action du BCKDH sur l'acide 4-méthyl-2-oxovalérique (ou cétoleucine), l'acide 3-méthyl-2-oxobutanoïque (ou cétovaline) et l'acide α -céto- β -méthylvalérique provenant de la désamination des BCAA, produit respectivement de l'isovaléryl-CoA, de l'isobutyryl-CoA et le (S)-2-

méthylbutanoyl-CoA. Ces trois produits subissent alors l'action de différentes déshydrogénases pour produire respectivement un 3-méthylcrotonyl-CoA, un méthylacrylyl-CoA, et un trans-2-méthyl-but-2-énoyl-CoA. Ces produits empruntent différentes voies qui généreront du NADH et du FADH₂. Ces voies aboutissent, comme la β-oxydation avec laquelle elles partagent un certain nombre d'enzymes, à la production d'acétyl-CoA et de succinyl-CoA, tous deux capables d'alimenter le TCA (Fig. 2.13).

Leucine - Le 3-méthylcrotonyl-CoA issu du catabolisme de la leucine est successivement transformé en 3-méthylglutaconyl-CoA et en (S)-3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA par une méthylcrotonyl-CoA carboxylase et une méthylglutaconyl-CoA hydratase. Dans le génome de *F. cylindrus*, la seconde enzyme n'a pas pu être identifiée tandis que la première n'a pu l'être avec certitude. Il existe bien chez *F. cylindrus* deux gènes pouvant correspondre aux sous-unités alpha et bêta de la méthylcrotonyl-CoA carboxylase. Mais ces deux séquences codent plus probablement une propionyl-CoA carboxylase, enzyme impliquée dans la dégradation de la valine et de l'isoleucine. Les séquences des deux enzymes ne se distinguent que par de légères différences. Cependant, ces dernières impactent grandement la conformation 3D des protéines résultantes, définissant ainsi la spécificité de leur substrat (Tong 2013). Les résultats des pBLAST (*Protein Basic Local Alignment Search Tool*, outil permettant d'identifier les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences d'acides aminés) et l'analyse des domaines présents sur la sous-unité bêta trouvée chez *F. cylindrus* suggèrent qu'il s'agirait davantage d'une propionyl-CoA carboxylase (données non présentées). Mais les informations dont nous disposons ne permettent pas de conclure avec certitude quant à la nature de cette enzyme.

La voie de dégradation de la leucine peut s'achever par la conversion du (S)-3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) en acétoacétate + acétyl-CoA par une HMG-CoA-lyase. Nous n'avons également pas été capable d'identifier d'enzyme correspondant à la HMG-lyase malgré qu'elle soit présente chez *P. tricornutum* (Pan et al. 2020).

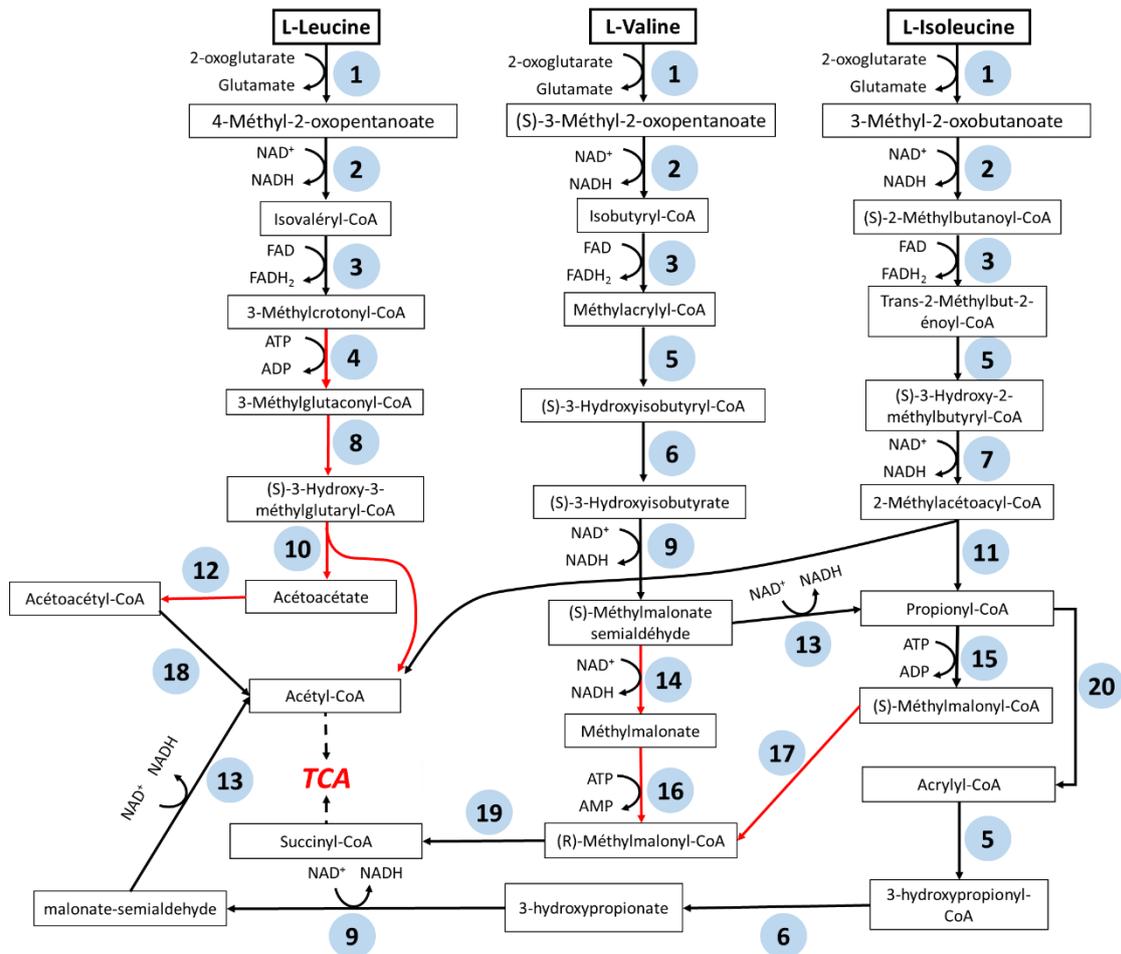
Valine – La déshydrogénation de l'isobutyryl-CoA produit du (S)-3-hydroxyisobutyryl-CoA. Ce dernier, sous l'action d'une 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase et d'une 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, est successivement transformé en (S)-3-hydroxyisobutyrate et en méthylmalonate semialdéhyde. Ce dernier peut alors suivre deux voies qui s'achèvent toutes deux par la production de (R)-méthylmalonyl-CoA pouvant être converti en succinyl-CoA. L'une, plus directe, passe par la conversion du

méthylmalonate semialdéhyde en méthylmalonate puis en (R)-méthylmalonyl-CoA. Cependant, les enzymes permettant la réalisation des réactions associées ne semblent pas exister chez les diatomées. La seconde option consiste en la formation, *via* l'action d'une méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase, de propionyl-CoA, également produit de dégradation de l'isoleucine. Chez les mammifères, le propionyl-CoA est carboxylé en (S)-méthylmalonyl-CoA. Ce dernier peut être transformé en (R)-méthylmalonyl-CoA par une racémase, étape qui précède la formation de succinyl-CoA grâce à une méthylmalonyl-CoA mutase. Nous n'avons pas été capables d'identifier de racémase adaptée dans le génome de *F. cylindrus*. Cependant, ce dernier contient une probable propionyl-CoA carboxylase ainsi qu'une méthyl-malonyl-CoA mutase. Chez les plantes supérieures, qui sont dépourvues de propanoyl-CoA carboxylase, d'épimérase et de mutase, d'autres alternatives ont été proposées (voir Lucas et al. 2007 et référence associées). L'une en particulier verrait le propanoyl-CoA converti par une acyl-CoA oxidase en acrylyl-CoA, qui serait ensuite lui-même dégradé en acétyl-CoA par les mêmes enzymes permettant le passage du méthyl-acrylyl-CoA au propionyl-CoA (voir plus haut).

Isoleucine – Comme mentionné plus haut, la voie de dégradation de l'isoleucine passe également par la production de propionyl-CoA. Pour ce faire, le trans-2-méthyl-but-2-énoyl-CoA est hydraté en (S)-3-hydroxy-2-méthylbutyryl-CoA qui, sous l'action d'une déshydrogénase, forme du 2-méthylacétoétyl-CoA. Finalement, ce dernier est converti en propionyl-CoA et acétyl-CoA par une acétyl-CoA acyltransférase.

Le système ETF/ETFQO (flavoprotéine de transfert d'électrons/ETF:ubiquinone oxydoréductase), situé dans les mitochondries, a aujourd'hui été largement étudié chez les mammifères (Watmough et Frerman 2010), et a également été identifié chez les plantes (Salvato et al. 2014). Chez les mammifères, l'ETF est connu pour accepter des électrons provenant de flavoprotéines très diverses contenant des acyl déshydrogénases impliquées dans la β -oxydation et la dégradation des BCAA (entre autres). Une fois réduit, l'ETF peut transférer les électrons à l'ETFQO qui les fait entrer dans la chaîne respiratoire par réduction des ubiquinones. Chez *A. thaliana*, on sait que l'ETF peut accepter des électrons transférés par l'isovaléryl-CoA, qui intervient dans la troisième étape de la dégradation de la leucine, mais aussi de la D-2-hydroxyglutarate déshydrogénase (D2HGDH). Cette dernière, impliquée dans la dégradation de la lysine,

semble jouer également un rôle dans la dégradation des acides aminés aromatiques (qui possèdent un cycle aromatique : tyrosine, phénylalanine, tryptophane) (Araújo et al. 2010 ; Ishizaki et al. 2005).



- 1 BCAA transaminase
- 2 E_1 α -cétoacid déshydrogénase
- 3 E_2 Dihydropoloyl transacylase
- 4 E_3 Dihydropolypoamide déshydrogénase
- 5 Acyl-CoA déshydrogénase
- 6 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase
- 7 3-méthylisobutyryl-CoA hydratase
- 8 3-hydroxyisobutyryl-CoA déshydrogénase
- 9 3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase
- 10 Méthylglutaconyl-CoA hydratase
- 11 Hydroxyméthylglutaryl-CoA lyase
- 12 Acétyl-CoA acyltransférase
- 13 Acétoacétyl-CoA synthétase
- 14 Méthylmalonate-semialdéhyde déshydrogénase
- 15 Aldéhyde déshydrogénase
- 16 Propionyl-CoA carboxylase
- 17 Méthylmalonyl-CoA synthétase
- 18 Méthylmalonyl-CoA racémase
- 19 Méthylmalonyl-CoA mutase
- 20 Acétyl-CoA acétyltransferase
- 21 Acyl-CoA oxydase/déshydrogénase

Figure 2.13. Voies cataboliques des acides aminés à chaîne ramifiée aboutissant à la production d'acétyl-CoA et de succinyl-CoA pouvant entrer dans le TCA. La troisième étape des trois voies de dégradation aboutit chez *A. thaliana* au transfert d'électron vers le système ETF/ETFQO qui peut alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*. Les flèches rouges représentent les enzymes que nous n'avons pas réussi à identifier. La flèche noire en pointillée, symbolisant la conversion de l'acrylyl-CoA en acétyl-CoA, regroupe les trois étapes permettant la conversion successive de l'acrylyl-CoA en hydropropionyl-CoA, hydroxypropionate, malonate semialdéhyde et acétyl-CoA comme proposé par Lucas et al. (2007).

2.6.1.2. Alanine

L'alanine peut directement être convertie en pyruvate par une alanine aminotransférase (Fig. 2.14).

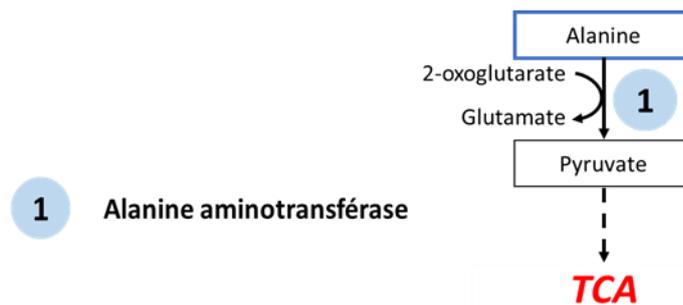


Figure 2.14. Voie catabolique de l'alanine. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*.

2.6.1.3. Asparagine et aspartate

Pour être dégradée, l'asparagine doit préalablement être transformée en aspartate par une asparaginase (Fig. 2.15). L'aspartate peut être directement transformé en oxaloacétate par une aspartate aminotransférase. Il peut également être successivement converti en arginino-succinate et fumarate (un autre intermédiaire du TCA) par une arginine synthase et une argininosuccinate lyase, deux étapes qui font partie du cycle de l'urée. Enfin, il pourrait également être converti en fumarate par les deux étapes de la voie de synthèse de

l'AMP. Cependant, cette possibilité n'apparaît jamais dans la littérature, elle n'a donc pas été prise en compte dans nos analyses.

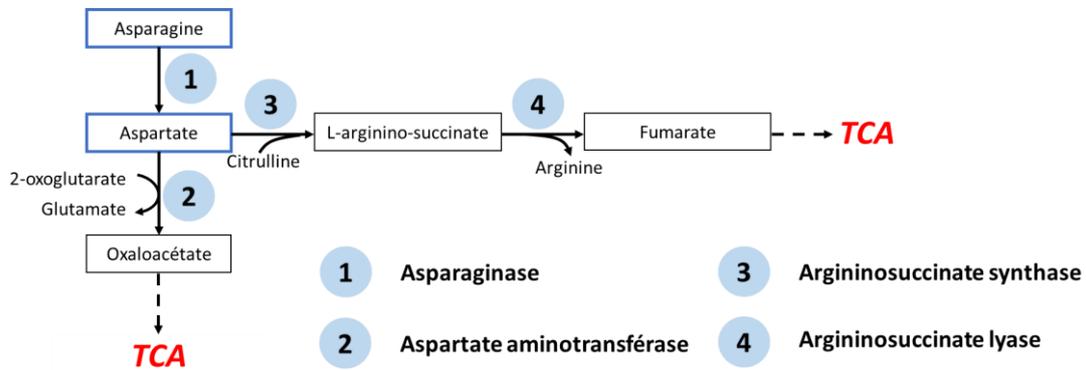
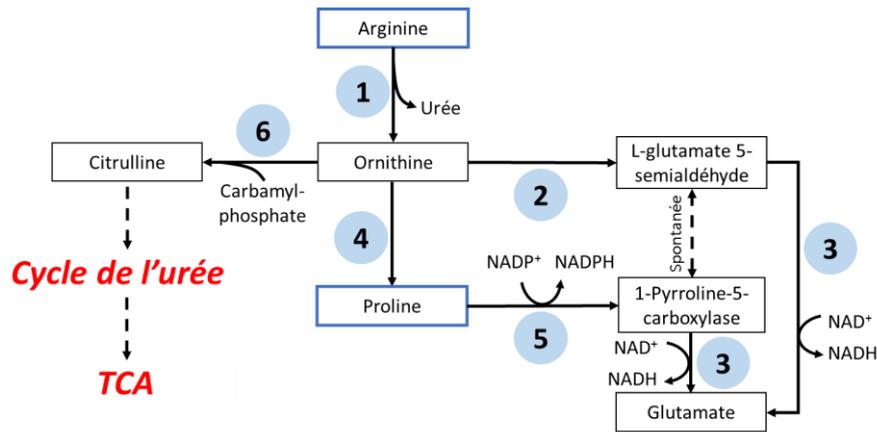


Figure 2.15. Voies cataboliques de l'asparagine et de l'aspartate. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*.

2.6.1.4. Arginine et proline

Pour être dégradée, l'arginine doit d'abord être convertie en ornithine par une arginase, réaction qui libère de l'urée (Fig. 2.16). L'ornithine peut ensuite être convertie en citrulline par une ornithine carbamyl transférase qui peut continuer dans le cycle de l'urée en réagissant avec l'aspartate (Fig. 2.15). L'ornithine peut également être convertie en glutamate (dont le catabolisme sera présenté plus tard) de deux manières différentes : elle peut (1) être convertie successivement en proline, 1-pyrroline-5-carboxylase et glutamate par une ornithine cyclodéaminase, une proline déshydrogénase (dont l'action réduit une ubiquinone), et une 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase ; ou (2) être convertie en L-glutamate 5-semialdéhyde puis en glutamate par une ornithine-oxo-acide transaminase et une 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase.

Les mammifères et les bactéries peuvent également dégrader la proline *via* le métabolisme de l'hydroxyproline (produite à partir de la proline) (Adams et Frank 1980 ; Gryder et Adams 1969). Cette voie aboutit à la production de pyruvate et de glyoxylate. Mais plusieurs étapes de cette voie sont absentes des génomes d'*A. thaliana*, de *F. cylindrus*, de *P. tricornutum* et de *T. pseudonana*.



- | | |
|---|--|
| 1 Arginase | 4 Ornithine cyclodéaminase |
| 2 Ornithine-oxo-acid transaminase | 5 Proline déshydrogénase |
| 3 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase | 6 Ornithine carbamyltransférase |

Figure 2.16. Voies cataboliques de l'arginine et de la proline. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*.

2.6.1.5. Glutamate et glutamine

La glutamine peut être convertie en glutamate par une glutamine oxoglutarate aminotransférase (également connue sous le nom de GOGAT) (Fig. 2.17). Certains organismes possèdent également une glutaminase qui peut convertir la glutamine en glutamate et ammoniac. Ce dernier peut être utilisé par une carbamyl phosphate synthétase dont le produit peut entrer dans le cycle de l'urée (Fig. 2.16). La glutamate synthase peut également combiner l'ammoniac à un 2-oxoglutarate pour produire plus de glutamate lors d'une seconde réaction.

Le glutamate peut entrer directement dans le cycle de TCA, en étant converti en 2-oxoglutarate par une glutamate déshydrogénase. Il peut également passer dans le *shunt* GABA (acide γ -aminobutyrique) pour produire du succinate, autre intermédiaire du cycle de TCA qui peut être transformé en fumarate par une succinate déshydrogénase pour produire du FADH_2 . Tout d'abord, le glutamate est converti en GABA par une glutamate décarboxylase. Une transaminase GABA permet ensuite de produire du succinique semialdéhyde à partir du GABA, réaction qui consomme du pyruvate et libère de

l'alanine. Enfin, le succinique semialdéhyde est converti en succinate par une semialdéhyde succinique déshydrogénase. Au-delà de son rôle connu dans la réponse aux stress oxydatifs chez les plantes supérieures (Al-Quraan 2015), une étude récente a par ailleurs montré que le GABA joue probablement un rôle lors de limitation en carbone chez les plantes supérieures (Michaeli et Fromm 2015).

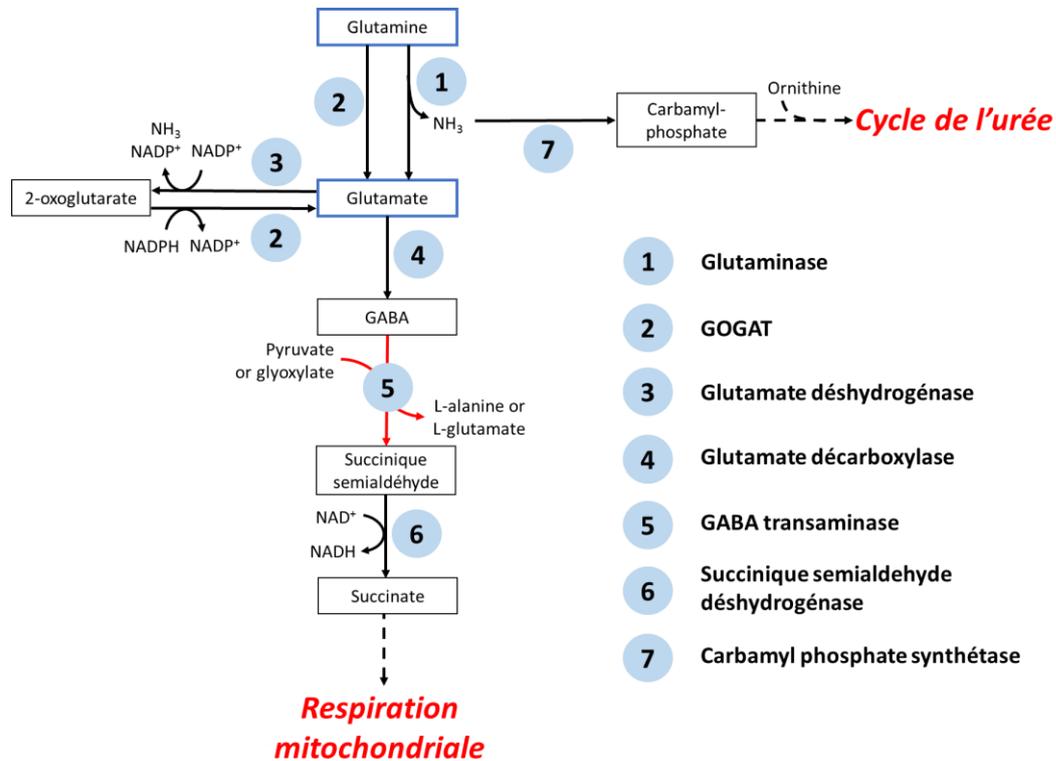


Figure 2.17. Voies cataboliques de la glutamine et du glutamate incluant le *shunt* GABA. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*. Les flèches rouges représentent l'enzyme que nous n'avons pas réussi à identifier.

2.6.1.6. Lysine

Comme les BCAA, la voie catabolique de la lysine (Fig. 2.18) produit une quantité importante d'énergie et intervient aussi lors de limitations en carbone chez *A. thaliana* (Araújo et al. 2010).

La voie de dégradation décrite chez les mammifères ne semble pas exister chez les plantes et microalgues qui ne possèdent pas d'aminoadipate-semialdéhyde déshydrogénase qui permet d'accomplir la troisième étape de la voie. Pan et al. (2020) on décrit une voie de dégradation complète de la lysine chez *P. tricornutum*. Cependant, les deux gènes qui,

selon leurs travaux, sont susceptibles d'assurer cette étape (Phatr3_J28191 et Phatr3_J31906) correspondent en réalité à une succinate semialdéhyde déshydrogénase et probablement une 1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase (qu'ils décrivent d'ailleurs tel quel dans la voie de dégradation du glutamate).

On pense que la dégradation complète de la lysine permet de produire de l'acétyl-CoA, mais cette voie métabolique n'a pas été entièrement élucidée et la plupart de ses réactions restent spéculatives. L'enzyme responsable de la première étape est cependant connue. Cette enzyme bifonctionnelle, appelée lysine-cétoglutarate réductase/saccharopine déshydrogénase (LKR/SDH), convertit successivement la lysine en saccharopine et en 2-amino-adipate-6-sémialdéhyde. Araújo et al. (2010) ont également suggéré qu'une façon de contourner la LKR/SDH serait de convertir la lysine en L-pipécolate et delta-1-pipéridine-6-L-carboxylate, qui s'isomérisent spontanément en 2-amino-adipate-6-semialdéhyde.

Les autres étapes de la voie, n'ayant pas encore été confirmées et impliquant certaines enzymes qui ne sont pas trouvées chez *F. cylindrus*, ne seront pas présentées en détail. Parmi les étapes connues, il faut tout de même noter que certaines conduisent à la formation de glutaryl-CoA, qui peut être transformé par une glutaryl-CoA déshydrogénase en crotonyl-CoA, lui-même pouvant être dégradé en acétyl-CoA par des enzymes intervenant dans la dégradation des BCAA (Hildebrandt et al. 2015).

Chez les plantes terrestres, on suspecte l'implication de deux voies alternatives dans la dégradation de la lysine. Les étapes de la première de ces alternatives ne sont pas connues mais aboutiraient à la production de D-2-hydroxyglutarate à partir d'un intermédiaire de la voie principale. Il a été démontré que D2HGDH convertit ce dernier en 2-oxoglutarate (un intermédiaire du TCA) et transfère les électrons générés pendant la réaction à l'ETF (Engqvist et al. 2011). La deuxième solution propose qu'un intermédiaire de la voie principale puisse être successivement converti en 2-ocopentanoate, butyryl-CoA et crotonyl-CoA, la dernière étape transférant également des électrons à l'ETF (Araújo et al. 2010).

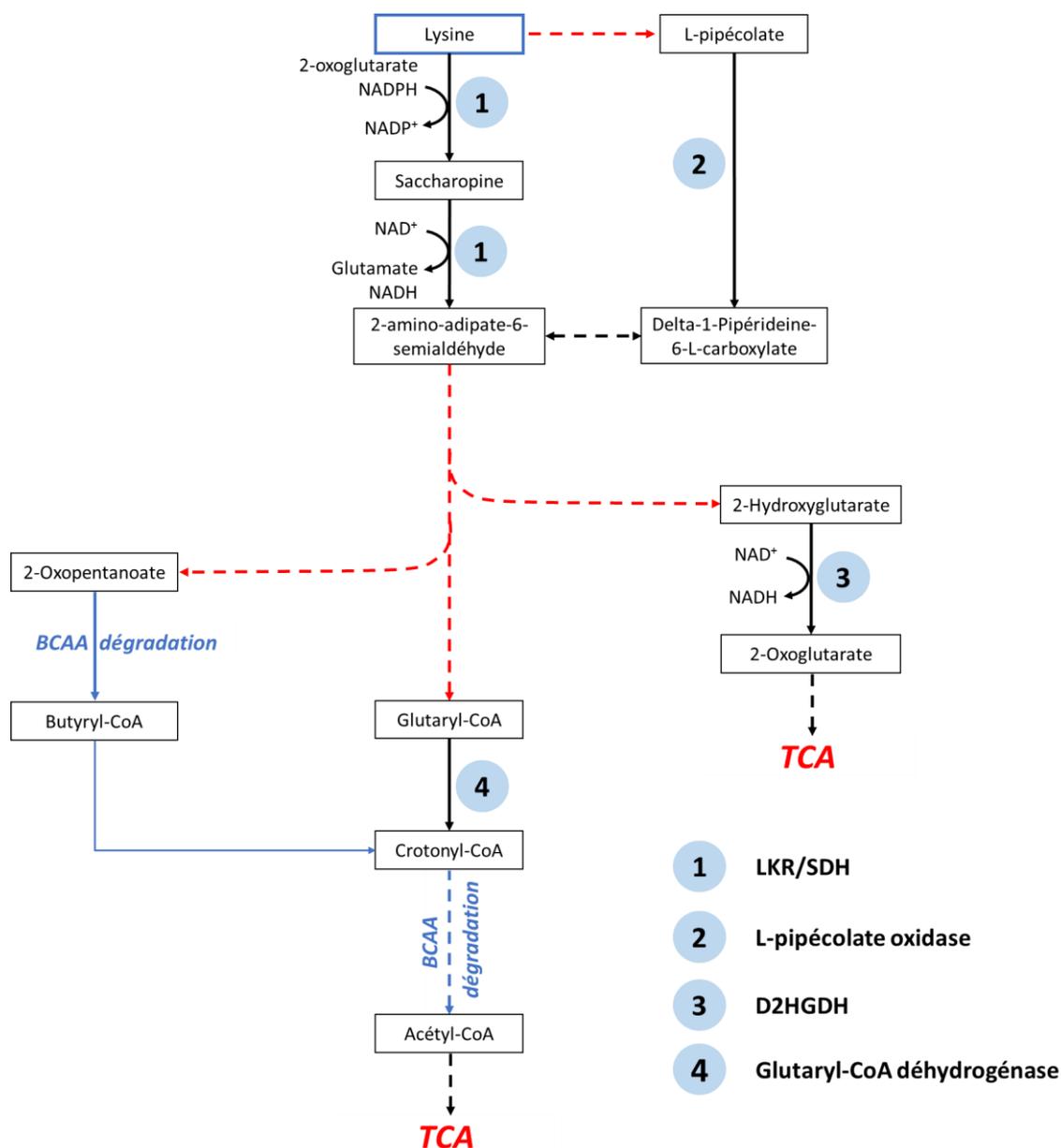


Figure 2.18. Voie catabolique de la lysine. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*. Les flèches rouges pointillées représentent les parties manquantes de la voie hypothétique chez *A. thaliana* (voir Hildebrandt et al. 2015).

2.6.1.7. Sérine, glycine, et thréonine

La thréonine peut être interconvertie avec la glycine ou la sérine par une thréonine aldolase (thréonine \leftrightarrow glycine) et une sérine hydroxyméthyltransférase (sérine \leftrightarrow glycine) (Fig. 2.19). Chacun de ces acides aminés possède une ou plusieurs voies cataboliques possibles, et peut, en théorie, être dégradé *via* de nombreuses voies.

La voie de dégradation de la thréonine débute par sa conversion en 2-oxobutanoate par une ammoniac-lyase, et se poursuit grâce à l'action d'enzymes appartenant à la voie de dégradation des BCAA. En effet, le BCKDH, assurant la deuxième étape de la dégradation des BCAA, peut également agir sur le 2-oxobutanoate pour produire du propionyl-CoA, lui-même intermédiaire de la dégradation de l'isoleucine et de la valine. Le 2-oxobutanoate intervient d'ailleurs dans les voies cataboliques d'autres acides aminés (voir sections suivantes).

La glycine pourrait être dégradée en glyoxylate par une D-aminoacide oxydase. Cependant, on a pas trouvé les enzymes du cycle du glyoxylate permettant de convertir le glyoxylate en succinate et malate chez *F. cylindrus*. La glycine peut également réagir avec du 5,10-méthylènetétrahydrofolate (intermédiaire du métabolisme C1) grâce à l'action du système de clivage de la glycine (GCS, complexe de 4 enzymes) dont l'action génère du CO₂, du NH₃, du tétrahydrofolate et du NADPH. Comme lors de la photorespiration, une hydroxyméthyltransférase peut ensuite transférer un groupe méthyle à une glycine pour générer de la sérine et régénérer le tétrahydrofolate. Notons que l'action du système de clivage de la glycine est réversible puisqu'il peut également produire de la glycine à partir de la sérine (le GCS est également appelé glycine synthase).

La sérine peut, elle, (1) être directement convertie en pyruvate par une sérine hydratase, (2) être convertie en tryptophane par une tryptophane synthase (voir la section 2.6.1.11 sur le tryptophane plus bas), (3) ou suivre la voie de la photorespiration en étant convertie en 3-hydroxypyruvate et en alanine par une sérine-pyruvate/alanine-glyoxylate aminotransférase, en glycérate par une glycérate déshydrogénase, et en 2-phosphoglycérate (intermédiaire de glycolyse) par une glycérate kinase. Enfin, la sérine (4) peut être convertie en acétyl-L-sérine avant d'être transformée en cystéine (voir la section 2.6.1.10 sur la cystéine ci-dessous) par une sérine-O-acétyltransférase et une cystéine synthase, respectivement.

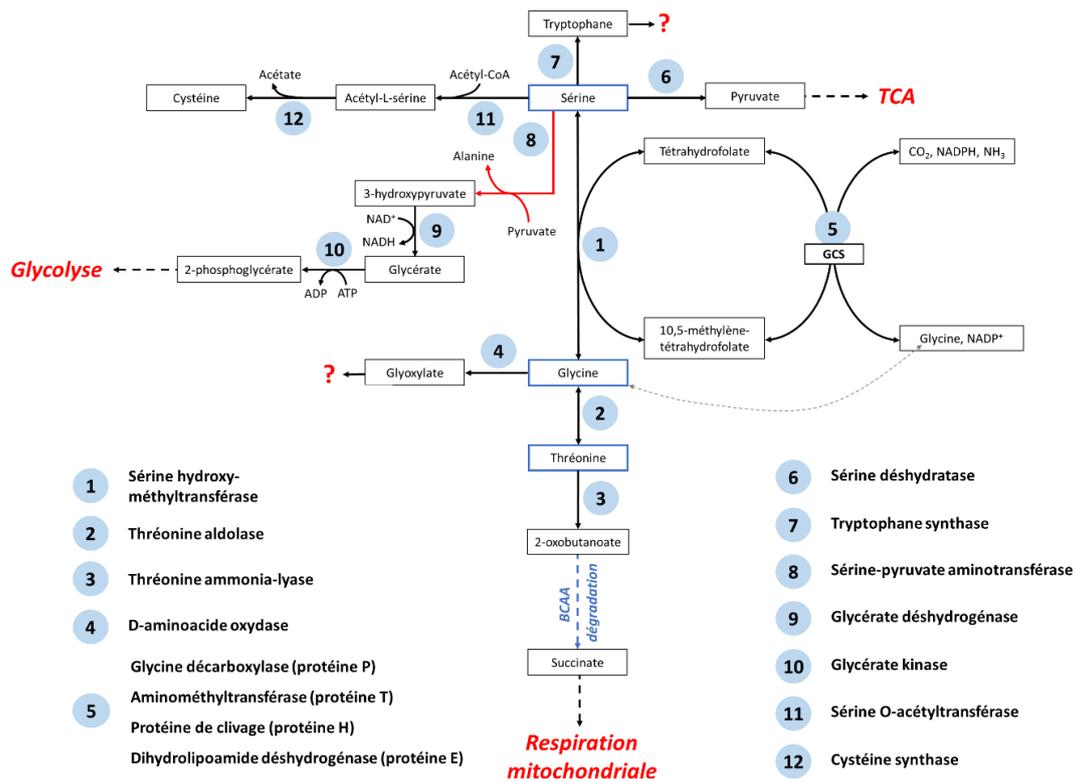


Figure 2.19. Voies cataboliques de la sérine, de la thréonine et de la glycine, y compris le système de clivage de la glycine (GCS). Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*.

2.6.1.8. Histidine

Une histidine aminotransférase peut interconvertir l'histidine et le 2-oxoglutarate avec le glutamate et le (imidazol-5-yl)pyruvate. Pan et al. (2020) ont décrit cette voie chez *P. tricorutum*. Cependant, l'histidine aminotransférase qu'ils ont mentionnée est très probablement une histidinol phosphate aminotransférase, qui accomplit une réaction différente dans le métabolisme de l'histidine. Chez les animaux et les bactéries, des voies impliquant trois à cinq étapes enzymatiques permettent de métaboliser l'histidine en glutamate (Magasanik et Browser 1955), mais aucune de ces enzymes ne peut être trouvée dans les génomes d'*A. thaliana* ou de *F. cylindrus*.

2.6.1.9. Méthionine

La voie de dégradation de la méthionine la plus répandue aboutit à la production de cystéine (voir la section 2.6.1.10 sur la cystéine ci-dessous) et de 2-oxobutanoate (Fig.

2.20). Dans ce processus, la méthionine est successivement convertie en S-adénylméthionine, S-adénylhomocystéine et homocystéine, par une S-adénylméthionine synthase, une méthyltransférase S-adénylméthionine-dépendante et une adénylhomocystéinase, respectivement. Par la suite, l'homocystéine est transformée en cystathionine par une cystathionine β -synthase, et la cystathionine clivée en cystéine et 2-oxobutanoate par une cystathionine γ -lyase. Notons que chez les plantes, la cystathionine β -synthase qui a été identifiée par homologie est supposément une enzyme bifonctionnelle puisqu'il s'agit d'une cystéine synthase capable de convertir l'acétyl-L-sérine en cystéine (voir la réaction 12 de la Figure 2.18). Chez les plantes, il a été montré que la méthionine- γ -lyase évoquée précédemment peut également convertir l'homocystéine en 2-oxobutanoate (Goyer et al. 2007). La méthionine gamma-lyase, identifiée chez certaines bactéries et chez *A. thaliana* (Sato et Nozaki 2009), peut, elle, directement convertir la méthionine en acide oxobutanoïque qui peut être métabolisé par certaines enzymes du catabolisme des BCAA.

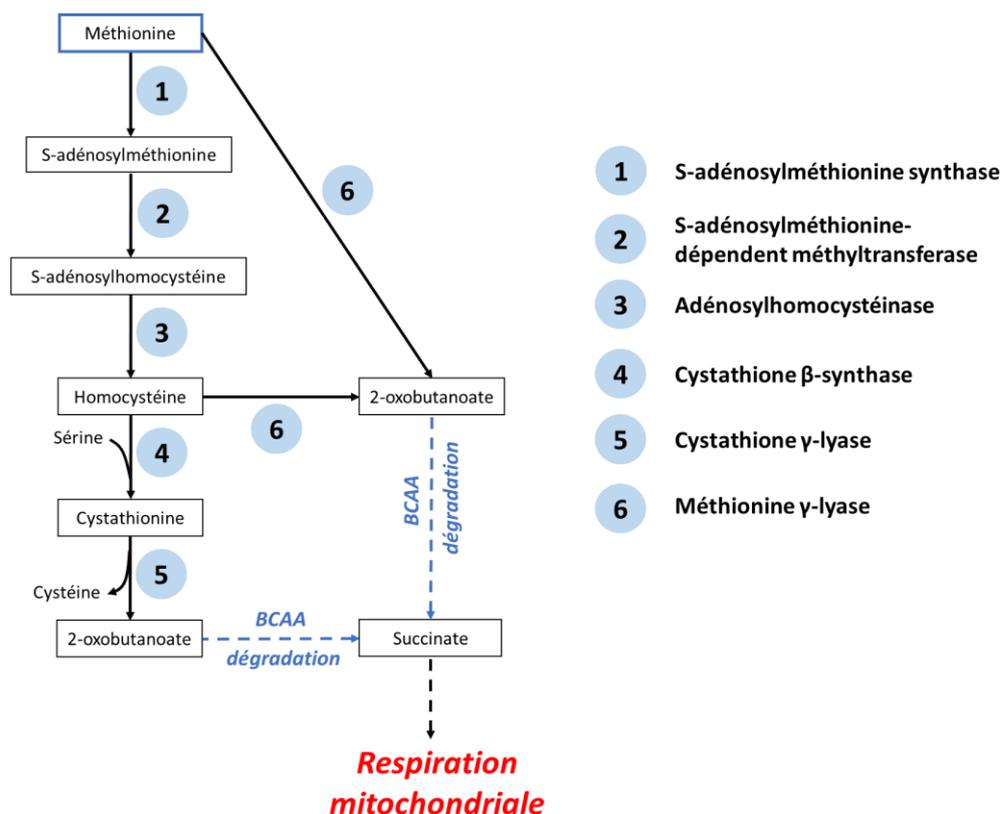


Figure 2.20. Voie catabolique de la méthionine. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*.

2.6.1.10. Cystéine

Plusieurs voies permettent la conversion de la cystéine en pyruvate (Fig. 2.21). La voie du mercaptopyruvate convertit la cystéine en 3-mercaptopyruvate avant que ce dernier ne soit converti en pyruvate. La première étape de cette voie est normalement assurée par une cystéine transaminase. Toutefois, cette enzyme n'est pas trouvée chez tous les organismes. Chez certains, cette réaction peut être assurée par une aspartate transaminase. La deuxième réaction est catalysée par une 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase. Les deuxième et troisième voies passent par la production directe de pyruvate grâce à une cystéine désulfhydrase ou une kynurénine-oxoglutarate transaminase. Une quatrième possibilité est la conversion de la cystéine en alanine par une cystéine désulfurase. Enfin, une voie encore hypothétique suppose que la cystéine puisse être convertie en cystéine sulfiniate par une cystéine dioxygénase, et que la cystéine sulfiniate soit convertie en 3-sulfinylpyruvate (un intermédiaire supposé du catabolisme de la cystéine qui se décompose spontanément en pyruvate et en sulfite) par une transaminase.

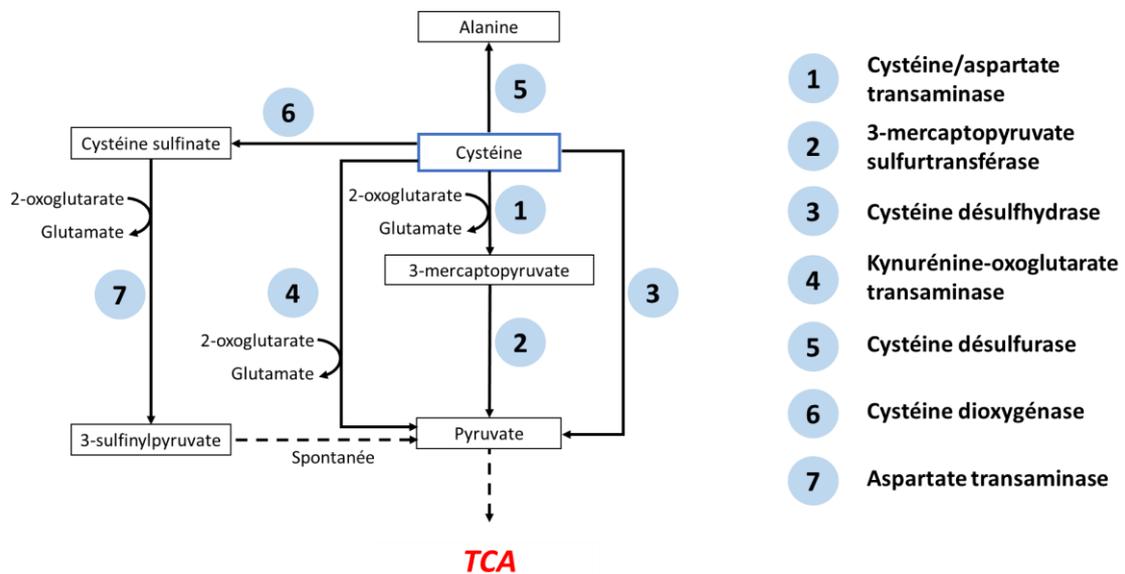


Figure 2.21. Voie catabolique de la cystéine. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*.

2.6.1.11. Acides aminés aromatiques

Tryptophane – Chez les animaux, le tryptophane est dégradé tout au long de la voie de la kynurénine qui aboutit à la production de NAD^+ (Moroni 1999). Cette voie génère également du glutaryl-CoA qui peut être dégradé en acétyl-CoA. Cependant, cette voie

ne semble pas être présente chez les plantes pour lesquelles les voies cataboliques du tryptophane restent inconnues. Chez *P. tricornutum* une tryptophanase, enzyme d'origine bactérienne qui permet de dégrader le tryptophane directement en pyruvate et en indole, est présente (Pan et al. 2020). Cependant, elle n'a, semble-t-il, pas été conservée/acquisée par *F. cylindrus*.

Phénylalanine et tyrosine – Chez les mammifères, la phénylalanine et la tyrosine peuvent être dégradées par la voie de dégradation de la tyrosine (Fig. 2.22). Tout d'abord, la phénylalanine doit être convertie en tyrosine par une phénylalanine hydroxylase. Les étapes suivantes permettent de dégrader la tyrosine en fumarate (un intermédiaire du cycle de TCA) et en acétoacétate. Ces étapes correspondent à la conversion successive de la tyrosine en 4-hydroxyphénylpyruvate, en homogentisate, en maleylacétoacétate, en fumarylacétoacétate, qui est finalement clivé en acétoacétate et en fumarate. Ces réactions sont catalysées respectivement par une tyrosine aminotransférase, une 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase, une 1,2-dioxygénase homogénéisée, une maléthylacétoacétate isomérase et une fumarylacétoacétase. Chez *F. cylindrus*, on a été en mesure de n'identifier que les enzymes permettant de dégrader la tyrosine jusqu'à l'homogentisate, bien que les enzymes manquantes soient présentes dans le génome de *P. tricornutum* (Pan et al. 2020). Notons que la tyrosine est, selon l'analyse de Hildebrandt et al. (2015), l'acide aminé protéinogène le plus énergétique (Tableau 2.1).

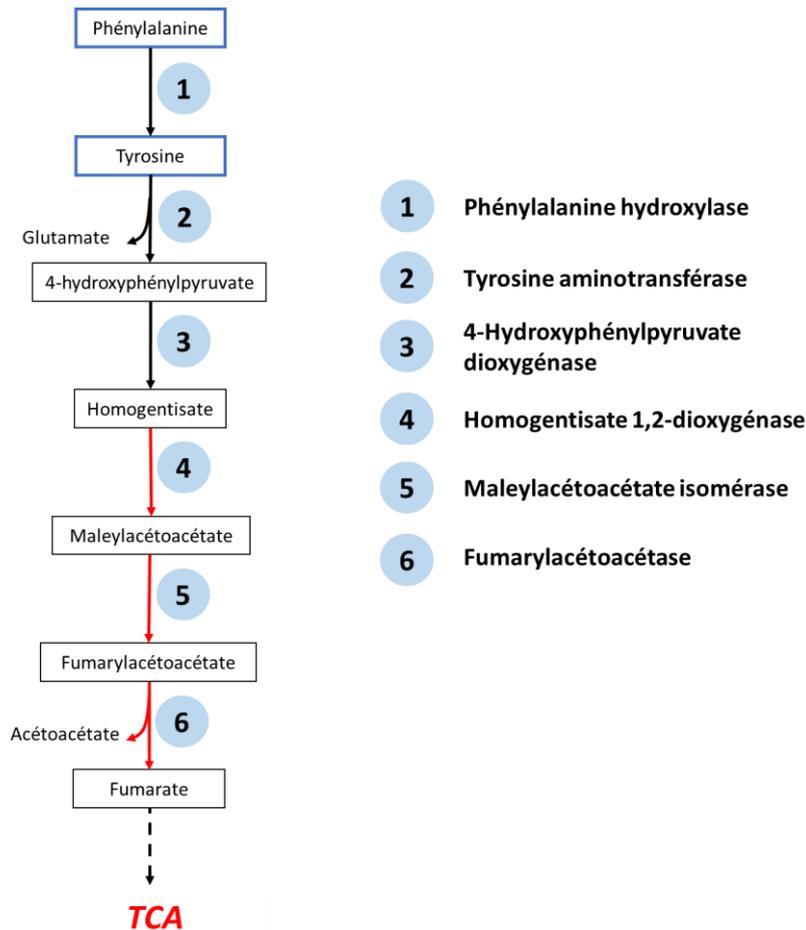


Figure 2.22. Voies cataboliques de la phénylalanine et de la tyrosine. Les enzymes (cercles bleu clair) ont été identifiées par homologie dans le génome de *F. cylindrus*. Les flèches rouges représentent les enzymes que nous n'avons pas réussi à identifier.

2.6.1.12. Dégradation des protéines

La dégradation vacuolaire assurée par le transport de produits cellulaires lors de la macroautophagie offre une alternative à la protéolyse du protéasome pour effectuer le désassemblage des protéines. Dans les cellules eucaryotes, la macroautophagie, qui permet la dégradation de matériel cytoplasmique inutile ou endommagé, n'est active qu'à un faible niveau dans des conditions optimales de croissance. Chez *A. thaliana*, il a été démontré que l'autophagie joue un rôle essentiel dans le recyclage des BCAA lors d'une grande variété de stress et lors de limitations en carbone notamment (Hirota et al. 2018 ; Pu et al. 2017 ; Izumi et al. (2019) et références dans ce document). Les principales étapes de l'autophagie semblent être bien conservées chez les plantes, les mammifères et les levures. Premièrement, (1) l'assemblage du complexe Atg1 (pour *autophagy related gene*

1) (équivalent à ULK1 chez l'homme) permet l'induction de la formation de vésicules autophagiques. (2) Le cytoplasme contenant le matériel ciblé est isolé du reste de la cellule par une membrane appelée phagophore (nucléation). Ensuite, (3) le phagophore se développe en un autophagosome à double membrane qui englobe complètement le matériel à dégrader (élongation). (4) L'autophagosome se dirige vers la vacuole avec laquelle il fusionne (fusion). (5) Enfin, le matériel cellulaire est libéré dans le lumen acide de la vacuole où il est dégradé par différents types d'hydrolases (dégradation) (Mizushima 2007 ; Xi et al. 2014). L'autophagie n'a été que peu étudiée chez les microalgues, mais a été associée au métabolisme des lipides et à la dégradation des protéines (Pérez-Pérez et al. 2017 ; Schwarz et al. 2017 ; Zhao et al. 2014). De nombreux homologues des gènes ATG peuvent être identifiés dans les génomes des microalgues (Jiang et al. 2012). Nous avons donc décidé d'explorer la possibilité que l'autophagie joue un rôle dans la survie des diatomées à l'obscurité.

2.6.2. Pigments

Les chlorophylles, riches en carbone et en azote, peuvent être dégradées pendant certaines phases de croissance d'*A. thaliana*. Cela permet d'en recycler les éléments de base et d'éliminer la chlorophylle inutile afin d'empêcher la production d'intermédiaires de dégradation toxiques (Hörtensteiner 2006). Comme la plupart des pigments deviennent inutiles pendant la nuit polaire, ils pourraient en théorie être partiellement consommés. La voie de dégradation de la chl *a* chez *A. thaliana* n'a pas été entièrement reconstruite. Cependant, nous savons qu'elle commence avec la conversion de la chl *a* en phaeophytine. La phéophytine peut ensuite être clivée en phytol et phéophorbide. Alors que ce dernier passe par la voie du phéophorbide *a* oxydase qui produit des catabolites non fluorescents, le phytol peut être métabolisé en acide phytanique. Chez les animaux, l'acide phytanique est converti en phytanoyl-CoA (sa forme active) qui peut ensuite entrer dans l' α -oxydation. Cette voie élimine le premier carbone des FA à chaîne ramifiée possédant un groupe 3-méthyle qui rend la dégradation du FA impossible *via* la β -oxydation. L' α -oxydation produit du pristanate qui peut alors entrer dans la β -oxydation. Par cet intermédiaire, une partie du contenu en chl *a* pourrait également être utilisée comme source d'énergie alternative à l'obscurité. Cependant, bien que certains des gènes impliqués dans l' α -oxydation aient été identifiés chez *A. thaliana*, l'existence de

l'ensemble de cette voie reste à confirmer. De plus, nous n'avons été capables de ne trouver que très peu de gènes homologues, candidats des gènes impliqués dans cette voie chez *F. cylindrus*.

2.6.3. Exopolysaccharides

Les diatomées sont capables de produire de grandes quantités d'EPS. Les EPS trouvés dans la glace et les canaux de saumure sont majoritairement produits par les microalgues et peuvent représenter plus de 35 % du COD (Underwood et al. 2010 et 2013). Les EPS jouent de nombreux rôles chez les diatomées : leur accumulation dans le milieu agit comme une barrière physique qui protège les cellules des prédateurs et de conditions environnementales abiotiques potentiellement délétères (De Philippis et al. 2001 ; De Philippis et Vincenzini 1998 ; Kumar et al. 2007). Ils sont également impliqués dans la réponse à différents types de stress (stress nutritif : Ai et al. 2015 ; Staats et al. 2000 ; salinité élevée et stress dû au froid : Abdullahi et al. 2006 ; Allan et al. 1972). Par ailleurs, ils permettent aux diatomées pénales qui les sécrètent par leur raphé de se déplacer (Lind et al. 1997), d'adhérer à des substrats pour former des biofilms, et de communiquer (Mann et Wozniak 2012). Enfin, certains EPS qui entrent dans la composition de la matrice organique associée aux frustules (Swift et Wheeler 1992) les protègent de la dégradation chimique.

Les EPS sont principalement composées de sucres, mais ils comprennent également des lipides et des protéines (Ai et al. 2015 ; Underwood et Paterson 2003 ; Vesna et al. 2013). Plusieurs études ont montré que, malgré de légères variations de composition d'une espèce à l'autre, les sucres constitutifs des EPS des diatomées, y compris *F. cylindrus*, sont principalement composés de mannose, de fucose, de glucose, de rhamnose, d'arabinose, d'acides uroniques et, dans une moindre mesure, de xylose et de ribose (Aslam et al. 2012, 2016 et 2017 ; voir également les revues de Rossi et al. 2016 et Xiao et al. 2016).

Les voies métaboliques des polysaccharides sont similaires chez les eucaryotes et les procaryotes. Synthétisés dans le cytosol, les monosaccharides sont ensuite convertis en sucres nucléotidiques qui sont transférés dans l'appareil de Golgi où les résidus de sucre sont, grâce à l'action de glycosyltransférases, assemblés en polysaccharides qui seront

excrétés par exocytose dans des vésicules (Wheterbee et al. 1998). Les sucres nécessaires à la synthèse des EPS proviennent de la gluconéogenèse, mais également de la dégradation de la CHY (Underwood et al. 2004). Le métabolisme des EPS chez les diatomées a d'abord été établi grâce à des techniques de bioinformatique (voir Gügi et al. 2015 et les références qui y figurent). Plus récemment, Aslam et collaborateurs (2018) ont reconstruit le métabolisme des EPS de *F. cylindrus*.

Pour les algues piégées dans la glace pendant l'hiver polaire, la production d'EPS pourrait être indispensable pour leur survie aux stress salin et thermique, ainsi que pour résister à la formation de cristaux de glace. Mais une partie des EPS non indispensables à la survie pourrait éventuellement être consommée. Le séquençage des premiers génomes de diatomées a révélé que même les diatomées n'étant pas capables de croître à l'obscurité possédait un potentiel hétérotrophique. Si les diatomées possédaient les transporteurs et hydrolases adéquats, les EPS pourraient alors offrir une source supplémentaire de carbone.

Chapitre 3 – Métabolisme du carbone and dégradation des acides aminés ramifiés chez *Fragilariopsis cylindrus* lors d'une acclimatation à l'obscurité prolongée

Le travail présenté dans ce chapitre a (en partie) été effectué en vue de faire l'objet d'une soumission à un journal scientifique. Il a donc été rédigé en anglais, bien qu'il n'ait pu être finalisé à temps pour être soumis avant le dépôt de la thèse.

3.1 Résumé

La dégradation des principaux réservoirs riches en carbone (glucides, lipides, protéines) est considérée comme l'une des stratégies utilisées par les diatomées pour survivre à la nuit polaire. Ce travail présente certaines des premières données biomoléculaires générées pour comprendre la gestion du métabolisme du carbone d'une diatomée pendant la nuit polaire. Des cultures axéniques de la diatomée écologiquement dominante *Fragilariopsis cylindrus* ont été acclimatées à une lumière constante avant d'être placées à soumise à l'obscurité totale pendant trois mois. Une analyse différentielle de l'expression des gènes a été réalisée, les conditions initiales étant prises comme référence pour la normalisation. Les principales voies de synthèse et de dégradation des glucides, des lipides et des acides aminés protéinogènes connues chez les diatomées et considérées comme pertinentes pour l'étude ont été reconstituées ou extraites d'études antérieures. Pendant les premiers jours d'obscurité, certaines cellules ont complété un cycle cellulaire en cours, et *F. cylindrus* a semblé puiser dans tous ses principaux réservoirs de carbone pour compenser l'absence de lumière. Au sixième jour d'obscurité, toutes les cellules avaient terminé leur division et une régulation négative globale des gènes s'est produite et a duré jusqu'à la fin de l'acclimatation. La dégradation de la chrysolaminarine par la glycolyse cytosolique et la voie des pentoses phosphates sont restées à un niveau d'expression relatif similaire à celui des conditions initiales pendant les premières semaines d'obscurité. Le catabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée (i.e., leucine,

isoleucine, valine ; BCAA) ainsi que celui de la tyrosine et de la phénylalanine, se sont distingués des autres voies de dégradation en étant régulés à la hausse tout au long de la période d'obscurité. Une fois que les cellules entrent en dormance, nous proposons que ces acides aminés puissent représenter la source d'énergie la plus importante pour la survie à long terme par rapport aux conditions initiales d'acclimatation. L'implication possible de l'autophagie dans le recyclage des protéines est également discutée.

Mots-clés : acides aminés à chaîne ramifiée, métabolisme du carbone, survie à l'obscurité, diatomée polaire, nuit polaire, transcriptomique.

3.2 Abstract

The degradation of major carbon-rich pools (carbohydrates, lipids, protein) is considered one of the strategies used by diatoms to survive the polar night. This work presents some of the first biomolecular data generated to understand the management of carbon metabolism in a diatom during the polar night. Axenic cultures of the ecologically dominant diatom *Fragilariopsis cylindrus* were acclimated to constant light before being placed in total darkness for three months. Differential analysis of gene expression was conducted, with initial conditions taken as a reference for normalization. Major synthesis and degradation pathways of carbohydrates, lipids and proteinogenic amino acids known in diatoms that were considered relevant to the study have been reconstructed or retrieved from previous studies. During the first days of darkness, some cells finished an ongoing cell cycle, and *F. cylindrus* appeared to draw on all its major carbon pools to compensate the absence of light. By the sixth day of darkness, all cells had completed division and a global down-regulation of gene occurred and lasted until the end of acclimation. Chrysolaminarin degradation through cytosolic glycolysis and the pentose phosphate pathway remained at a similar relative expression level to that of the initial conditions during the first weeks of darkness. The catabolism of branched chain amino acids (i.e., leucine, isoleucine, valine; BCAA) as well as possibly tyrosine and phenylalanine, stood out from other degradation pathways by being upregulated throughout the dark period. Once cells enter dormancy, we propose that these amino acids may represent the most important energy source for long-term survival relative to initial acclimation conditions. The possible implication of autophagy in protein recycling is also discussed.

Keywords: branched-chain amino acid, carbon metabolism, darkness survival, polar diatom, polar night, transcriptomics.

3.3 Introduction

Despite being deprived of light for a significant period of the year (known as the polar night), some regions of the Arctic Ocean are among the most productive areas of the global ocean (see Matrai et al. 2013). The productive summer blooms in the Arctic are dominated by cold-adapted planktonic and sympagic diatoms (Gosselin et al. 1997). It is known that to survive the polar night, one of the strategies used by these organisms is growth arrest and metabolic downregulation, combined with the consumption of internal carbon-rich reserves (Handa 1969; see Peters 1996, and references therein). Under non-limiting growth conditions, proteins and membrane lipids represent the majority of a cell's dry weight, but cells also store carbon in the form of triglycerides (TAG, reserve lipids) and carbohydrates in the form of chrysolaminarin (main reserve carbohydrates) for later use (Jallet et al. 2016; Remmers et al. 2018). While TAG and chrysolaminarin are naturally synthesized to store excess fixed carbon, structural lipids and amino acids recovered from protein breakdown by the proteasome (Hochstrasser 1996) or *via* macroautophagy (hereafter termed autophagy) can also be recycled (Dunn et al. 1994). The degradation of these three major carbon pools (1) directly generates energy (ATP) and reducing power (NADH, NADPH, FADH₂) necessary for the functioning of cells, (2) produces intermediate molecules used to synthesize other cell components, and (3) allows the production of intermediates able to enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle, such as pyruvate, which generates even more energy and reducing power. In parallel, cells can decrease their metabolism and shut down non-necessary functions to reduce needs and reallocate energy to more essential functions, thus increasing survival time until better growth conditions return.

In spite of numerous previous studies, the strategies that diatoms have evolved to survive the polar night are not yet fully understood. Most of these studies focused on physiological and biochemical parameters. While providing a glimpse of the potential importance of carbon reserves in the survival of diatoms during prolonged darkness (Handa 1969: carbohydrates, lipids and proteins contents; Morin et al. 2019 and Chapter

1 of this thesis: POC and semi-quantitative estimation of neutral lipids; Peters and Thomas 1996 and Peters 1996: POC; Schaub et al. 2017: lipid composition and content; Walter et al. 2017: carbohydrate content), a more complete understanding of carbon metabolism is lacking. More recently, Kennedy and al. (2019) introduced biomolecular techniques for the first-time, combining proteomics with more classical physiological parameters to study the survival of cultures of *Fragilariopsis cylindrus* (a polar pennate diatom) to prolonged darkness. They notably highlighted the importance of many catabolic pathways of carbon metabolism that were potentially involved in survival. Their results notably suggest that the Entner-Doudoroff pathway (ED), associated with the lower part of mitochondrial glycolysis, and, to a lesser extent, protein and lipid degradation, may provide oxidative phosphorylation with the necessary energy for survival.

We conducted a three-month dark acclimation (DA) experiment with a different strain of *F. cylindrus*, whose genome was published by Mock et al. 2017. Transcriptomic data were generated in an attempt to better understand the acclimation processes involved in survival to prolonged darkness. Flow cytometry data acquired during this experiment (see Chapter 1 of this thesis; see also Morin et al. 2019) showed that *F. cylindrus* consumes TAG during the prolonged darkness period, and that the decreased size of this carbon pool over time could in part allow the maintenance of cell viability. But, as Kennedy et al. (2019) and other studies mentioned above have shown, TAGs are unlikely to be the only molecules involved in assuring survival. In the present work, transcriptomic data are analyzed, with a focus on all the known pathways of carbon metabolism. The pathways that were studied, as well as their interaction with TCA and mitochondrial respiration, are illustrated in Fig. 3.1.

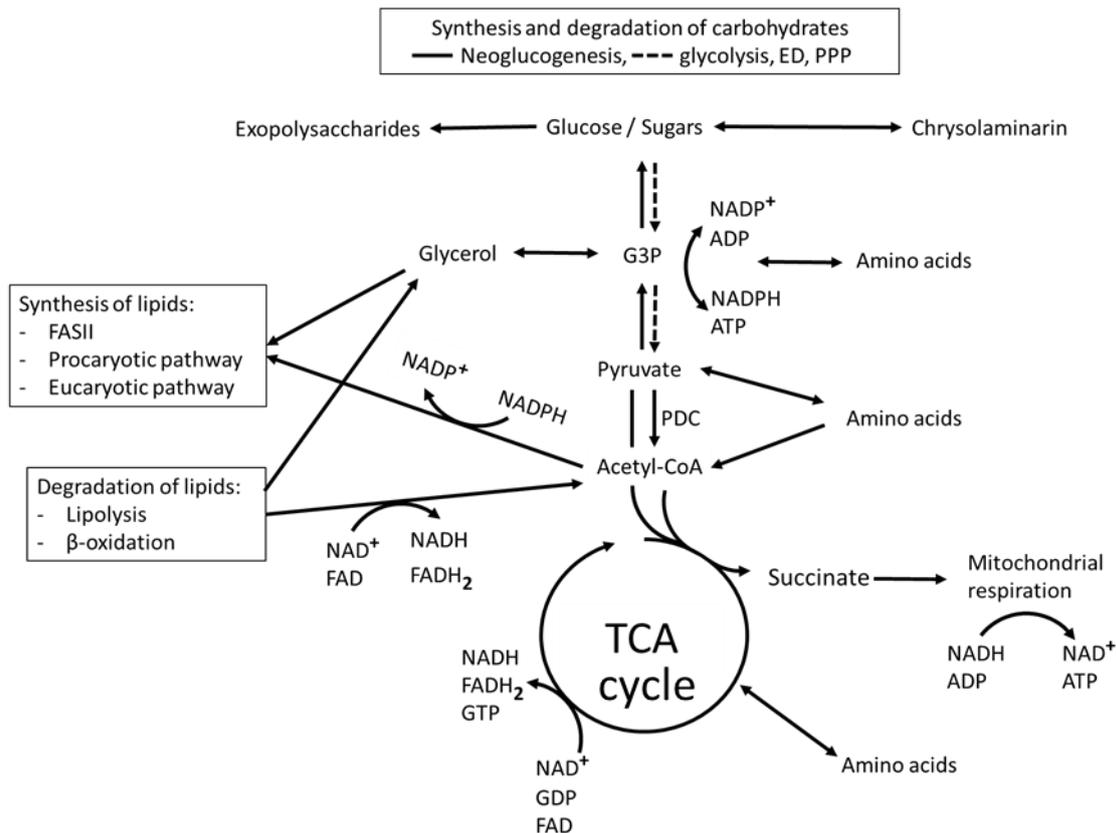


Figure 3.1. Simplified representation of connections between the metabolism of carbohydrates, pyruvate, lipids, amino acids, the TCA cycle and mitochondrial respiration. The major routes that fixed carbon can take toward energy and reducing power production as well as possible exchanges between major carbon compartments are indicated. Individual amino acids, free ribonucleotides, nicotinamide adenine dinucleotides and flavin adenine dinucleotides produced or consumed during amino acid synthesis or degradation are not shown. ED: Entner-Doudoroff pathway; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; PDC: pyruvate dehydrogenase complex; PPP: pentose phosphate pathway; TCA: tricarboxylic acid.

The differential expression analysis revealed that *F. cylindrus* placed in darkness appears to draw on all its carbon reserves while some cells complete an ultimate cell cycle during early-acclimation to darkness. Once cell density stabilized, cells entered a dormancy state illustrated by a global downregulation of gene expression. Only genes involved in chrysolaminarin degradation, cytosolic glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway (PPP) were not downregulated. The catabolism of branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine; BCAA) (and possibly that of tyrosine and phenylalanine) may represent indispensable sources of energy during prolonged darkness as genes encoding

these pathways were upregulated throughout the dark period. The potential involvement of lipid degradation remains more enigmatic.

3.4. Material and Methods

3.4.1. Organism and cultures

The samples for this experiment were collected during the 3-month DA described in the first chapter of this thesis. The experiment was conducted with a monoclonal axenic strain of the polar diatom *F. cylindrus* (Grunow) Krieger isolated from the strain CMMP1102 (NCMA, Bigelow, USA). Triplicates of batch cultures grown in artificial sea-water enriched with Aquil medium (Price et al. 1989) were acclimated to continuous light (30 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in 80 L glass cylinders maintained in a cold room (0 °C). The cultures were constantly bubbled with filtered air and agitated with a magnetic stirrer. Once acclimated and cell concentrations were close to 1×10^6 cells.mL⁻¹, the cultures were maintained in total darkness for approximately 3 months. Details about the different devices and manipulations can be found in Chapter 1. Axenicity of the cultures was verified at least twice a week with a flow cytometer and SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO (ThermoFisher, catalog No: S7563). SYBR Green I allows to detect the presence of contaminants (typically bacteria) by staining nucleic acids (see complete protocol in Chapter 1).

3.4.2. Cell concentration

Cell concentration was determined with a flow cytometer (Guava® easyCyte™ BGV HT, Millipore-Merck KGaA, Darmstadt, Germany, catalog No. 0500-4030). Cells were distinguished from other particles thanks to the red fluorescence emitted by chl *a* after excitation with a blue laser (488 nm, 150 mW). The red fluorescence emission was measured using a red filter (695/50 nm). Data were analyzed with the Guava InCyte™ Software (v. 3.1). The detailed procedure can be found in Chapter 1.

3.4.3. ARN sequencing

3.4.3.1 Sampling

Because rapid physiological changes were expected to occur just after the onset of dark acclimation, the sampling schedule was as follows: 0 h, 6 h, 24 h, 3 days, 6 days, 16 days, 31 days, 63 days, and 87 days after the onset of the dark period.

One 500 mL aliquot of each of the three cultures was sampled before it was centrifuged at 0 °C and rinsed with sterilized mPBS several times (see details in Table 3.1). Cell pellets harvested in 50 mL Sarstedt tubes were flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis.

Table 3.1. Cell harvesting method.

	Steps after sampling				
Centrifugation cycle #	1	2	3	4	5
Centrifugation time (min)	25	25	15	15	10
Centrifugation speed (rpm)	4000	4000	4000	4000	4000
mPBS volume to re-suspend (ml)	300	30	10	1	

3.4.3.2. RNA extraction and purification

RNA extraction was performed by Nathalie Joli (IBENS) with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. A second step of DNA digestion was performed after elution (DNase Invitrogen™ Kit TURBO DNA-free, USA). The RNA of at least 50×10^6 cells was extracted from each sample. RNA integrity was verified by migration of 18S and 28S ribosomal RNA by denaturing gel electrophoresis (agarose 1 %, Tris-EDTA-acetate buffer 1 X, ethidium bromide concentration $\sim 0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Finally, the amount and purity of RNA was assessed with a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA).

3.4.3.3. RNA sequencing

Library preparation and sequencing were performed by Fasteris (Geneva, Switzerland), producing on average 10 million reads per sample (HiSeq Illumina sequencing platform 4000 Paired-reads, 2x 150 bp). The library preparation was done using Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Prep.

3.4.3.4. Alignment, count normalization and differential expression analysis

Alignment and differential expression analysis were done by Ouardia Ait-Mohamed (IBENS). Alignment was done with the software package STAR (v. 2.5.3a; Dobin et al. 2013). Differential expression analysis was performed with the R package DESeq2 (v. 1.19.37; Love et al. 2014). The internal normalization method included in the package was tested first: (1) the natural logarithm of the counts of each gene in each sample was calculated (genes for which transcripts number before transformation is null for at least one sample are therefore automatically removed), (2) the transformed counts are averaged for each gene, (3) for each sample, the averages obtained in step (2) are deduced from the natural logarithm of the counts of each gene, (4) the median of the values obtained in step (3) is calculated for each sample and used to normalize their respective counts. This procedure limits the influence of highly or weakly expressed genes on normalization and considers the variation in sequencing depth from one sample to another, as well as the variation in the composition of the libraries constructed from different samples. Other normalization methods were tested using different sets of housekeeping genes. These groups of genes were defined on the basis of past transcriptomic analyses made on *F. cylindrus*, including the work of Mock et al. (2017). In the latter, *F. cylindrus* cultures were acclimated to optimal growth conditions before being submitted to six different conditions. However, these methods or sets of genes did not give conclusive results as none of them was adapted to the massive and global downregulation of the genome observed in darkness. 28S ribosomal genes were therefore used as housekeeping genes for the normalization. As doubts can be raised about the functioning of genes with transposable elements in their sequence, they were removed from the analysis. A gene was considered as differentially expressed if the absolute value of its log₂ fold change (binary logarithm of the ratio between the number of transcripts of a gene at a given time and at a reference time; L2FC) was higher or equal to 1 (equivalent to “expressed twice as much or less compared to the reference time”) and if the adjusted p-value was lower than 0.05. Here, the goal was to understand how some important pathways involved in

carbon metabolism would evolve during a prolonged period of darkness. The first RNA sampling time performed on cultures at T0 (0 h) was used as a reference time for differential expression analysis.

3.4.3.5. Identification of genes of interest

The nuclear genome of *F. cylindrus* published by Mock et al. (2017) is 61.1 megabases long. It is composed of 27 137 predicted protein encoding genes in the "Filtered Models1". Gene IDs as well as automatic and partial manual annotations can be found in the JGI database at the following address:

"<https://phycocosm.jgi.doe.gov/Fracy1/Fracy1.home.html>". In this diploid genome, a total of 6071 allelic couples were characterized as highly divergent (Mock et al. 2017). According to this previous study, alleles can be largely differentially expressed during stress periods and especially during darkness (seven days of darkness in Mock et al. 2017). This plasticity would allow *F. cylindrus* to cope with rapid and strong environmental changes, typical of polar zones. For this reason, all divergent alleles were considered separately.

Carbon metabolism has not yet been fully resolved in diatoms. In the current study, considering the genes involved in the synthesis and degradation of carbohydrates, lipids and amino acids, we benefited from a lot of previous work that included annotations of *F. cylindrus* genome (Aslam et al. 2018; Smith et al. 2012; Strauss 2012). On top of that, we could count on gene homologs identified in other diatoms such as *Phaeodactylum tricorutum* (Chauton et al. 2013; Pan et al. 2020) or *Cyclotella cryptica* (Traller et al. 2016). More specific studies were also made in order to identify genes less often studied in diatoms, such as autophagy related genes (ATG). In this case, identified sequences from diverse organisms could be used to identify candidate homologs in the *F. cylindrus* genome by BLASTp.

When signal peptides were examined, the Hectar tool (v. 1.3, Gschloessl et al. 2008) as well ASAFind (Gruber et al. 2015) in combination with SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004) were utilized. Mitochondrial target peptides were identified with the Mitoprot tool (Claros and Vincens 1996).

3.5. Results

3.5.1. Global overview

To assess the expression profile of protein encoding genes, the number of reads obtained by RNAseq was normalized with the 28S ribosomal gene as house keeping gene. Only genes meeting the two criteria of an L2FC greater than or equal to 1, and a p-value less than or equal to 0.05 were considered differentially expressed and were retained for analysis. Differential expression analysis retained 23 517 genes significantly differentially expressed (relative to T0) for at least one sample point compared to the T0 (cultures acclimated in continuous light). Over the whole experiment, two phases could be easily discerned (Fig. 3.2). During the first three days of darkness acclimation (DA), the majority of differentially expressed genes were upregulated: 7430 genes were overexpressed for at least one sample point, compared with 2006 genes that were underexpressed (284 at 6 h, 1339 at 24 h, and 1498 at 3 days) (Fig. 3.2). The second phase, extending from day 6 of DA to the end of the experiment, displays an opposite pattern, with a majority of genes highly underexpressed: 15485 ± 4272 (or 65.8 ± 18.2 %) genes on average at each sample point. An extremely low number of genes were overexpressed after the 6th day of DA (see Table 3.2). Only 155 of them were upregulated for at least three sampling times between day 6 and 3 months of darkness, and the expression of these genes was almost always increased during the first phase of DA. Among the rare genes systematically overexpressed during the second phase, a majority was characterized by short sequences less than 100 peptides in size. By BLASTp analysis, most of these sequences did not give any indication of the identity of these genes, and some did not resemble any other sequences listed in GenBank (data not shown).

Each of these two phases coincide with two distinct growth phases (Fig. 3.2). During the first one, a fraction of the cell population was still dividing (cell density increased by over 14 %), while in the second, the cells no longer divided (cell density remained stable) (see Chapter 1).

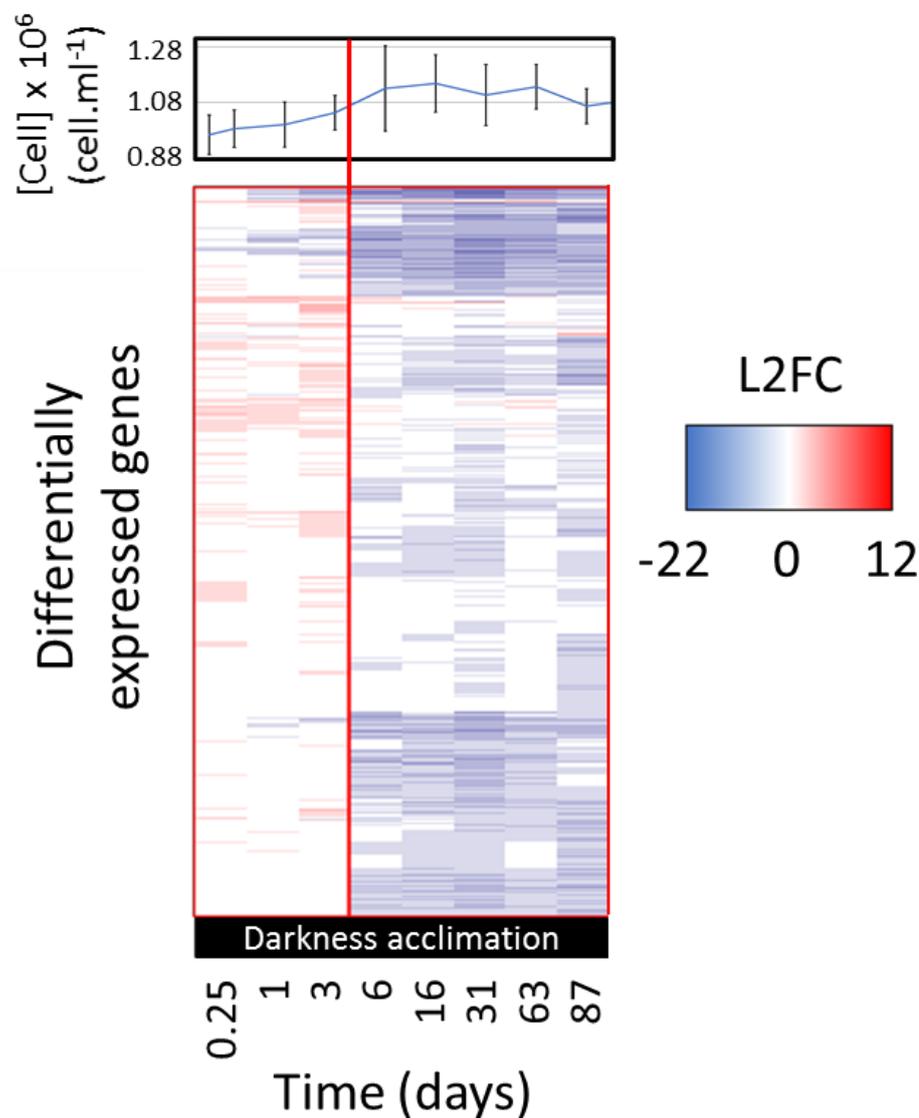


Figure 3.2. Differential expression (log₂ fold change = L2FC) relative to T0 of *F. cylindrus* genes during DA. Only genes with at least one differentially expressed allelic variant (i.e., |L2FC| ≥ 1 and adjusted p-value < 0.05) for at least one sample point are shown. Genes are organized along the abscissa according to the result of applying a clustering method (applied on R (v. 3.6.2) with the hclust function of the mclust package (v. 5.4.6; distance = Euclidean, method = ward.D) (Scrucca et al. 2016)). At the top of the figure, the average cell concentrations of the three technical replicates of the three cultures (n = 9) measured by flow cytometry from each sample point during darkness acclimation (DA) is shown. The vertical bars represent the standard deviation. The two areas outlined by red rectangles delineate two periods of the experiment characterized by distinct genome-wide expression patterns and growth phases.

Table 3.2. Number of genes overexpressed at given numbers of sampling points between day 6 to 3 months (example: among all genes retained by the analysis, 23 genes were overexpressed at all five sampling points).

Number of overexpressed genes at:	Number of sampling points
462	1
108	2
77	3
55	4
23	5

3.5.1. First three days of darkness

JGI ids, functions of encoded proteins, and RNAeq differential expression data are (unless otherwise mentioned), for all genes/pathways presented in this section, available in the Appendix B of the thesis.

3.5.1.1. Carbohydrates

Several β -glucosidases, and exo-1,3-beta-gucanase, involved in chrysolaminarin breakdown into glucose, as well as many genes catalyzing reversible and non-reversible steps of glycolysis were overexpressed during the first three days of darkness (Table S3.1). This was also the case for the gene encoding pyruvate carboxylase, the enzyme that allows the entrance of the pyruvate produced by glycolysis into the TCA cycle (Table S3.2). Numerous steps in the pentose phosphate pathway (PPP), including genes encoding glucose-6-phosphate-dehydrogenase and one 6-phosphogluconate dehydrogenase, both of which produce NADPH, were also overexpressed (Table S3.3). Despite having been identified in the *P. tricornutum* genome (Smith et al. 2012; JGI Id: 36257), no phosphoketolase was found in the *F. cylindrus* genome. Results of BLASTp analyses on GenBank showed that *P. tricornutum* is currently the only diatom species that possesses a gene encoding a phosphoketolase and, suggest that the gene is of bacterial origin. The only enzyme that is specific to the ED, the 2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase (KDPG aldolase), had one allele upregulated, but only on day 3 of DA (Table S3.4).

The relative expression of genes encoding irreversible steps of gluconeogenesis was also increased (Table S3.1). This was especially the case for the gene encoding phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase that initiates the *de novo* synthesis of glucose. However, the steps assembling the glucose moiety to synthesize chrysolaminarin did not follow the same pattern, being mostly stable in expression. On the other hand, genes encoding some components of EPS metabolism, which allows the synthesis of nucleotides sugars destined to be assembled into polysaccharides were upregulated (Table S3.5). Note that the chrysolaminarin synthesis pathway in diatoms still needs some confirmation but has been mostly elucidated (see current knowledges in Huang et al. 2018, 2016; Obata et al. 2013).

3.5.1.2. Lipids

The expression of most genes belonging to important routes related to lipid metabolism was not significantly altered during dark acclimation (Table S3.6 to Table S3.12). This includes genes encoding components of lipolysis pathways (removing acyl groups from the glycerol of TAGs), genes allowing the entrance of glycerol into carbohydrate metabolism, genes belonging to the mitochondrial and plastid pyruvate dehydrogenase complex (PDC) and to FASII (fatty acids synthesis), and citrate synthase that allows the entrance of acetyl-CoA into the TCA cycle. β -oxidation (breakdown of acyl-chain into acetyl-CoA), as well as the prokaryotic and eukaryotic pathways (synthesis of glycerolipids in chloroplast and endoplasmic reticulum, respectively) followed the same trend except for some genes that showed signs of upregulation. In the eukaryotic pathway, this mostly concerns different steps for the synthesis of TAGs (Table S3.9). This first includes the formation of diacylglycerol (DAG) or cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-DAG) from glycerol-3-phosphate before their conversion to TAG by acyl-CoA:DAG acyltransferases and an O-acyltransferase, respectively. It also includes the transfer of an acyl group from a phosphatidylcholine (PC) to a DAG by a phospholipid:DAG acyltransferase. In the prokaryotic route, genes involved in the final steps of digalactosyldiacylglycerol (DGDG) and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) were overexpressed (Table S3.8). Note that the relative expression of the ATP-citrate synthase, that also produces acetyl-CoA (and oxaloacetate) from citrate, was also markedly increased (Table 3.6).

3.5.1.3. Amino acids

Genes encoding components of pathways for synthesis of proteinogenic amino acids were globally not differentially expressed (data not shown). The same was the case for genes encoding the enzymes involved in their degradation. However, a majority of known steps of degradation routes of phenylalanine/tyrosine (that share the same degradation route) and BCAA were markedly upregulated (Table S3.13 and Fig. 3.3). This was also observed for some reactions belonging to other amino acid degradation pathways, albeit to a lesser extent (Table S3.14 to Table S3.22). These reactions include (but are not limited to) the deamination of alanine into glutamate and pyruvate, the deamination of aspartate into glutamate and oxaloacetate (an intermediate of the TCA cycle), the degradation of cysteine into pyruvate (that also produces glutamate) and alanine, the degradation of glutamine into glutamate followed by the conversion of the latter to 2-oxoglutarate (intermediate of the TCA cycle) as well as enzymes from the γ -aminobutyric acid shunt (GABA shunt), the conversion of arginine into proline and proline into glutamate, the degradation of methionine to 2-oxobutanoate (which can enter the BCAA catabolic pathway), and the conversion of serine into pyruvate, 2-phosphoglycerate (intermediate of glycolysis) or alanine.

3.5.1.4. Autophagy

The expression of about half of the genes identified as ATG candidates was not significantly affected during the first phase of DA, while most of the remaining genes were overexpressed (Table S3.23).

3.5.2. Second phase of DA: day 6 to 3 months

During the remaining time of the experiment, expression patterns changed drastically, with most genes being strongly downregulated relatively to the pre-darkness conditions.

3.5.2.1. Carbohydrates

From the 6th day of darkness, carbohydrate metabolism was globally negatively regulated. However, some genes involved in chrysolaminarin degradation, some genes of the PPP and of glycolysis, as well as a pyruvate carboxylase, were not downregulated, or only after more than one month of darkness (Table 3.3). Based on analysis of the presence and nature of signal peptides in the sequence of the selected glycolytic genes (see Figure 5

and Table S.1 of Smith et al. 2012), we can see that the set of glycolytic enzymes mentioned above, capable of performing complete glycolysis, is almost exclusively cytosolic. One of the glucokinase genes (id: 192661/216651), which was not listed by Smith et al. (2012), is probably also cytosolic according to our analysis. Only enolases and pyruvate kinase, which act successively at the end of the pathway, are cytosolic (no enolases appear to be targeted to the cytosol in the *F. cylindrus* genome). One hexokinase, more specifically a glucokinase, stands out as being one of the only genes overexpressed up to the end of the second month of darkness.

Table 3.3. Expression patterns of genes involved in chrysolaminarin degradation, glycolysis and PPP which were not downregulated immediately after the third day of darkness. In the JGI id and L2FC columns, thicker horizontal dark lines separate distinct genes while thinner lines separate two allelic variants of the same gene. Colors were assigned based on the corresponding L2FC (warm colors for overexpressed genes, cool colors for underexpressed genes, and white for genes that were not differentially expressed).

Pathway	Enzyme	JGI id	L2FC							
Chrysolaminarin degradation	Exo-1,3-beta glucanase	207213	3.9	3.19	2.52	0	0	0	0	-1.97
		210338	3.68	2.89	2.22	0	0	0	0	-2.62
		206507	0	3.07	5.12	0	0	-2.39	0	-2.3
		215534	0	0	3.38	0	0	-2.16	0	-2.37
	β-glucosidase	182486	0	0	0	0	0	0	0	0
		257905	4.08	3.16	0	0	0	-2.17	0	0
Glycolyse / PPP	Hexokinase	216851	5.48	5.3	4.16	3.33	0	2.12	3.27	0
		192661	5.43	5.41	4.21	3.32	0	2.13	3.21	0
		160331	4.22	3.46	0	0	0	-5.41	-4.21	0
		266757	4.74	4.54	0	0	0	0	0	0
Glycolyse	Glucose-6-phosphate isomerase	255097	0	0	0	0	0	0	0	-2.6
		157591	0	0	0	0	0	0	0	-2.58
	Fructose biphosphate aldolase	191311	3.76	6.33	4.8	5.64	3.79	0	0	0
		199285	4.24	4.86	2.44	2.02	0	0	-3.27	-4.03
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	209715	0	2.8	3.53	0	0	-1.94	0	-3.02
		266589	0	0	2.9	0	0	-2.46	0	-3.3
	Phosphoglycerate kinase	208673	3.79	2.91	2.03	0	0	0	0	-1.62
		278505	3.11	2.35	0	0	0	0	0	-4.5
	Phosphoglycerate mutase	161031	2.59	0	0	0	0	0	0	-2.91
		161037	2.98	2.77	0	0	0	0	0	0
	Enolase	168155	0	0	2.34	0	0	-3.72	-3.82	-4.09
		210137	0	0	2.38	-2.2	0	-4.23	-4.34	-4.48
	Pyruvate kinase	206568	2.88	2.29	0	0	-2.61	-2.54	0	-4.69
	PPP	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	207660	3.44	2.85	0	0	0	-2.76	-3.8
179718			0	2.84	3.37	0	0	0	0	-2.89
Possible 6-phosphogluconolactonase		271518	0	0	0	0	0	-3.32	-3.56	-4.56
		220076	0	0	0	0	0	0	-2.43	-2.51
		259433	3.22	0	0	0	0	-2.19	0	-3.23
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating		211512	3.44	3.3	2.11	0	0	-2.85	-6.1	-6.39
		263753	3.71	3.67	2.06	0	0	-2.92	-5.42	-5.89
Ribulose-5-phosphate-3-epimerase		254523	4.99	4.8	3.6	3.05	0	0	2.58	0
		259733	0	0	0	-4.89	-4.67	-5.43	-5.62	-6.46
Ribulose-5-phosphate isomerase		273154	0	0	0	-5.59	-4.24	-5.56	-5.86	-5.43
		207790	2.52	0	0	-3.01	-2.3	-4.28	-4.01	-4.95
Transketolase		272607	2.76	0	0	-3.44	-3.14	-4.89	-5.01	-4.72
		259678	0	0	0	-6.41	-4.49	-6.96	-6.55	-6.8
		279206	0	0	0	-6.27	-4.48	-7.01	-6.61	-6.54
Transaldolase	206407	0	0	0	0	0	-3.98	-4.54	-4.91	
	213583	0	0	0	0	0	-4.2	-5.36	-6.43	
	207931	0	0	0	0	-2.5	-4.52	-5.35	-7.14	
Pyruvate entrance into the TCA	Pyruvate carboxylase	189824	4.59	2.83	2.41	0	0	-1.78	0	-3.14
		182998	4.4	2.48	2.15	0	-2.41	-2.21	0	-3.07
	Time (days)		0.3	1	3	6	16	31	63	87

3.5.2.2. Lipids

Genes encoding the two PDCs, the acetyl-CoA synthetases and FASII were strongly downregulated after the third day of DA (Table 3.6 and Table S3.7). The same was found for genes encoding the prokaryotic pathway except that the expression of some DGDG and SQDG synthase encoding genes was not significantly affected compared to reference conditions, or decreased only later (Table S3.8). The same was the case for other genes of the eukaryotic pathway (Table S3.9). The gene encoding glycerol-3-phosphate O-acyltransferase, which synthesizes lysophosphatidate, was upregulated during the whole DA, whereas genes involved in TAG synthesis as well as an ATP citrate synthase, that were overexpressed early during DA, tended not to be differentially expressed.

All the genes identified as encoding TAG/DAG lipases or monoacylglycerol lipases were downregulated after the third or sixth day of DA (Table S3.10). Of all the other genes annotated as "lipase", "phospholipase" or "lysophospholipase", none was distinguished by a particular pattern that might suggest relative high activity (data not shown). The regulation of β -oxidation genes was heterogeneous, with some genes almost never being down-regulated, while others were downregulated more or less rapidly (Table S3.10). Some glycerol kinases that transform glycerol-3-phosphate for glycerolipid synthesis were not downregulated during most of the second phase of DA (Table S3.11). However, the gene encoding glycerol-3-phosphatase, which allows glycerol 3-phosphate to enter glycolysis in the form of dihydroxyacetone phosphate was strongly downregulated.

3.5.2.3. *Amino acids*

Some of the genes involved in the degradation of amino acids mentioned above and that were upregulated during the first three days (catabolism of alanine, aspartate, cysteine, and serine) remained mostly non-differentially expressed, while the others were downregulated during the rest of the darkness acclimation period. Tyrosine and phenylalanine, as well as BCAA pathway genes, were characterized by a unique pattern of expression as they were the only pathways showing strong upregulation patterns during the whole period.

Phenylalanine and tyrosine – Genes encoding the two enzymes catalyzing the first steps of the phenylalanine/tyrosine pathway that convert phenylalanine to tyrosine and 3-(4-hydroxyphenyl)pyruvate were strongly upregulated (Table S3.13). The same was found for dihydropteridine reductase and the pterin-4- α -carbinolamine dehydratase, which

allow the production of tetrahydrobiopterin, an essential cofactor in plants of phenylalanine hydroxylase (Shiman 1994), and the regeneration of dihydropteridine, respectively. The third step of the known route in mammals was however not found to be differentially expressed or was underexpressed. Genes encoding the enzymes ensuring the rest of the pathway have been identified in *P. tricornutum* (Pan et al. 2020) but homologs are not present in the *F. cylindrus* genome.

BCAA - Of the four deaminases that initiate the degradation of the three BCAAs, the only one that was upregulated during the first phase of DA, was also the only one not to be downregulated thereafter (reaction 1) (Figure 3.3). The 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase complex (BCKDH complex, branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex) is composed of four units that mediate the irreversible conversion of BCAA-derived α -keto acids to acyl-CoA, the second step in BCAA degradation (reaction 2). The alpha subunit of E₁ and E₂ (two of the three subunits of BCKDH complex) were highly overexpressed throughout the period of DA. The gene encoding the beta subunit of E₂ was not included in the differential expression analysis because its sequence included a transposable element. Finally, E₃ displayed a different pattern as it was underexpressed. The two acyl-CoA dehydrogenases, responsible for the third step of BCAA degradation (reactions 3 and 5), were highly overexpressed during the whole DA. And although Pan et al. (2020) managed to identify every step of leucine degradation encoded in the *P. tricornutum* genome, the only enzyme involved in the further degradation of this BCAA that we were able to identify in *F. cylindrus* is an acyl-CoA acetyltransferase. It could intervene at the end of the pathway by converting acetoacetyl-CoA into acetyl-CoA (reaction 4). It was sometimes overexpressed, or was otherwise not differentially expressed. Reactions involved in the termination of valine and isoleucine presented a range of expression patterns (reaction 5-12), but almost every step was characterized by at least one gene that was not downregulated.

3.5.2.4. Autophagy

Of the ATG genes, only the ATG101 gene had one allele that was upregulated during DA. Besides that, approximately half the other genes were only downregulated at three months of DA (Table S3.23).

Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
Enzyme	#	JGI id	L2FC							
BCAA amino transferase	1	259813	0	0	0	-5	-3.6	-5.7	-5	-5
		275677	0	0	0	0	0	0	0	0
		214478	4.27	3.56	2.83	0	0	0	2.22	0
		229511	-2.6	-2.5	0	-6	-5.9	-8.1	-7.9	-6.3
		246460	0	0	0	-4.2	-5.3	-6.8	-5.9	-4.8
		137080	0	0	-3.4	-5.7	-5.4	-5.7	-4.4	-4.2
		247568	0	-5.7	-5.2	-8	-5.7	-7.6	-6.9	-4
2-oxoisovalerate dehydrogenase (E1)	Subunit α	186364	7.12	6.29	7.31	4.66	2.52	3.68	5.34	2.02
		203743	5.98	5.12	6.23	3.5	0	2.77	4.47	0
	Subunit β	208648	0	0	0	0	0	0	0	0
		177511	0	0	0	0	0	0	0	0
Lipoamide acyltransferase (E2)	2	178096	7.07	5.37	5.29	4.15	0	3.04	4.86	2
		255999	5.51	3.7	4.58	2.85	0	0	3.24	0
Dihydropyridyl dehydrogenase (E3)	2	271375	0	0	0	-2.2	-3.2	-3.2	-2.7	-3.9
		223069	0	0	0	0	0	0	0	0
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	3	278364	5.54	4.17	3.14	3.22	0	2.71	3.91	0
		268657	6.13	5.13	4.01	3.86	2.56	3.75	4.75	1.98
Acyl-CoA acyltransferase	4	274265	2.99	0	0	0	0	1.77	2.37	0
		268162	0	0	0	-3.3	-5.3	-5.6	-3.8	-7.5
Acyl-CoA dehydrogenase	5	226606	4.97	4.35	4.63	3.59	2.63	3.65	5.66	4.34
Enoyl-CoA hydratase	6	183437	2.25	0	2.51	-3.1	-5.7	-5.2	-2.2	-4.4
		227122	2.4	0	0	-3.6	-5.7	-4.2	-1.9	-4.3
		202663	2.59	0	0	0	-2.6	-2.4	0	-4.5
		207194	0	0	2.65	0	0	0	0	0
		210327	0	0	0	0	0	0	0	-2
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	7	223467	0	0	0	-3.4	-2.8	-5.4	-5.1	-5.6
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	8	270026	4.02	3.04	2.52	0	0	0	1.89	0
		271968	4.57	3.64	2.75	0	0	0	2.11	0
Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	9	276895	3.84	2.42	3.08	0	0	0	2.78	0
		215322	4.08	2.9	3.96	1.94	0	0	2.79	0
3-oxoacyl CoA thiolase	10	213989	0	0	0	-3.6	-6	-5.7	-4.1	-6.9
		207731	0	0	0	-4	-6.3	-6.3	-4.4	-7.7
		207546	0	0	0	-2.4	-2.5	-2.7	0	-4.1
Propionyl-CoA carboxylase	11	136622	4.05	2.73	3.19	0	0	0	2.92	0
		211410	3	2.41	3.63	0	0	0	0	0
		167310	3.34	2.5	3.48	0	0	0	2.23	0
Methylmalonyl-CoA mutase	12	273786	4.1	2.84	2.39	0	0	0	2.55	0
		279011	3.96	2.71	2.13	0	0	0	2.42	0
Succinyl-CoA ligase	13	276978	2.19	0	2.25	0	0	0	0	-2.7
		278922	0	0	2.71	0	-3.7	-2.9	0	-4.7
		269015	0	0	0	-2.2	-2.7	-4.2	-3.7	-5.3
		226444	0	0	0	-2.5	-3.5	-5	-5.6	-5.5
Acyl-CoA dehydrogenase	14	230976	0	0	0	0	0	-2.4	-2.5	-2
		223695	0	0	0	0	-2.4	-3.2	-2.8	-4.9
		209571	0	0	2.27	-2.4	-4.4	-3.4	0	-3.4
Acyl-CoA oxidase	14	208181	4.45	3.08	0	0	0	-3.9	-4.3	-5.2
		212829	2.6	0	0	-3	-3.6	-3.8	-2.5	-3.5

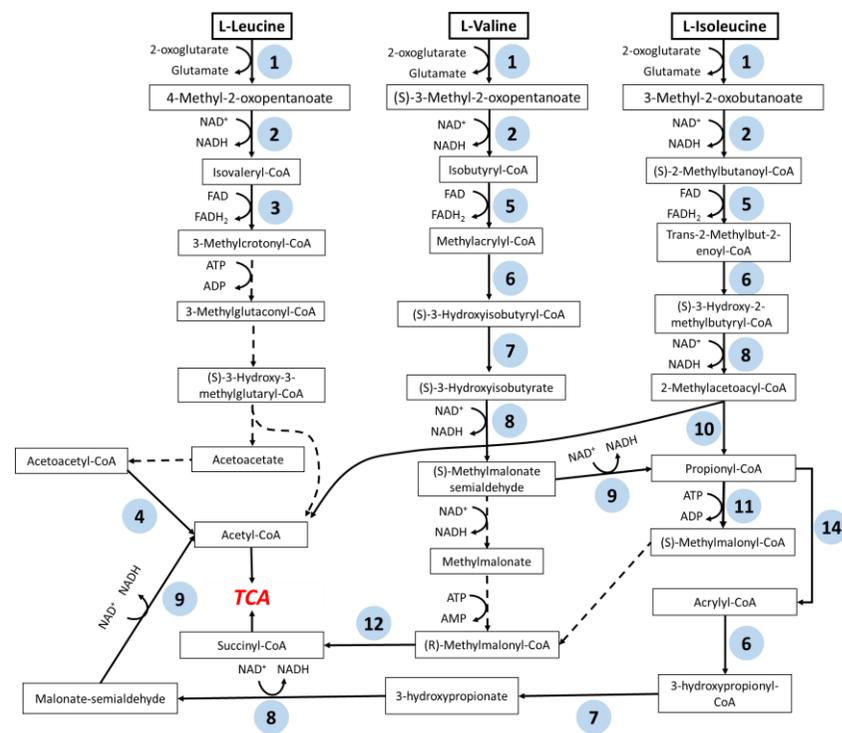


Figure 3.3. Regulation of BCAA catabolism. Numbers in circles refer to enzymes listed in the table. Dashed arrows represent steps encoded genes that we were not able to identify in *F. cylindrus* genome. Colors were assigned based on the corresponding L2FC (warm colors for overexpressed genes, cool colors for underexpressed genes, and white for genes that were not differentially expressed).

3.6. Discussion

Our work presents the first transcriptomes from a polar diatom exposed to a period of several months of darkness. The approach was chosen in an attempt to increase our knowledge of carbon pool management by *F. cylindrus* exposed to light conditions mimicking those of the polar night. As mentioned earlier, Kennedy et al. published a study in 2019 similar to ours. In it, they presented the results of physiological and proteomic analyses they had performed on a strain of *F. cylindrus* maintained in the dark for 4 months. They were (among others) also interested in the metabolic pathways involved in the consumption of carbon reserves. Their proteomic results have shown the importance of pathways involved in the consumption of sugars, lipids and proteins in dark survival. Their work, the first to incorporate proteomic data into the study of diatom survival during a DA of several months, thus represents an important source of information for the direction of present and future work. However, the use of the proteomics results of Kennedy et al. (2019) to interpret the results of the present study should be considered with caution.

After acclimating a strain of *F. cylindrus* in a day-night cycle (12-12), Kennedy and colleagues (2019) not only placed some of their cultures in darkness, but also subjected some of them to a continuous light regime. *F. cylindrus* was grown in batch (Erlenmeyer flask) culture. There is no mention of dilution or renewal of the culture medium during the 4-month experiment. The cell concentration in cultures continuously exposed to light never really seemed to increase during the experiment (see Fig. 1(a) of Kennedy et al. 2019). At some point, therefore, the cultures were likely limited by one or more nutrients. In the method section, Kennedy et al. appropriately describe the approach they chose to analyze their proteomics results. It states:

... mean LFQ values (dark vs light) were compared using a moderated t-test. Protein abundance changes are expressed throughout on a log₂ scale, where positive values represent increased abundance in dark-induced cells, and negative values indicate reduced abundance. Proteins with an FDR of less than 2% and mean log₂ LFQ differences $>/<0.5$ (~1.5-fold on the linear scale) were considered significant.

This passage suggests that the authors, instead of comparing protein abundance in dark-acclimated cultures to those from T0 (i.e., algae grown in a 12-12 day-night cycle), as we did for our transcriptomic data, compared, for each sample point, the DA results to those

obtained in continuous light. Thus, it appears that Kennedy et al. (2019) did not actually study proteome evolution during DA, but rather compared the proteome of algae maintained in the dark to that of algae maintained in the light and whose growth was limited by an unknown element.

3.6.1. Overview of the results of the differential expression analysis

Observation of the differential expression data (Fig. 3.2) allowed us to determine that two phases could be discerned and be associated with two growth phases.

3.6.1.1. Completion and arrest of the cell cycle

The first phase extended from the passage of the cultures to darkness to the third day of DA (included). This first phase corresponded to the period during which the majority of cells stopped growing, while those in the middle of a cell cycle at the beginning of DA finished dividing.

During this period, a majority of genes were not differentially expressed, some were overexpressed, and a few were downregulated. It can be assumed that the maintenance or intensification of a part of the transcriptomic activity, compared to T0, was due to cells completing their division. However, changes observed were also the result of mechanisms involved in acclimation of *F. cylindrus* to darkness in other cells that, based on the amplitude of the increase of concentration observed, represented a majority of the culture. The only way to distinguish and study separately the transcriptional activity of the two groups of cells would be to perform transcriptomic analyses at the single-cell level in order to determine the transcriptional output of dividing cells from those that are not dividing. Unfortunately, in our case it is impossible to distinguish the influence on the data of cells that acclimatize to darkness from those that continued to divide. Our ability to interpret this part of the results is therefore limited regarding acclimation processes to darkness.

3.6.1.2. Dormancy

The second phase extended from day 6 of DA to the end of the experiment, at 3 months. During this period, the cell concentration remained stable, and a very large number of genes were downregulated, suggesting that the cells were in a dormant state. An extremely small number of genes were overexpressed. When they were, these same genes were almost systematically overexpressed also during the first three days of DA. Thus, we did not identify any genes that might be specifically related to long-term dark survival.

3.6.2. Carbohydrates

During the first phase of DA, chrysolaminarin served as a source of energy, of acetyl-CoA and pyruvate for the cells. The energy was probably (at least) partly generated by the cells that had to complete an ongoing cell cycle. Indeed, even if cell division does not seem to require a very large amount of energy (Kang et al. 2020), some is still required. We cannot determine if it also was significantly involved in processes allowing the establishment of dormancy in other cells. The PPP was globally overexpressed during this time. The ATP yield of this alternative route for glucose degradation is lower than that of glycolysis but produces NADPH necessary (along with acetyl-CoA) for the production of fatty acids (FA), as well as ribulose-5-phosphate necessary for the production of nucleotides. These products are essential to produce new cells and probably reflect the need for some cells to finish a mitotic cycle started before DA. The production of NADPH was all the more necessary to dividing cells because its light-induced production was not operational. The ED, as for it, does not seem to be implicated in darkness survival.

Genes encoding the enzymes involved in the assembly of glucose units into chrysolaminarin were not differentially expressed. Since under exponential / non limiting conditions of growth, diatoms do not store chrysolaminarin in a significant way (Caballero et al. 2016; Remmers et al. 2018), this probably means that *F. cylindrus* did not synthesize significant amounts of chrysolaminarin during this phase. Gluconeogenesis, however, appeared to be active. The higher overexpression of PEP carboxykinase compared to that of fructose-1,6-biphosphatase (also an irreversible step of the gluconeogenesis) may reflect the absence of glyceraldehyde-3-phosphate (G3P)

derived from the Calvin cycle. The glucose molecules produced, if not used for chrysolaminarin production, could be used to produce other sugars. In plants, some polysaccharides are involved in cell signaling (Rolland et al. 2002). Beyond that, we noted that part of the sugar nucleotides synthesis pathway was overexpressed. The resulting products were therefore possibly synthesized by dividing cells to form the organic matrix that is associated with the frustule.

During the second phase of DA, carbohydrate metabolism was globally and strongly downregulated. However, a number of genes involved in chrysolaminarin degradation into pyruvate were not or were downregulated later on during the dark phase. Because pyruvate carboxylase was only weakly downregulated or was not differentially expressed at all, as opposed to PDC that was strongly downregulated, the products of glycolysis and PPP may fuel the TCA cycle more than FASII during this period. The maintenance of the PPP activity past the third day of darkness could have allowed *F. cylindrus* to keep producing NADPH. This reducing power was not likely for FASII that was downregulated but could well allow the elongation of some existing FA before their incorporation into TAG, which synthesis routes were not down-regulated. Indeed, some elongases were strongly overexpressed during the DA (data not shown).

Among the genes mentioned above, one of them, a hexokinase, and more precisely a glucokinase, clearly stood out from the others, being strongly overexpressed throughout DA. The work of Kroth et al. (2008) as well as our research on available databases suggest that diatoms do not possess hexokinases other than bacterial-like glucokinases (Glc). This family of hexokinases can phosphorylate different types of hexoses but seems more specific for glucose in most prokaryotes (Cárdenas et al. 1998). In humans, in which they have been extensively studied, Glc is characterized by a low affinity for glucose. It catalyzes the limiting step of the pathway and is not regulated by feedback inhibition. As glucose sensors (Al-Hasani et al. 2003), Glc plays a key role in the regulation and metabolism of glucose in various organs (Gloyn et al. 2005; Storer and Cornish-Bowden 1976). In *Arabidopsis thaliana*, the hexokinase HXK1 also acts as a glucose sensor and regulates certain signaling pathways leading to the activation/repression of certain genes (Moore et al. 2003; Jang et al. 1997 ; Rolland et al. 2006). In *Synechocystis sp.* PCC6803 (as in *A. thaliana*), glucose can affect the regulation of genome expression (see Ryu et al. 2008 and related reference). But cyanobacterial Glc does not act as an endogenous

glucose sensor and cannot act as HXK1. Interestingly, however, Ryu et al (2008) noted that *Synechocystis* Glk could effectively replace HXK1 in a HXK1 mutant. They therefore suggest that the difference between the two organisms lies in the absence of the Glk signaling system proteins in the cyanobacterium (Ryu et al. 2008). In our case, we were unable to identify homologs of genes known to interact with HXK1 in the *F. cylindrus* genome. In diatoms, in addition to its primary function, the other possible roles of Glk remain little studied. In 1971, Hellebust showed that a strain of *Cyclotella cryptica*, a diatom capable of growing in the dark by heterotrophy, induced a glucose assimilation system when placed in the dark or subjected to low light intensities. The initiation of the heterotrophic potential was reflected by the elevated presence of Glk. Curiously, *C. cryptica* induced the transport system in less than 24 h, even when the culture medium was devoid of glucose. In 1982, Palmisano et al. showed that when placed at low light intensities, two strains of *F. cylindrus* drastically increased their heterotrophic potential (i.e., ability to take glucose from the culture medium and utilize it throughout mitochondrial respiration). This Glk, which expression pattern diverged from the rest of the glycolysis, could therefore possibly play a regulatory role or/and be involved in increasing the heterotrophic potential of *F. cylindrus* during DA. It would therefore be relevant in future work to generate a mutant strain of this gene in order to test its importance in the survival to DA, whether in the presence or absence of an exogenous glucose source.

3.6.3. Lipids

During the first three days of DA, PDC, FASII and both glycerolipid synthesis pathways were mostly unaffected, while the production of glycerol-3-phosphate from both dihydroxyacetone phosphate and glycerol necessary for the production of glycerolipids was upregulated. All these elements probably illustrate that dividing cells kept active the *de novo* synthesis of FA and structural lipids necessary to complete their division. ATP-citrate lyase was also strongly upregulated but it is not clear if acetyl-CoA resulting from its action in the cytosol can be used for *de novo* lipid synthesis in diatoms (Zulu et al. 2018).

After day 3 of DA, among steps allowing to reversibly convert DHAP to glycerol, only one glycerol kinase was not downregulated. Free glycerol resulting from potential lipid degradation was therefore most likely not sent to glycolysis but used by glycerolipid synthesis. While the latter was maintained and sometimes increased early in DA, data also suggest that some lipids were still synthesized thereafter. Indeed, TAGs were maybe still produced past three days of DA *via* the Kennedy pathway but also from transfer of FA from a PC to a DAG in the eukaryotic pathway. This last process is known to allow microalgae to recycle phospholipids in order to increase energy production under nutritive limitation (Mühlroth et al. 2017; Urzica et al. 2013). The SQDG and DGDG synthases were also not downregulated after the third day of DA. It has been shown in higher plants that during phosphate limitation, PC and phosphatidylglycerol (PG) can be replaced by DGDG (in different compartment of the cells) and SQDG (in thylakoid membranes), respectively (for review see Tjellström et al. 2008). Synthesis of DGDG could well result from the recycling of PC to produce TAG mentioned above. We however do not have any way to confirm that PG was degraded during DA. Another explanation to SQDG maintained synthesis in darkness could be its possible implication in stability of the thylakoid membranes, *b6f* cytochrome complex (Badhuri et al. 2019), and integrity maintain of ATPase (see Kennedy et al. 2019) and PSII (Minoda et al. 2021) like in other photosynthetic organisms, in prevision of re-illumination.

As the PDC and FASII were strongly downregulated after three days of DA, synthesis of glycerolipids was not likely supported by *de novo* FA synthesis. Instead, turnover of some lipids could provide the necessary acyl-CoA. Acyl groups can be transferred from a lipid to another by acyltransferases. Another possibility is the removal of FA from a lipid by lipases, but the differential expression analysis did not reveal any that were upregulated. Note that these enzymes are poorly characterized in diatom though.

Early in DA, lipolysis and β -oxidation were mostly not differentially expressed, and some showed signs of overexpression, suggesting that neutral lipids and potentially other lipids were degraded. Again, it is however impossible to figure out which cells benefited from it. Afterward, some genes of the β -oxidation were mostly not downregulated. Lipids were therefore maybe also used to produce energy or other molecules. However, as some enzymes are susceptible to intervene in other pathways, like BCAA degradation, that was upregulated during the whole DA, it is hard to determine whether or not this pathway had

a significant relative activity. Considering that diatoms probably do not have any interest in degrading important amounts of lipids under constant non-limiting light and stable growth conditions, we can hypothesize that the contribution of lipids degradation was not that significant after the first days of darkness. However, semi quantitative estimations of neutral lipids (TAG, DAG, MAG, free FA) based on flow cytometry counts of cells stained with BODIPY® 505/515 suggest that neutral lipids were degraded during the whole DA (see Chapter 1). To be confirmed, estimation of the important lipid classes size would be necessary.

Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase of the eukaryotic pathway stood out by being globally overexpressed throughout the entire DA. This enzyme produces lysophosphatidic acid (LPA), a lipid known to be involved in signaling in some organisms. It is more broadly known as the precursor of phosphatidic acid (PA), which has been attributed many more roles in cell signaling, including growth control (see Wang et al. 2006). The enzymes responsible for the conversion of LPA to PA were mostly not differentiated after day 3 of DA. Therefore, these steps could be involved in generating the substrates for the TAG synthesis discussed above but it is also possible that LPA or PA played a role in the management of the acclimation to long term darkness.

3.6.4. Amino acids

The synthesis of proteinogenic amino acids was mostly not significantly affected early in DA, illustrating again the need for dividing cells to synthesis new cell components. In parallel, catabolic pathways for at least ten amino acids were upregulated, probably helping to produce the energy needed by cells. Most of them (glutamine, aspartate, proline, arginine, BCAA, alanine, cysteine) produce glutamate as a final or intermediate product. After entering the TCA cycle, the latter are converted to 2-oxoglutarate or throughout the GABA shunt. Both were upregulated early in DA, and only downregulated after 1 month of darkness. A relative increased activity of the GABA shunt has already been observed in plants during dark-induced senescence. Different ideas have been proposed to explain the possible advantages that it could provide (i.e., to bypass some steps of the TCA cycle, coordination of N and C, see Caldana et al. 2011) but further studies are still necessary to conclude. The expression of the glutamate decarboxylase,

which produces GABA, was a bit different of the rest. Its overexpression was especially strong during the first days of darkness, and it was never downregulated in DA. The regulation of the production of GABA is known to be involved in a very diverse set of processes in plant, from regulation to communication, in both optimal and stress conditions of growth (see Fromm 2020, and references therein). On top of fueling the TCA cycle, an increased production of GABA could well be involved in DA in *F. cylindrus*.

After day 3 of DA, only the phenylalanine/tyrosine and BCAA degradation pathways showed sign of strong upregulation, suggesting that these amino acids were consumed during the whole DA. These five amino acids are the five most energetic of all proteinogenic amino acids (Hildebrandt et al. 2015). Unfortunately, we were not able to identify homologs responsible for the rest of the pathway in *F. cylindrus*, although it has been identified in *P. tricornutum* (Pan et al. 2020). Tyrosine can be used in plants as a precursor of essential metabolites including ubiquinones (electron transporters in respiratory chains) (Block et al. 2014) and vitamin E (an antioxidant involved in preventing lipid peroxidation, among other things) (Fryer 1992). However, none of the genes involved in these metabolic pathways were overexpressed during DA (data not shown). The sequence of tyrosine aminotransferase found in *F. cylindrus* is identical to that of TAT1, a gene belonging to *A. thaliana* in which it is essential for survival during dark carbon limitation (Wang et al. 2019). We cannot conclude with certainty whether tyrosine and phenylalanine recycling are involved in the metabolism maintenance during DA. Note however that the action of tyrosine transaminase does not only produce 4-hydroxyphenyl pyruvate (whose fate remains obscure) but also glutamate, which may very well participate in generating more energy.

One of the BCAA aminotransferases found in *F. cylindrus* was overexpressed early in DA and non-differentially expressed afterward. Some of these enzymes use different BCAA as substrates. They catalyze the first steps of BCAA degradation but also the last step of its synthesis. However, the strong upregulation of the BCKDH complex, which is irreversible and operates the second step of BCAA degradation, confirms that one or more BCAAs were degraded during DA. Apart from E₃, all components of this complex were also highly overexpressed. BCKDH complex is specific for BCAA degradation but the E₃ component, dihydrolipoyl dehydrogenase, is not specific for this complex since it is

involved in PDC and oxoglutarate dehydrogenase complex (involved in TCA cycle) as well as in GCS, three processes that are downregulated in our results. The fact that the expression pattern of E₃ differs from the rest of BCKDH complex is therefore not surprising.

The numerous enzymes involved in valine and isoleucine catabolism overexpressed during DA show that the energy and reducing power generated by the degradation of these two products were involved in maintaining the viability of *F. cylindrus* in darkness. Like for E₃, it is not surprising that some enzymes in these pathways are underexpressed during DA considering their involvement in other metabolic pathways like β -oxidation. With respect to leucine, the few enzymes identified limit the amount of information available. The fact that isovaleryl-CoA dehydrogenase was highly overexpressed throughout DA suggests that leucine was well degraded. However, several studies have shown that this enzyme, initially thought to be specific for leucine degradation, may actually be involved in the degradation of other products (including valine and lysine) (Araújo et al. 2010; Däschner et al. 2001).

Propanoyl-CoA, an intermediate in the catabolic pathway of valine and isoleucine, can be converted to succinyl-CoA in three steps. The second of these is catalyzed by a methylmalonyl-CoA epimerase which has not been identified in diatoms. Based on gene expression profiles generated by genome-wide metabolic models, Broddrick et al. (2019) proposed the Phatr3_J46728 gene as a candidate. However, an identical gene identified in *F. cylindrus* (id: 271197/278644) was not upregulated during darkness, as were the genes ensuring the first and third step (i.e., steps 11 and 12 in Fig. 3.3).

Overall, valine, isoleucine, and perhaps isoleucine catabolism may be more important during the first three days of darkness, while some cells were still dividing, as previously observed for CH and lipids. However, in contrast to the degradation pathways of these products, the RNAseq results suggest that the degradation of BCAAs remained relatively much more active under the reference experimental conditions, and that BCAA (and maybe tyrosine and phenylalanine) could be a major and indispensable source of energy for survival. This could be investigated by generating mutant lines of the BCKDH complex, and should be confirmed with biochemical analyses of protein and amino acids content and composition.

Degradation of amino acids from protein turnover driven by stress seems to be a widespread process across the tree of life. *A. thaliana* is for instance also known to use it when submitted to darkness-induced sugar starvation (Araújo et al. 2011). Also, in microalgae, it does not limit its action to darkness survival it has been recently shown that leucine, and, to a lesser extent valine and other amino acids, could be degraded in order to fuel the TCA cycle and feed TAG production during nitrogen depletion (Ge et al. 2014; Liang et al. 2019; Pan et al. 2017).

3.6.5. Missing steps/routes of amino acid degradation in *F. cylindrus*

Some routes proposed by Pan et al. (2020) for *P. tricornutum* amino acid catabolism are not presented in the main results. This first of these routes includes parts of biosynthetic pathways of the proline (synthesized from glutamate) and BCAAs (synthesized from 2-oxobutanoate). In theory, the degradation of glutamate and 2-oxobutanoate might not take the shortest route but, instead, involve their preliminary conversion to other amino acids. In general, we chose not to consider these pathways because they represent more time-consuming and expensive ways of degrading amino acids. Furthermore, the expression of genes involved in amino acid biosynthesis indicates that they were mostly downregulated during the second phase of DA (data not shown). Pan et al. (2020) also suggested that histidine, whose known degradation pathway in mammals is missing from plants and microalgae, could be converted to glutamate by a histidine transaminase in *P. tricornutum* (Phatr3_J38891). However, according to BLASTp results the gene proposed by Pan et al. (2020) actually encodes a histidinol phosphate aminotransferase. In 1995, Gu et al. reported that the histidinol phosphate aminotransferase purified from the anaerobic bacteria *Zymomonas mobilis* could deaminate histidine. However, the homologous gene in *F. cylindrus* was always down regulated from day 6 to the end of DA. Lysine catabolism has been solved in mammals but is still incomplete in plants (Hildebrandt et al. 2015), notably because plants are lacking an alpha-amino acid semialdehyde dehydrogenase that catalyzes the third step of the pathway. Pan et al. (2020) proposed a list of enzymes capable of degrading lysine in *P. tricornutum*. However, the two alpha-amino acid semialdehyde dehydrogenases (Phatr3_J28191, Phatr3_J31906), which are, according to this study, also part of BCAA catabolism, are more likely to be succinate semialdehyde dehydrogenase and a 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase

(also designated as 1-pyrolline-5-carboxylate dehydrogenase elsewhere in Pan et al. (2020) study), respectively. The former is involved in lysine degradation in some organisms (as a glutarate-semialdehyde dehydrogenase, Knorr et al. 2018), but we did not find any evidence that suggest that these enzymes could accomplish the third step of the known lysine catabolism. Other homologs of enzymes listed by Pan et al. (2020) were mostly downregulated during the second phase of DA. In mammals, tryptophan is degraded along the kynurenine pathway (Moroni 1999), but this route has not been found in plants or diatoms. Pan et al. (2020) found a tryptophanase encoded in the genome of *P. tricornutum* (Phatr3_J49505). This bacterial enzyme allows to directly convert tryptophan to pyruvate. However, like for the phosphoketolase, we did not find any closely related gene in *F. cylindrus* or any other diatom genomes registered on GenBank, suggesting that it was probably acquired from lateral gene transfer by *P. tricornutum*. Consequently, it appears likely that the majority of diatoms possess another unidentified way of degrading tryptophan. Finally, Pan et al. (2020) also identified a complete degradation pathway for tyrosine in *P. tricornutum*. However, we could not find any steps beyond the third one in *F. cylindrus* genome.

3.6.6. Autophagy

Autophagy is a conserved system in eukaryotic organisms. It acts through the construction of a double-membrane vesicle called an autophagosome around the material to be recycled to transport it to the vacuole where it is degraded by hydrolases. It was originally known to provide quality control of various cellular elements and, if necessary, to allow their recycling via lysosomal degradation. Since then, many other important roles could be attributed to it, including its involvement in cells energy management (see Singh and Cuervo 2012). In some organisms, a basal level of autophagy is always active, but autophagy has been studied mainly for its role in nutrient limitation. Autophagy notably allows photosynthetic organisms to recycle some of their proteins (see Barros et al. 2017) and structural lipids to support metabolism or fuel TAG production (Couso et al. 2018). In some organisms it also participates in the degradation of lipid droplets in which TAGs are stored (Fan et al. 2019; Kajikawa et al. 2019; see Kokabi et al. 2020 and related references). The occurrence of autophagy remains poorly studied in diatoms.

During the first three days of DA, some of the candidate ATG were upregulated while the rest were not differentially affected. Afterward, some of them remained unresponsive while an allele encoding ATG101 was overexpressed up to the end of DA. ATG101 has been identified in many eukaryotes (see Noda and Mizushima, 2016) in which it appears to play an indispensable role in performing basal and induced autophagy during periods of nutrient stress (Guo et al. 2019; Kajikawa et al. 2019; Liang et al. 2012; Suzuki et al. 2015). In mammals and plants, ATG101 is part of the ULK1/ATG1 complex on which it is bound to ATG13 to ensure the stability of the complex (Hosokawa 2009; Li et al. 2014). In mammals, it has been noted that it also protects ATG13 from proteolysis and is involved in the recruitment of other components of the autophagy machinery (Mercer et al. 2009; Suzuki et al. 2015).

The overexpression of only the ATG101 gene in our study is obviously not evidence that this process is part of the survival strategy of *F. cylindrus* to DA. However, such a result may be meaningful. The numerous studies that have investigated regulation of autophagy in different types of organisms have shown that it can act at both the epigenetic and post-translational levels through all intermediates (He and Klionsky 2009). This translates into the need, when estimating autophagic activity in an organism, to approach the problem at different levels at the risk of misinterpreting the data (Klionsky et al. 2021). In some cases, some of the autophagy machinery may be constitutively in place, but only activated during particular periods such as nutrient stress. Much of the process can therefore be regulated at the post-transcriptional and post-translational levels. This is the case, for example, for autophagy initiation, which is managed by the ATG1/ULK1 complex, whose regulation is in part by (de)phosphorylation of its proteins by the mTOR complex (see Lane et al. 2017). A significant increase in autophagic activity may therefore not be apparent at the transcriptional level. It can even sometimes be accompanied by downregulation of certain genes (see the study by Desgeorges et al. 2014 for example). In *F. cylindrus*, we can thus easily imagine that the activation of autophagy does not involve the overexpression of the majority of its genes, but that the punctual availability of ATG101, which is necessary for the stability of the initiation complex in humans, is part of its regulatory process. In the future, it will therefore be interesting to know whether or not autophagy is involved and essential to darkness survival, and which substrates are its major targets. To detect the possible occurrence of autophagy, many proven approaches could be used such as proteomics, generation of a mutant strain of ATG101,

autophagosome search by transcriptomic, or lipidation of ATG8 (covalent binding of ATG8 to a PE), which is essential for autophagosome expansion (Couso et al. 2018; Ichimura et al. 2000).

3.6.7. The role for autophagy in protein recycling

We speculated above that amino acids, and more specifically BCAAs, may be major sources of energy for darkness survival, not only for maintenance of metabolism during prolonged darkness, but also to compensate for the absence of light when cells completed their division. An element that remains to be elucidated is the provenance, as well as the mechanisms involved in the transportation and degradation of proteins. Ubiquitination and degradation under the action of proteases and hydrolases in the proteasome is one. We did not identify any genes encoding proteases or peptidases dedicated to protein degradation that showed signs of upregulation. Elements of the proteasome were all strongly downregulated after 3 days of DA (data not shown). Autophagy is another system allowing degradation of proteins, like those mentioned above.

In *A. thaliana*, autophagy activity increases at night (Izumi et al. 2013) and its action is indispensable for survival and cell energy homeostasis during diverse biotic and abiotic stresses (see Soto-Burgos and Bassham 2017, and references therein). Under dark conditions, ATG mutant lines show highly reduced release of free amino acids, highlighting the role of autophagy mediated vacuolar degradation of proteins (Hirota et al. 2018). As Hirota et al. (2018) mentioned, ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), that is very abundant in parts of C₃ plants (i.e., 50 % of all soluble leaf proteins; Evans 1989) and is composed of around 45 % by BCAA and aromatic amino acids (tyrosine, phenylalanine, and tryptophan), could be a major source for recycling. It has been shown that entire chloroplasts could be degraded by autophagy (i.e., chlorophagy, Izumi et al. 2017). In our case, this would be impossible because most pennate diatoms possess only one large chloroplast. Also, Rubisco only represents a few percent of the total protein content in phytoplankton (Losh et al. 2013). Instead, Rubisco-containing bodies (RCB) pathway (Ishida et al. 2008), that is very active in *A. thaliana* during sugar starvation (Ishida et al. 2010), may allow the transport of high value proteins from the chloroplast stroma to the vacuole (Ishida et al. 2008). Its possible occurrence in

F. cylindrus could be investigated with the method developed by Izumi et al. (2015). Finally, another possible source of protein could be the mitochondria, which have been observed to be degraded *via* autophagy in yeast and human cells (i.e., mitophagy, Youle and Narendra, 2011). For darkness survival in *F. cylindrus*, the preservation of mitochondria seems rather indispensable because different catabolic pathways as well as respiration take place there. However, the energetic demand of dormant cells being highly reduced could well allow such a mechanism to occur.

3.6.8. Influence of pre-darkness growth conditions

It should be kept in mind that in nature, the environmental conditions encountered by diatoms prior to polar night largely differ from the pre-acclimation conditions chosen here. This could significantly affect the initial relative size of the major intracellular carbon pools and, consequently, the strategy adopted by the cells as showed by the work of Palmisano and Sullivan (1982). Here, the choice was made to pre-acclimate the cultures to a constant light rather than a light-dark cycle in order to avoid a temporal superposition of the processes involved in acclimation to a dynamic light cycle and those involved in acclimation to total darkness at the beginning of DA. As a result, the cultures were not synchronized, and the first few days of DA were marked by the division of some cells that may have influenced the data obtained until the third day of DA.

One would expect acclimation to the absence of light to occur in two stages. First, the cells would acclimate to the absence of light itself, as for one night framed by two periods of illumination. After some time, an internal signal in the cell would intervene to cope with the abnormally long absence of light, to allow the cells to acclimate further and overcome a prolonged period of darkness. Because some cells were still dividing early in DA, this hypothesis cannot be verified in our data. Furthermore, this prohibited us from identifying potential genes that are specifically involved in prolonged darkness survival rather than short-term light deprivation. Further studies should consider to replicate more closely the light conditions that precede the polar night, although at present there is no comprehensive dataset describing light conditions under ice/water during onset of the polar night (Cohen et al. 2020).

3.7 Conclusion

This study is the first to make use of transcriptomic data to investigate survival of diatoms to a darkness periods of several months. This chapter focused on the principal metabolic pathways of carbon metabolism in *F. cylindrus*. It showed that probably all major carbon pools have a role in the maintenance of basal cellular metabolism, to varying degrees and at different times. Despite the likely absence of a significantly high amount of intracellular carbon storage (chrysolaminarin, TAG) after pre-acclimation to constant light, and despite the observation that cells did not transform to resting cells or spores nor had the opportunity to become heterotrophic (i.e., two alternative and non-exclusive strategies to the consumption of carbon reserves; see Walter et al. 2017, and references therein), more than 70% of the cells retained viability after 3 months of DA (see Chapter 1) by seemingly recycling and respiring primarily functional material (i.e., amino acids from protein breakdown) past the first weeks of darkness. In another DA of 6 months conducted with the exact same experimental conditions, *F. cylindrus* even managed to survive to around five months without light (see Chapter 1). Although this study brings some insights into the dynamics of carbon pool consumption, it should be kept in mind that transcriptional regulation is not the only mechanism that regulate the activity of the cell. It does not necessarily reflect the exact changes in protein abundance or enzymatic activity. Also, validating the results with an alternative method, like real time quantitative PCR, should be done in the future. Finally, biochemical analyses are required to estimate the relative importance of each pool relative to the cell survival needs.

We were able to identify genes of interest for future targeted mutation experiments (i.e., glucokinase, BCKDH complex genes, ATG101 for instance) to further our understanding of carbon metabolism in the dark. This also highlights the possible involvement of autophagy in the recycling of cellular products, which should be investigated in the future.

Chapitre 4 – Réponse des réservoirs de carbone de *Fragilariopsis cylindrus* à l’obscurité prolongée

4.1. Résumé

Lors de périodes de stress nutritifs, la consommation des réserves intracellulaires peut, chez certains organismes, pallier un déficit énergétique temporaire. La dégradation de ces réservoirs de molécules riches en carbone, majoritairement composés de lipides, carbohydrates et protéines, permet de générer l’énergie nécessaire au fonctionnement des cellules ainsi que les métabolites nécessaires aux voies de synthèse. Chez les diatomées, la consommation des réserves, accompagnée d’une réduction du métabolisme, est l’une des stratégies permettant de survivre à des périodes d’obscurité prolongées, par exemple durant la nuit polaire. Le but de cette étude était de mieux comprendre la dynamique de gestion des réservoirs de carbone chez *Fragilariopsis cylindrus* durant une période d’obscurité de deux mois. La taille et la composition des compartiments de molécules susceptibles d’alimenter le métabolisme à l’obscurité et de jouer un rôle important dans la survie ont été analysées. Ont également été suivis le taux de consommation d’oxygène des cultures de *F. cylindrus* à l’obscurité, et leur quota de carbone cellulaire. Le premier a permis d’observer la diminution drastique de l’activité cellulaire attendue à l’obscurité. Le second a permis de confirmer que *F. cylindrus* consommait effectivement une partie de ses réserves, et de déduire l’importance relative des réservoirs de carbone étudiés. Alors que les lipides et les carbohydrates de réserves ont été préférentiellement dégradés durant le premier mois d’obscurité, le contenu en protéines, d’abord resté intact, semble avoir servi d’ultime réserve une fois les deux autres stocks épuisés. Les données suggèrent également que le cholestérol sulfate et le desmostérol sulfate pourraient jouer un rôle dans l’acclimatation à l’obscurité.

Mots clefs : Obscurité prolongée, diatomée polaire, survie, réservoirs de carbone, respiration mitochondriale.

4.2. Abstract

During periods of nutrient stress, the consumption of intracellular reserves can, in some organisms, compensate for a temporary energy deficit. The degradation of these pools of carbon-rich molecules, mainly composed of lipids, carbohydrates and proteins, allows producing the energy necessary for the functioning of the cells as well as the metabolites for the synthesis pathways. In diatoms, the consumption of reserves, associated with a reduction of metabolism, is one of the strategies used to survive prolonged periods of darkness, for instance during the polar night. The aim of this study was to better understand the dynamics of carbon compartments in *Fragilariopsis cylindrus* during a two-month period in the dark. The size and composition of molecular compartments that may fuel dark metabolism and play an important role in survival were analyzed. The rate of oxygen consumption of the cultures in the dark and their cellular carbon quota were also monitored. The former allowed observing the drastic decrease of the cellular activity expected in the dark. The second allowed confirming that *F. cylindrus* indeed did consume part of its reserves, and to deduce the relative importance of the carbon pools studied. While lipid and carbohydrate reserves were preferentially degraded during the first month of darkness, the protein content, which first remained intact, seemingly served as a backup reserve after depletion of the other two stocks. The data also suggest that cholesterol sulfate and desmosterol sulfate may play a role in acclimation to darkness.

Key words: Prolonged darkness, polar diatoms, survival, carbon compartments, mitochondrial respiration.

4.3. Introduction

Le carbone constitue l'épine dorsale des biomolécules (i.e., molécules synthétisées par le vivant, aussi appelées molécules organiques). Au-delà de l'oxygène, qui entre dans la composition de l'eau, il est, en termes de masse, l'élément le plus abondant de la matière organique. En croissance exponentielle, la stœchiométrie du carbone, de l'azote et du phosphore chez les diatomées est proche de celle du ratio de Redfield (106:16:1) (Goldman et al. 1992 ; Redfield 1943).

Dans la phase claire de la photosynthèse, l'énergie radiative captée permet la formation d'ATP et de NADPH. L'ATP permet de stocker de l'énergie pour alimenter le travail cellulaire *via* l'hydrolyse de ses groupements phosphate. L'ATP est notamment nécessaire à la réalisation de nombreuses réactions chimiques et à la division cellulaire, ainsi qu'au transport actif de certaines molécules. Le NADPH est lui le principal transporteur d'électrons des cellules et alimente notamment les voies anaboliques (i.e., voies de synthèse) en pouvoir réducteur. L'ATP et le NADPH produits par la phase claire de la photosynthèse permettent d'alimenter la phase sombre (cycle de Calvin), dans laquelle le carbone inorganique est réduit, aboutissant à la production de glycéraldéhyde-3-phosphate. L'énergie captée par la photosynthèse est par ce biais stockée dans les liaisons chimiques formées entre les atomes de carbone. Le glycéraldéhyde-3-phosphate peut être converti en différents intermédiaires de synthèse nécessaires à la production des différents composants cellulaires, notamment les lipides, sucres (ou carbohydrates), protéines et pigments. Ces quatre familles de molécules composent chez les diatomées la majorité de la biomasse cellulaire, les protéines pouvant à elles seules représenter près (et parfois plus) de 50 % de la biomasse en période de croissance optimale (Bai et al. 2016 ; Breuer et al. 2012 ; Levitan et al. 2015 ; Remmers et al. 2018). Lorsque nécessaire, les molécules riches en carbone peuvent-être dégradées, complètement ou partiellement, *via* différentes voies cataboliques, et ce afin de récupérer l'ATP et le pouvoir réducteur (sous forme de NADH ou de FADH₂) et/ou les intermédiaires de synthèse qui pourront être réinvestis. La dégradation complète de la majorité des macromolécules aboutit à la synthèse d'intermédiaires du cycle de l'acide carboxylique (TCA). Le fonctionnement de ce dernier permet de produire de l'ATP, directement en alimentant la phosphorylation oxydative (i.e., respiration mitochondriale) avec du succinate, ou indirectement *via* la production de NADH et de FADH₂ qui peuvent eux-mêmes alimenter la chaîne de transport d'électrons mitochondriale.

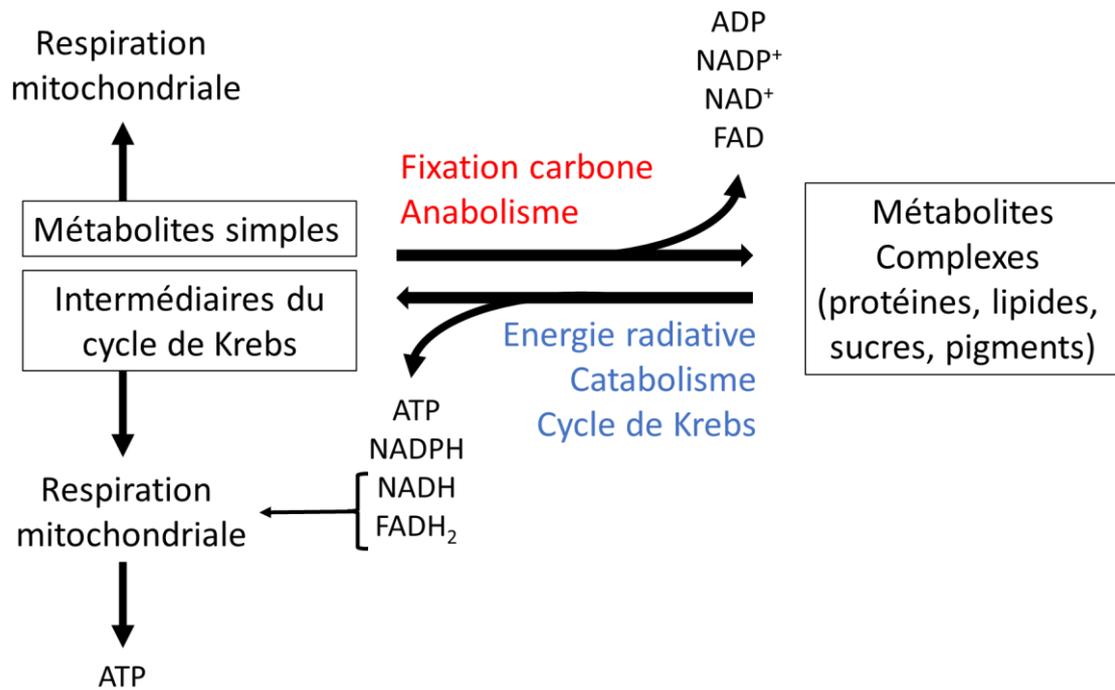


Figure 4.1. Représentation simplifiée du métabolisme cellulaire et des flux d'énergie associés (ATP et nucléotides jouant le rôle de co-enzyme dans les réactions d'oxydoréduction).

Chez les diatomées, la dégradation nocturne des carbohydrates accumulés le jour (et en particulier de la chrysolaminarine, carbohydrate de réserve chez les diatomées) participe au maintien du métabolisme cellulaire en générant de l'énergie, mais aussi en renouvellement le stock de métabolites simples nécessaires à la synthèse d'autres molécules plus complexes, comme les protéines (Cuhel et al. 1984 ; Granum et Myklestad 2001 ; Mirón et al. 2003). C'est également le cas des triglycérides (lipides de réserves) qui suivent une dynamique similaire au cours d'un cycle diurne (Boddrick et al. 2019 ; Gaidarenko et al. 2019 ; Jallet et al. 2016). De nombreuses études, ayant employé des approches très diverses (physiologiques, biologiques, biomoléculaires), ont permis d'illustrer la très grande flexibilité du métabolisme des diatomées face aux changements abiotiques qu'elles peuvent rencontrer. Lors de conditions de stress engendrant un déséquilibre entre les besoins de la cellule en énergie et en métabolites, et leur disponibilité, les dynamiques d'accumulation, de dégradation et de recyclage des réserves de carbone peuvent être significativement altérées (Jakob et al. 2017 ; Obata et al. 2013 ; Sayanova et al. 2017 ; Thangaraj et al. 2020 ; Tillman et al. 1989 ; Wagner et al. 2017). C'est notamment ce qu'il advient lors d'une période d'obscurité prolongée. Dans ces conditions, les réserves de molécules riches en carbone (chrysolaminarine et triglycérides, TAG), dont le rôle est de compenser ponctuellement un apport insuffisant en énergie ou

métabolites simples, peuvent être dégradées (Handa 1969 ; Morin et al. 2019 ; Schaub et al. 2017). C'est aussi parfois le cas pour une partie du réservoir protéique (Handa 1969 ; aussi suggéré par Kennedy et al. 2019). La diminution drastique de la taille des chloroplastes parfois observée chez les diatomées (Gibson et Fitzsimons 1990 ; Karsten et al. 2012 ; Schlie et al. 2011) suggère que certains lipides structuraux pourraient également être recyclés lors de périodes d'obscurité prolongée. Il a été montré à de rares occasions que certaines plantes supérieures pouvaient compléter leur apport en énergie en dégradant certains de leurs pigments photosynthétiques (Araújo et al. 2010). Aucune information de ce type n'a été obtenue chez des diatomées. Cependant, certains auteurs ont pu observer une augmentation de la chlorophylle lors de la formation de formes de résistances de diatomées soumises à des périodes d'obscurité prolongées (Gibson et Fitzsimons 1990). Il a été donc suggéré que la chlorophylle, riche en carbone mais aussi en azote, puisse aussi servir de compartiment de stockage alternatif chez les diatomées.

Lorsque les diatomées soumises à une période d'obscurité n'ont pas la possibilité de faire de l'hétérotrophie, le maintien du métabolisme doit être entièrement soutenu par les réserves constituées avant la période d'obscurité. Pour augmenter leur temps de survie, les diatomées se placent dans un état de dormance caractérisé par un arrêt de leur croissance (Kamp et al. 2011 ; Kennedy et al. 2019 ; Morin et al. 2019 ; see also Chapter 1 of this thesis), une interruption de certaines fonctions non essentielles à la survie comme la photosynthèse (Kennedy et al. 2019 ; Lacour et al. 2019 ; Morin et al. 2019), et une réduction importante de l'activité cellulaire (Anderson 1976 ; Kennedy et al. 2019 ; aussi suggérée par les données de SYBR Green (Chapitre 1) et les données de transcriptomique (Chapitre 3)).

De nombreuses études ont déjà mis en lumière la dégradation de certains compartiments cellulaires riches en carbone lors de périodes d'obscurité prolongées (Gibson et Fitzsimons 1990 ; Handa 1969 ; Morin et al. 2019 ; Peters 1996 ; Peters and Thomas 1996 ; Schaub et al. 2017 ; Sciandra et al. 2022 ; Walter 2017). Cependant, notre connaissance de la dynamique (i.e., temps, vitesse) de consommation des réserves reste limitée. Le but de l'étude exposée dans ce chapitre était d'étudier la variation de la taille et de la composition des réservoirs de carbone susceptibles de participer au maintien du métabolisme d'une diatomée polaire soumise à une période d'obscurité prolongée, ou au

remaniement de leur contenu (exemple, conversion de lipides structurels non essentiels à la survie en TAG). Pour cela, une souche de *Fragilariopsis cylindrus* a été placée à l'obscurité durant deux mois (54 jours) dans des conditions identiques à celles des précédentes expériences. Les teneurs cellulaires en carbone total, protéines, classes principales de lipides et lipides neutres, carbohydrates et chrysolaminarine, ainsi que celles des différents pigments caractéristiques des diatomées, ont été mesurées. Le taux de respiration cellulaire (i.e., consommation d'oxygène) a également été mesuré pour suivre l'activité métabolique de *F. cylindrus*. L'implication de chacun des compartiments dans la survie cellulaire a été évaluée.

4.4. Matériel et méthodes

4.4.1. Matériel biologique

Cette expérience a été menée sur la souche monoclonale axénique de *Fragilariopsis cylindrus* CCMP3323 (Grunow) Krieger (NCMA, Bigelow, USA ; synonyme de la souche CCMP1102).

4.4.2. Cultures et conditions d'acclimatation

Trois cultures en batch ont été pré-acclimatées dans du milieu Aquil (Price et al. 1989) à 0 °C et 30 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les cultures, maintenues en phase de croissance exponentielle grâce à des dilutions régulières, ont été transvasées dans des cylindres en verre de 80 L placés dans une chambre froide (0 ± 1 °C). Après avoir atteint une concentration proche de 1×10^6 cellules.mL⁻¹, les cultures ont été placées à l'obscurité durant environ deux mois (54 jours), pendant lesquels les différents paramètres présentés ci-après ont été mesurés. La fréquence d'échantillonnage de tous les paramètres étudiés est décrite dans la section Méthodes Supplémentaires 4.8.1. Comme lors des expériences précédentes, la fréquence d'échantillonnage était globalement plus élevée au début pour diminuer ensuite, une stabilisation du système étant attendue avec le temps. Elle était par ailleurs moindre pour les paramètres demandant davantage de biomasse (analyses biochimiques par exemple).

4.4.3. Paramètres étudiés

4.4.3.1. Cytométrie en flux, carbone organique particulaire et pigmentation

L'ensemble des paramètres présentés dans cette section ont été mesurés comme décrit dans le premier chapitre. La concentration et la viabilité cellulaire, la teneur en lipides neutres, ainsi que la présence d'organismes contaminants, ont été évaluées par cytométrie en flux (CMF) (Guava® easyCyte™ BGV HT, Millipore-Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne, catalogue No. 0500-4030). La concentration cellulaire de *F. cylindrus* a été estimée en comptant les particules caractérisées par une importante auto-fluorescence rouge (695/50 nm) après excitation par un laser bleu (488 nm). Une seconde estimation a été effectuée avec un compteur de particules Beckman Multisizer 4e Coulter Counter (Beckman Coulter, Indianapolis, USA). La viabilité a été estimée grâce au SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain - 5 mM Solution in DMSO (ThermoFisher, numéro référence: S7020) (i.e., test de perméabilité de la membrane). Une estimation semi-quantitative des lipides neutres a été réalisée avec le BODIPY® 505/515 (4,4-Difluoro-1,3,5,7-Tétraméthyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene; Thermo-Fisher, numéro référence : D3921). La présence éventuelle de contaminants a été vérifiée grâce au SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO (ThermoFisher, numéro référence : S7563). Les quotas de carbone ont été estimés avec un analyseur CHN (2400 Series II CHNS/O ; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Les teneurs en chlorophylles *a* et *c*, β -carotènes, zéaxanthine, anthéaxanthine, violaxanthine, fucoxanthine, diadinoxanthine et diatoxanthine par cellule ont été estimées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en utilisant une colonne Zorbax Eclipse XDB-C8 3.5 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Tous les paramètres, à l'exception du contenu pigmentaire, ont été mesurés en triplicatas sur chacune des cultures, y compris les échantillons de CMF marqués au SYBR Green.

4.4.3.2. Respiration à l'obscurité

Les mesures de respiration avaient pour but de suivre le taux métabolique des cellules. Elles ont été réalisées avec des optodes (capteurs d'oxygène fibre-optique OXROB10, PyroScience, Aachen, Allemagne) et un boîtier FireSting®-O2 (4 canaux) (PyroScience, Aachen, Allemagne) connecté à un ordinateur équipé du logiciel de traitement Pyro Oxygen Logger (v. 3.315, 2019) (paramètres : « LED intensity » = 40%,

« Amplification » = 40 X, « Oxygen Measuring Time » = 10 ms). Pour chaque mesure, un aliquot de culture a été placé dans une bouteille en verre munie d'un barreau magnétique d'agitation. En prenant soin de n'y laisser pénétrer aucune bulle d'air, la bouteille a été close avec des bouchons percés pour le passage hermétique des sondes. Les bouteilles ont ensuite été placées sur un agitateur magnétique dans un incubateur maintenu à 0 °C. La concentration en oxygène a été mesurée à l'obscurité toutes les deux minutes pendant 6 heures. La mesure repose sur l'estimation de la fluorescence émise par un capteur après excitation par une source lumineuse, fluorescence dont l'atténuation est proportionnelle à la concentration d'oxygène dans l'échantillon.

Les taux respiratoires (quantité d'oxygène consommée par unité de temps) ont été estimés en calculant le coefficient directeur de la droite de variation de la concentration en oxygène en fonction du temps. La mesure étant extrêmement sensible aux variations de température, les taux ont été estimés sur la partie linéaire de décroissance de la concentration en oxygène (i.e. une fois la température des échantillons stabilisée). Le système de mesure a préalablement été calibré suivant les instructions du fabricant.

4.4.3.3. *Carbohydrates*

Les carbohydrates ont été dosés par Maxwell Ware, postdoc dans le laboratoire de Graham Peers (Colorado State University, USA), selon protocole décrit par Caballero et al. (2016). Le but de ces mesures était de suivre les différentes fractions de carbohydrates au cours du temps. La fraction insoluble est majoritairement composée de carbohydrates faisant partie de la matrice organique associée au frustule. La fraction soluble est composée des carbohydrates intracellulaires au sein desquels on peut distinguer les carbohydrates réducteurs des non-réducteurs, ces derniers étant, chez les diatomées, majoritairement composés de chrysolaminarine. La procédure de séparation des différentes fractions de carbohydrates est schématisée en Fig. 4.2 à la fin de cette section. En raison de l'importante quantité de biomasse nécessaire à ces mesures (voir section suivante), un seul réplica technique n'a pu être effectué par culture. Seulement 4 points d'échantillonnage ont par ailleurs pu être réalisés (voir section Méthodes Supplémentaires 4.8.1).

Echantillonnage – Pour chaque échantillonnage et chaque culture, vingt aliquots de 500 mL de cultures ont été filtrés sur des filtres en fibre de verre (Cytiva® GF/F, 47 mm, 0.7

µm) pré-brûlés 4 heures à 450 °C, pour un total de 10 L de culture filtrés par échantillon. Les filtres ont été placés dans des cryotubes rapidement congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80 °C jusqu'aux analyses.

Remise en suspension et rinçage des échantillons – Pour chaque échantillon, 2.7 à 5.7 x 10⁹ cellules ont été remises en suspension dans 40 mL de milieu Aquil pré-refroidi dans des tubes Falcon de 50 ml pré-pesés placés sur glace. Les tubes ont été centrifugés pendant 15 minutes à 3 148 g (4 °C) et le surnageant éliminé.

Extraction des carbohydrates et séparation des fractions insolubles et solubles – Les carbohydrates solubles ont été extraits selon la méthode décrite par Caballero et al. (2016) avec quelques modifications mineures. Les échantillons recueillis dans des tubes Falcon ont été remis en suspension dans 2 mL d'eau désionisée et stérilisée par filtration (18.2 Ωm). Les échantillons ont été vortexés et placés dans un bain-marie à 50 °C pendant 30 min. Durant cette période, les échantillons ont été brièvement retirés du bain toutes les 10 minutes pour être vortexés. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 3 148 g (18 °C) pour séparer les carbohydrates solubles extraits des carbohydrates insolubles contenus dans le culot. Le surnageant contenant les carbohydrates solubles a été divisé en deux fractions de 1 mL qui ont été conservées dans des tubes de microcentrifugation de 2 mL placés à 4 °C jusqu'à la quantification des carbohydrates solubles moins de 12 heures après.

Quantification des sous-fractions de carbohydrates solubles – Pour chaque échantillon, l'une des deux fractions solubles a été hydrolysée avec de l'acide sulfurique 72% (poids/poids). Ceci permet de quantifier les carbohydrates solubles totaux. La seconde fraction, non hydrolysée, permet de quantifier les carbohydrates solubles réducteurs. Chacune des fractions a été quantifiée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Van Wychen et Laurens (2016), modifiée par Caballero et al. 2016. L'ajout de 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) complexe les monosaccharides (carbohydrates solubles réducteurs) au niveau de leur groupement aldéhyde. Le MBTH complexé peut alors être quantifié en mesurant son absorbance à 620 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec des concentrations connues de glucose (comprise entre 0 et 0.5 mg.mL⁻¹), et a permis de convertir les quantités de carbohydrates des différentes fractions en masse de glucose par cellule. Ces valeurs ont pu être converties en quantités de carbone en connaissant la masse molaires du carbone

et celle du glucose. Les quantités de carbohydrates solubles non réducteurs, majoritairement composés de chrysolaminarine chez les diatomées lorsque extraits avec cette méthode (Caballero et al. 2016), ont été calculées en soustrayant les quantités de carbohydrates solubles réducteurs de celles des carbohydrates solubles totaux.

Quantification de la fraction insoluble des carbohydrates – La fraction insoluble contenue dans le culot isolé précédemment, a été hydrolysée et quantifiée suivant le même protocole que celui utilisé pour la fraction soluble totale.

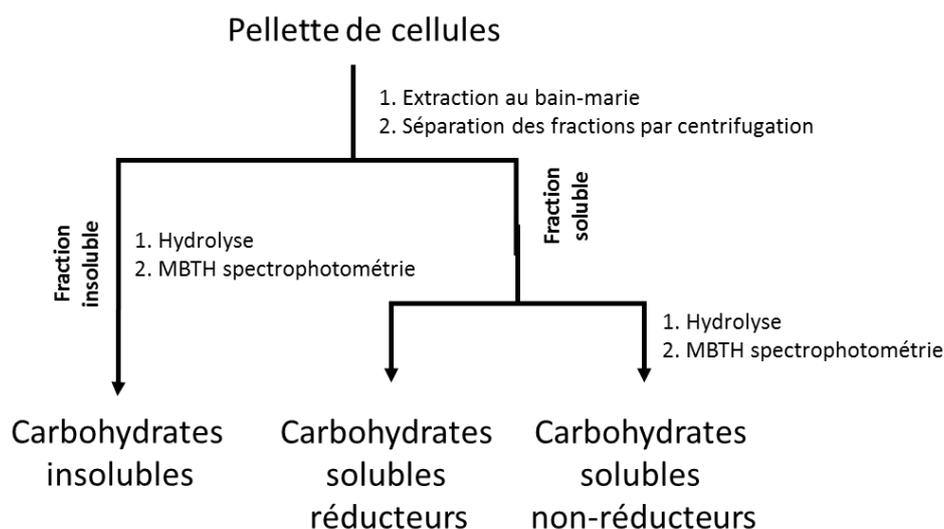


Figure 4.2. Résumé de la procédure de séparation des deux fractions de carbohydrates et des deux sous-fractions de la partie soluble. Modifiée à partir de Caballero et al. 2016.

4.4.3.4. Lipides

Pour chaque échantillon, trois aliquots de 250 mL ont été filtrés sur des filtres en fibre de verre (Cytiva® GF/F, 47 mm, 0.7 µm) pré-brûlés durant 4 heures à 450 °C. Les filtres, placés dans des cryotubes auxquels ont été ajoutées des quantités connues de standards internes, ont été congelés rapidement dans de l’azote liquide, puis placés à -80 °C jusqu’à analyse. Les standards internes ont servi à estimer le taux de dégradation des lipides étant susceptible de se produire lors de la manipulation des échantillons, dans le but de corriger les résultats. Les analyses ont été effectuées par Margarida Campos et Jenny Nuzzo de l’équipe d’Angelo Fontana (Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB) - CNR, Italie). Pour doser les grandes classes de lipides (i.e., TAG, phospholipides et glycolipides,

monogalactosyldiacylglycerol ou MGDG, digalactosyldiacylglycérol ou DGDG, et sulfoquinovosyl diacylglycérol ou SQDG), les lipides ont été extraits puis analysés par résonance magnétique nucléaire suivant les méthodes décrites par Russo et al. (2021) et Nuzzo et al. (2013). Les quantités de cholestérol sulfate et desmostérol (intermédiaire de synthèse du cholestérol) sulfates ont été estimées par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS) selon Gallo et al. (2018). Toutes les quantités de lipides ont été normalisées par le nombre de cellules.

Au moment où cette thèse a été soumise, d'autres données générées par LC-MS n'étaient pas encore accessibles. Ces données, en plus de fournir une autre estimation des grandes classes de lipides, renseignent sur les différentes catégories de phospholipides et glycolipides, et sur la composition en acides gras des différentes classes.

4.4.3.5. *Protéines*

Les analyses ont été effectuées par Mireille Savoie du laboratoire de Douglas Campbell (Mount Allison University). Elles permettent d'évaluer le contenu protéique total au cours du temps, ainsi que la variation de deux protéines essentielles de la photosynthèse : la Rubisco et la PsbA (protéine D1 du centre réactionnel du photosystème II).

Prélèvements des échantillons – A chaque échantillonnage, un aliquot de 100 mL de culture a été prélevé dans un tube de centrifugation de 200 mL en polypropylène à fond conique. Les échantillons ont été centrifugés 15 minutes à 4 400 rpm à 0 °C, avec 100 µL de Pluronic. Le culot a été rincé à trois reprises en étant re-suspendu dans du mBPS et centrifugé à nouveau. Le culot a ensuite été congelé rapidement dans de l'azote liquide avant d'être conservé à – 80 °C jusqu'à l'analyse.

Extraction – Les pelletes de cellules ont été décongelées, re-suspendues dans 500 µL de tampon d'extraction de protéines 1 X (voir composition détaillée en Méthodes Supplémentaires 4.8.2) et transférées dans des flacons de lyse FastPrep® (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Les cellules ont été ensuite lysées pendant 3 cycles de 60 secondes à 6.5 m.s⁻¹. Entre les cycles, les échantillons ont été placés sur glace durant 60 secondes. Les flacons de lyse ont ensuite été centrifugés à 16 100 g durant 5 minutes. Le surnageant a été transféré dans un tube de micro-centrifugation de 600 µL, et à nouveau centrifugé à 16 100 g pendant 3 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Des aliquots de 40 µL de surnageant contenant les extraits de protéines ont été répartis dans des flacons et placés à

-80 °C jusqu'à l'analyse. Des triplicatas de mesures de la quantité de protéines totales ont ensuite été effectués. Un seul réplica technique de mesure a été effectué pour les protéines photosynthétiques.

Quantification du contenu protéique total – La méthode BCA (*bicinchoninic acid assay*, Smith et al. 1985) a été utilisée pour quantifier les protéines totales (BCA assay kit, ThermoFisher). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique : en milieu alcalin, les protéines réduisent l'ion cuivrique (Cu^{2+}) en ion cuivreux (Cu^+), lequel peut être complexé par le BCA. Le complexe est caractérisé par une forte absorption à 562 nm, proportionnelle à la quantité de protéines. Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec un standard de gammaglobuline bovine (concentrations comprises entre 0 et 1.0 mg.mL⁻¹).

Quantification des protéines photosynthétiques par transfert de protéines – Les échantillons ont été préparés par ajout, à un volume de la solution d'extrait de protéines correspondant à 2.0 µg de protéines totales, d'1 µL de dithiothréitol (concentration finale 0.05 M), de 0.33 µL de tampon 4X Bolt™ LDS Sample Buffer (ThermoFisher), et d'un volume du même tampon dilué quatre fois avec de l'eau milli-Q pour un volume final de 10 µL. Les échantillons ainsi préparés ont été chargés sur des gels Invitrogen Bolt™ Bis-Tris 4-12% de 15 ou 17 puits (ThermoFisher). Toutes les migrations sur gels ont été effectuées pendant 25 minutes à 200V. Les gels ont ensuite été transférés pendant 60 minutes à 20V sur une membrane de polyfluorure de vinylidène. Les blots ont été bloqués pendant une nuit dans une solution de blocage ECL (*enhanced chemiluminescence*) à 2% obtenue avec une solution saline tamponnée au Tris Tween 20 1 X (TBS-T). Le lendemain matin, chaque blot a été incubé en présence d'anticorps appropriés, et agité doucement sur un plateau rotatif pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires de PsbA (AS05 084, Agrisera, Suède) et de la grande sous-unité de la Rubisco (RbcL) (AS03037) ont été dilués par un facteur 10 000. Chaque blot a été rapidement lavé à deux reprises avec 10 mL du TBS-T 1 X, puis une fois 15 minutes sur une table tournante, et finalement trois fois pendant 5 minutes. Tous les blots ont été incubés dans une solution d'anticorps secondaires (anti-rabbit HRP, Bio-Rad lot, 64230791) diluée d'un facteur 15 000, et agités doucement sur un plateau rotatif pendant 1 heure à température ambiante. Les blots ont été ensuite lavés selon le protocole de lavage décrit précédemment, puis incubés dans du substrat ECL (Amersham ECL Select Western Blotting Detection

Reagent) et imagés avec un Molecular Imager® VersaDoc™ (Bio-Rad). Trois concentrations de standards ont été utilisées pour établir les courbes d'étalonnage de PsbA et RbcL. Pour le standard de PsbA (AS01 016S, Agrisera, Suède), les concentrations utilisées étaient comprises entre 12.5 et 100 fmol. Pour le standard de la RbcL (Agrisera, AS01 017S), les concentrations ont varié entre 175 et 1 400 fmol. Les solutions commerciales des standards ont été diluées avec une solution composée de 65% d'eau milli-Q, 10% de dithiothréitol (concentration finale 0.05 M) et 25% de tampon 4X Bolt™ LDS Sample Buffer. Avant d'être chargés sur les gels, tous les échantillons et standards ont été chauffés 5 min à 70 °C. Les quantités de RbcL (en moles), ont été converties en quantités de Rubisco en étant divisées par 8, nombre de sous-unités larges trouvées dans la Rubisco de forme I C/D présente chez les diatomées.

4.5. Résultats

4.5.1. Contamination des cultures

Au cours des expériences, des bactéries ont été détectées et dénombrées dans deux des trois cultures. Elles étaient identifiables grâce à une relativement forte fluorescence verte lorsque marquées au SYBR Green, à une diffusion avant (*forward scatter* : FSC ; proxy de taille) relativement faible, et une fluorescence rouge extrêmement faible (voir Figure S4.1). Des levures ont également été détectées. Elles se distinguent des bactéries par un FSC nettement plus élevé (voir Figure S4.1). La nature des contaminants (i.e., bactéries et levures) détectés par CMF a été confirmée par des observations en microscopie à épifluorescence après marquage au SYBR Green (protocole de marquage identique à celui utilisé en CMF).

La contamination bactérienne, calculée comme suit, n'a jamais dépassé les 31% dans aucune des cultures (voir Tableau S4.1. pour le bilan des contaminations en bactéries et levures).

$$\frac{[\text{bactéries}]}{[F. cylindrus]+[\text{bactéries}]+[\text{levures}]} \times 100\%$$

Le compteur Beckman Multisizer a été utilisé pour obtenir une seconde estimation de la concentration cellulaire. Ce compteur mesure le volume de chaque particule et en déduit

le diamètre en supposant que la particule est sphérique. La sonde utilisée a permis de détecter les particules d'un diamètre supérieur à 2 μm (soit un volume de 4.19 μm^3). Les distributions de tailles obtenues pour les échantillons contenant une contamination bactérienne conséquente montrent que le diamètre des bactéries n'excédait pas cette taille (elles n'étaient donc pas détectées), hormis dans la culture n°2 au jour 27 (voir exemple en Figure S4.2). Les données du jour 27 ne seront donc pas prises en compte dans les analyses pour la deuxième culture.

La présence d'un nombre relativement important de bactéries a pu biaiser certaines mesures comme celles de la respiration. Cependant, étant donné la différence importante de biovolumes des populations de *F. cylindrus* et de bactéries, ces dernières n'ont pas nécessairement affecté significativement les paramètres suivis. Lors de l'acclimatation à l'obscurité, le volume cellulaire de *F. cylindrus* a continuellement diminué, démarrant à 42.29 ± 1.99 pour finalement atteindre 38.28 ± 1.35 μm^3 (données non présentées). Le rayon moyen minimum atteint par les cellules était donc 2.09 μm . Si l'on considère que le diamètre moyen des bactéries peut atteindre une valeur maximale de 2 μm (limite de détection du compteur de particules), cela signifie que le biovolume des bactéries n'a jamais excédé 4.69% du biovolume de *F. cylindrus*. Par conséquent, nous sommes partis du principe que les dosages des éléments cellulaires étudiés (i.e., carbone particulaire, lipides, etc.) n'ont pas été significativement affectés par la présence de bactéries. Lorsque jugé nécessaire, certaines données ont pu être éliminées des analyses. Les éventuels ajustements effectués seront détaillés et justifiés au fur et à mesure que les données seront présentées et analysées dans le texte.

Après que des levures aient été détectées dans l'une des trois cultures (par la suite nommée culture n°3) au 40^{ème} jour d'acclimatation à l'obscurité, la décision a été prise de l'éliminer le 42^{ème} jour (après confirmation de la contamination) pour limiter les risques de propagation. Des levures n'ont été détectées que lors des derniers points d'échantillonnage dans les deux autres cultures (i.e., cultures n°1 et n°2). Les levures étaient caractérisées par un FSC moyen similaire à celui de *F. cylindrus* (voir Figure S4.1). Dans les échantillons fortement contaminés (i.e., la concentration en levures a pu dépasser 20% de celle de *F. cylindrus* dans les échantillons les plus contaminés des cultures n°1 et n°3), les distributions de tailles ont permis d'observer une population de particules d'un diamètre légèrement supérieur à 3.5 μm (voir Figure S4.3). Dans les

échantillons très contaminés, les levures représentant donc un biovolume relativement important, ont pu significativement biaiser les résultats (excepté, *a priori*, pour ce qui est des paramètres liés à la photosynthèse ou mesurés par CMF). Lorsque nécessaire, le retrait des résultats d'un ou plusieurs réplicas nous a privé de la possibilité de calculer un écart-type standard aux points d'échantillonnage concernés.

Les contaminations n'ont pas semblé affecter la physiologie de *F. cylindrus*. Le pourcentage de viabilité est resté élevé (i.e., supérieur à 94%) tout au long de la période d'obscurité (voir Figure S4.4). Les valeurs de fluorescence rouge et de FSC mesurées à T0, ainsi que leurs tendances (i.e., diminution linéaire) ont été similaires à celles observées lors des trois premières expériences d'acclimatation à l'obscurité (données non présentées). La même observation s'applique aux mesures de lipides neutres effectuées au CMF après marquage au BODIPY (voir section 4.5.3.3 de la partie Résultats). Lorsque les cultures ont été de nouveau soumises à des conditions de lumières similaires à celle de l'acclimatation (phase de l'expérience qui ne sera pas traitée dans ce chapitre), les cultures ont repris leur croissance à la lumière entre le deuxième et le troisième jour (taux de croissance instantané moyen des deux cultures restantes au retour à la lumière : $0.24 \cdot j^{-1}$). Notons que le temps de latence est cohérent avec les résultats obtenus pour les trois premières acclimations.

4.5.2. Taux de consommation d'oxygène à l'obscurité

La vitesse consommation d'oxygène des cellules donne une indication sur leur taux d'activité métabolique. Le biais dans les données de respiration dû aux contaminations par les bactéries ou les levures est nettement ressorti (i.e., augmentation du taux de consommation d'oxygène). Les données n'ont donc été considérées que pour la culture n°1, la seule dépourvue de contaminants pendant la majorité de l'expérience. Le dernier point de mesure (i.e., jour 54) a cependant été retiré en raison de l'apparition des levures.

Le taux de respiration de la culture n°1 est rapidement tombé à environ 18% de sa valeur initiale en 12 heures d'obscurité (Fig. 4.3). Il a continué de diminuer pour atteindre 7.5% de la valeur initiale au jour 3, période marquant tout comme lors des précédentes expériences la fin du dernier cycle de division d'une partie de la culture (voir Figure S4.5).

Puis, il a continué de diminuer plus lentement jusqu'à devenir indétectable au-delà du jour 18.

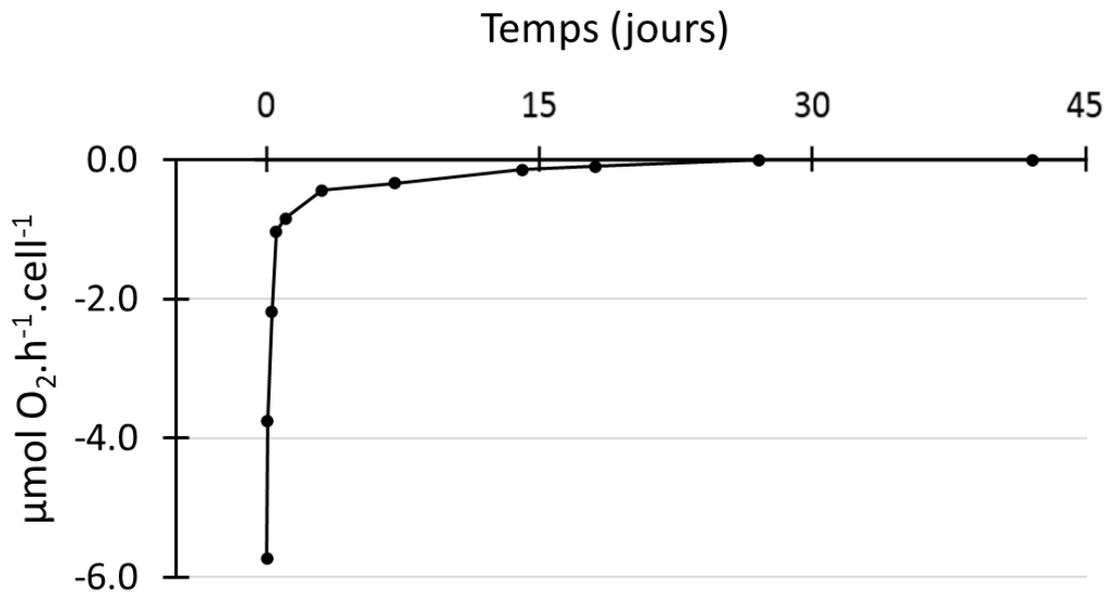


Figure 4.3. Vitesse de variation de la concentration en oxygène lors d'incubations à l'obscurité d'aliqouts de la culture n°1 (dépourvue de contamination jusqu'au jour 42). Les mesures correspondent aux coefficients directeurs des droites obtenues par application de régressions linéaires entre la concentration en oxygène et le temps, normalisés par les concentrations cellulaires ($n = 1$). Notons que lorsqu'une pente positive a été mesurée, les taux ont été considérés comme étant nuls.

4.5.3. Dosages des principaux éléments macromoléculaires

Les mesures de macromolécules n'ont été considérées que pour les échantillons dont le biovolume total des levures et des bactéries n'excédait pas 5% du biovolume de *F. cylindrus*. Pour les levures, légèrement plus petites que *F. cylindrus*, on a considéré un volume cellulaire équivalent.

Le but ici était d'évaluer la possible implication de chacun des grands réservoirs de carbone dans la survie de la cellule, et notamment dans leur capacité à maintenir un métabolisme basal à l'obscurité.

4.5.3.1. Carbone particulaire total

Comme dans les expériences précédentes, la teneur cellulaire en carbone a fortement diminué au cours des trois premiers jours d'obscurité, en raison de la réduction de la concentration cellulaire provoquée par la dernière division accomplie par une partie de la population (Fig. 4.4). Par la suite, elle a continué de diminuer, mais plus lentement et d'une manière qui semblait linéaire. En moyenne, $16.24 \pm 4.28\%$ du carbone cellulaire a disparu entre le jour 3 et le jour 35 (dernier point de mesure disponible pour la culture n°3), et 25.59% entre les jours 3 et 49 (dernier point de mesure sur la culture n°1).

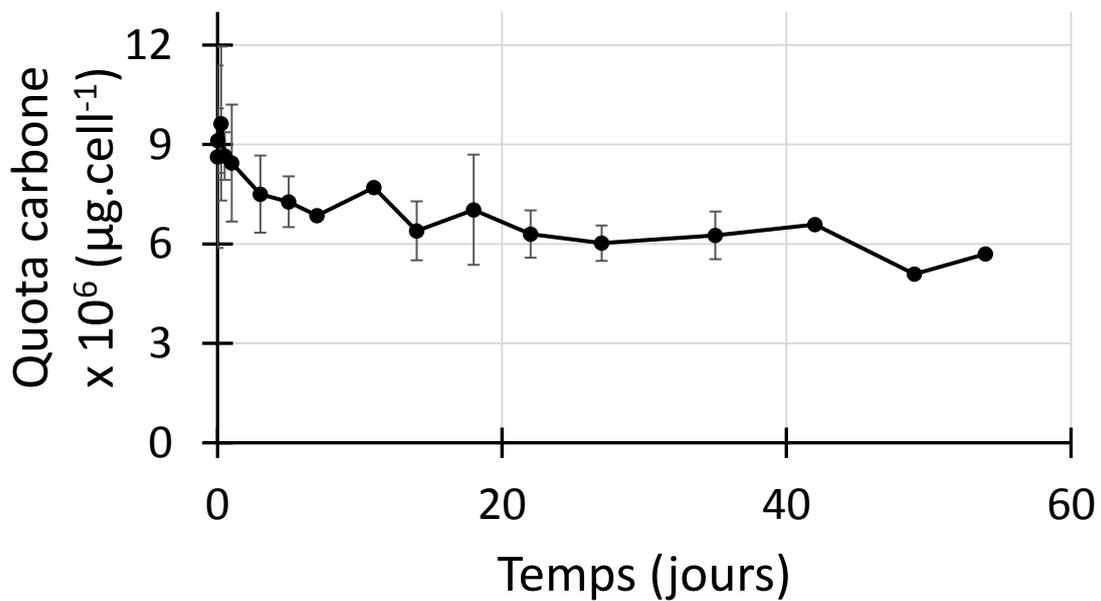


Figure 4.4. Carbone total par cellule (n = 9). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.

4.5.3.2. Carbohydrates

Les analyses ont permis d'estimer des teneurs cellulaires en carbohydrates solubles (saccharides intracellulaires) et non solubles (polysaccharides appartenant majoritairement à la matrice organique associée au frustule des diatomées). La fraction soluble a également été répartie en fractions réductrice (majoritairement composée de monosaccharides) et non-réductrice (majoritairement de la chrysolaminarine, sucres de réserves des diatomées, Caballero et al. 2016).

Au temps T0, les carbohydrates solubles étaient majoritairement représentés par la fraction non-réductrice (environ 75%). Cette dernière a fortement diminué ($50.75 \pm$

14.57%) au cours de la première semaine d'obscurité (Fig. 4.5). Elle a ensuite diminué plus lentement pour atteindre $67.40 \pm 15.58\%$ de sa valeur initiale, puis est restée stable jusqu'à la fin de la période d'obscurité. Les carbohydrates solubles réducteurs n'ont pas été affectés par l'obscurité, tout comme la fraction non-soluble.

On retiendra que les différentes fractions de carbohydrates ont affiché une variabilité importante. En raison du grand volume nécessaire à ces dosages, le nombre d'échantillonnages et de répliques a été limité, ce qui amoindrit la significativité des tendances observées. Ce qui semble néanmoins ressortir des données est que la teneur en chrysolaminarine a été affecté par l'absence de lumière, et ce, avant la fin du premier mois d'obscurité. On retiendra également que le carbone de la chrysolaminarine représentait $1.55 \pm 0.57\%$ du carbone cellulaire total.

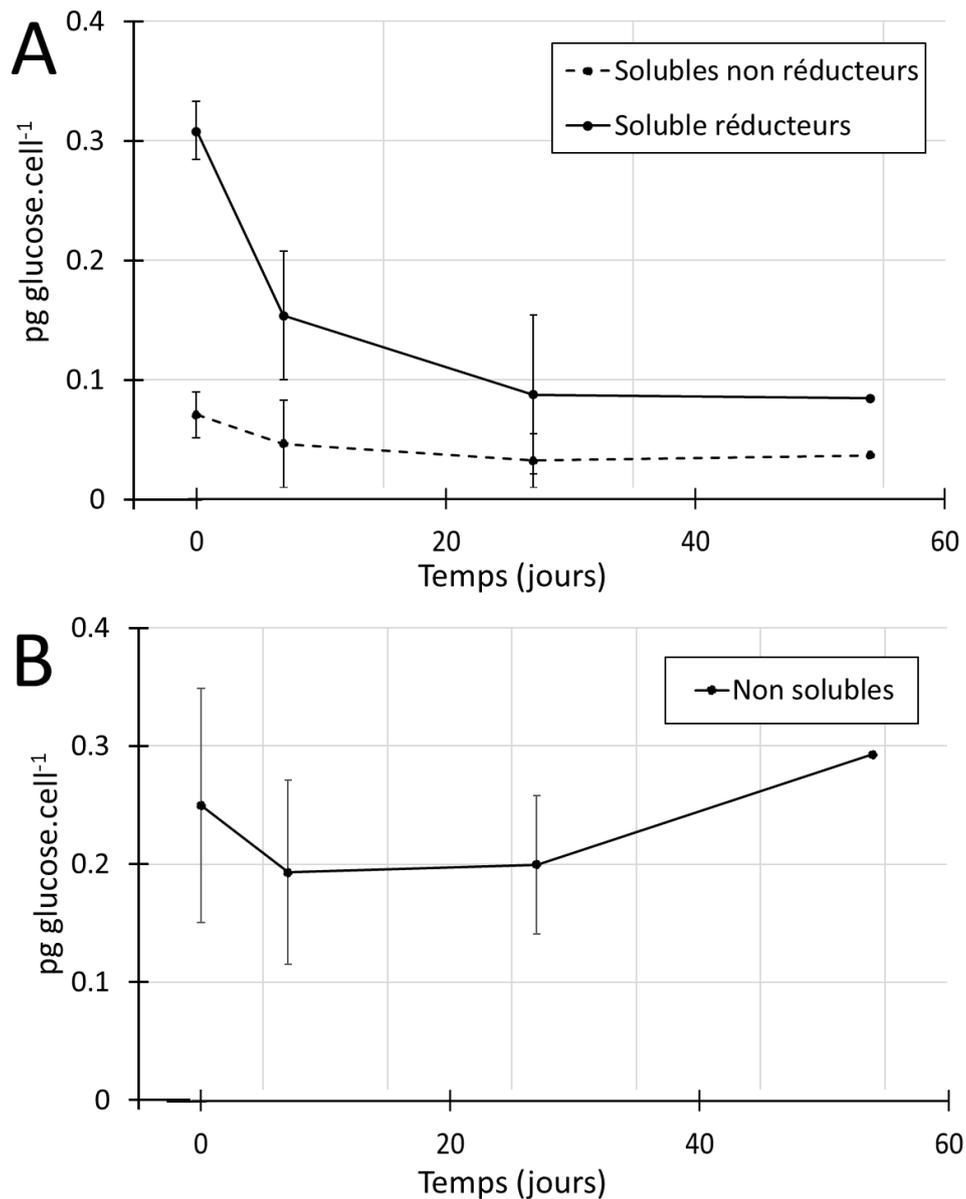


Figure 4.5. Fractions cellulaires de carbohydrates (A) solubles réducteurs et non-réducteurs et (B) insolubles, en équivalent glucose (n = 3). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.

4.5.3.3. Lipides neutres cellulaires estimés par cytométrie en flux

Les données de CMF, bénéficiant de la possibilité de distinguer *F. cylindrus* des organismes contaminants, ont toutes été exploitées. Les valeurs de fluorescence du BODIPY par cellule reproduites ici (Fig. 4.6) et celles acquises durant l'expérience d'acclimatation de trois mois (voir Fig. 1.1 du Chapitre 1) sont similaires au temps T0. Les tendances sont également similaires puisque les valeurs de fluorescence, passées les

dernières divisions cellulaires, ont diminué jusqu'à atteindre des valeurs légèrement supérieures à 1 000 comptes par cellule au bout d'un mois. Par la suite, les valeurs se sont stabilisées, contrairement à l'expérience d'acclimatation de trois mois où elles ont continué de diminuer beaucoup plus lentement. L'augmentation apparente observée après le jour 42 est en réalité due à l'élimination de la culture n° 3 (à la suite d'une contamination par des levures) qui était caractérisée par des valeurs de fluorescence plus faibles, alors que les valeurs sont restées stables dans les deux autres cultures (données non présentées).

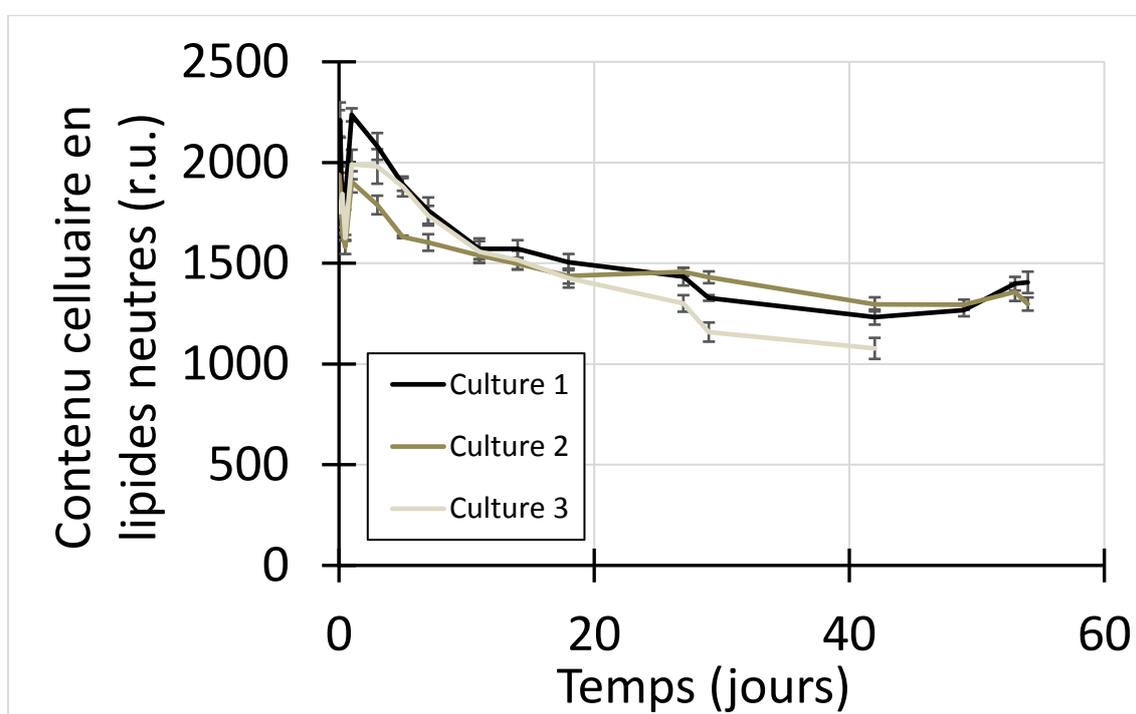


Figure 4.6. Contenu en lipides neutres par cellule estimé par CMF après marquage des cellules au BODIPY. Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard ($n = 3$). Unités relatives (u.r.).

4.5.3.4. Classes de lipides

Au moment de la rédaction de ce chapitre, les données n'étaient disponibles que pour les cultures n°1 et n°2. Le dernier point de mesure n'a par ailleurs pas été pris en compte pour la culture n°1 qui était contaminée par des levures.

La majorité des lipides membranaires (phospholipides, glycolipides ainsi que MGDG) n'ont pas montré de tendance significative (Fig. 4.7). La teneur en SQDG, lipides les plus

abondants à T0, ont en revanche diminué de plus de 85% durant la première semaine. Elle a ensuite été stable pendant la majorité de l'acclimatation. Les DGDG n'ayant la plupart du temps pas été détectés n'ont pas été représentés. Les TAG ont montré la tendance la plus dynamique. Leur teneur a diminué d'environ 75% durant la première semaine, pour ensuite réaugmenter jusqu'au jour 42, pour enfin rediminuer jusqu'à la fin de la période d'obscurité.

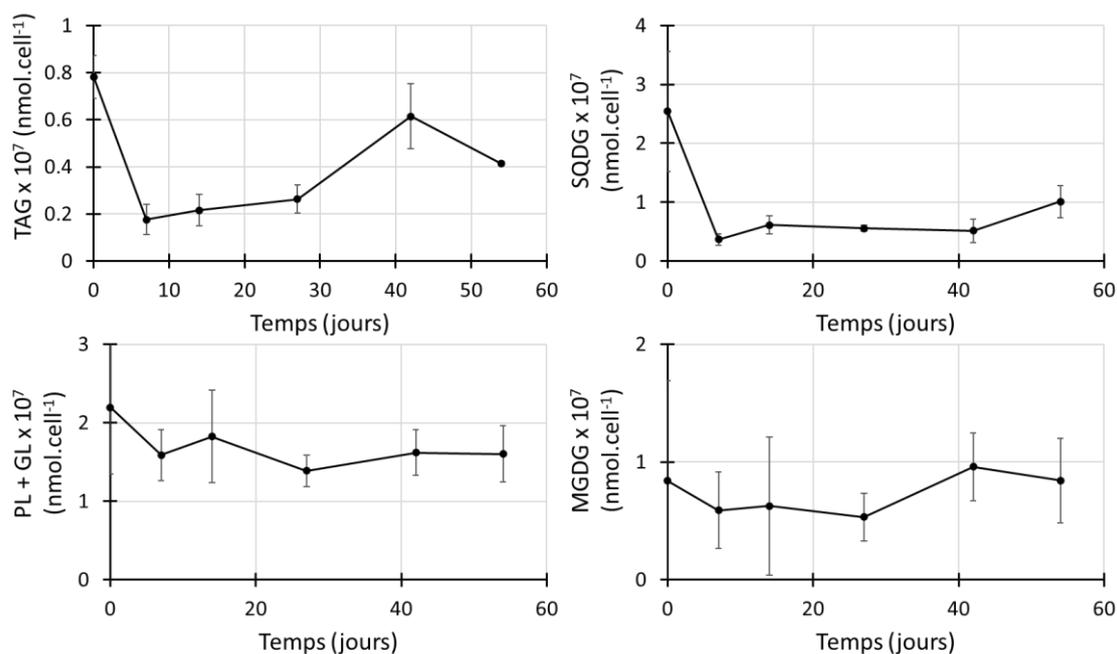


Figure 4.7. Teneurs des principales classes de lipides par cellule pour les cultures n°1 et n°2 (n = 6). Les barres d'erreur représentent l'écart type standard. PL : phospholipides ; GL : glycolipides.

En se basant sur des résultats préliminaires obtenus lors d'une précédente acclimatation à l'obscurité, nous avons pu déterminer que les TAG de *F. cylindrus* à T0 devaient être en moyenne composés de 16.5 atomes de carbone. On a donc pu calculer que les TAG composaient environ 0.5% du carbone des cellules à T0. Idem pour les SQDG (17 carbones) qui représentaient donc environ 1.4% du carbone totale à T0.

Les stérols sulfates (i.e., cholestérol sulfate et desmostérol sulfate) ont été caractérisés par des tendances très similaires. Ces dernières montrent que, passé une semaine d'obscurité, les teneurs en stérol sulfates ont augmenté lentement (Fig. 4.8). Néanmoins, l'application de tests appariés de Wilcoxon (voir Chapitre 1 pour description de la méthode) indique

qu'il n'y a de différence significative qu'entre les valeurs récoltées au jour 7 et celles des autres échantillonnages.

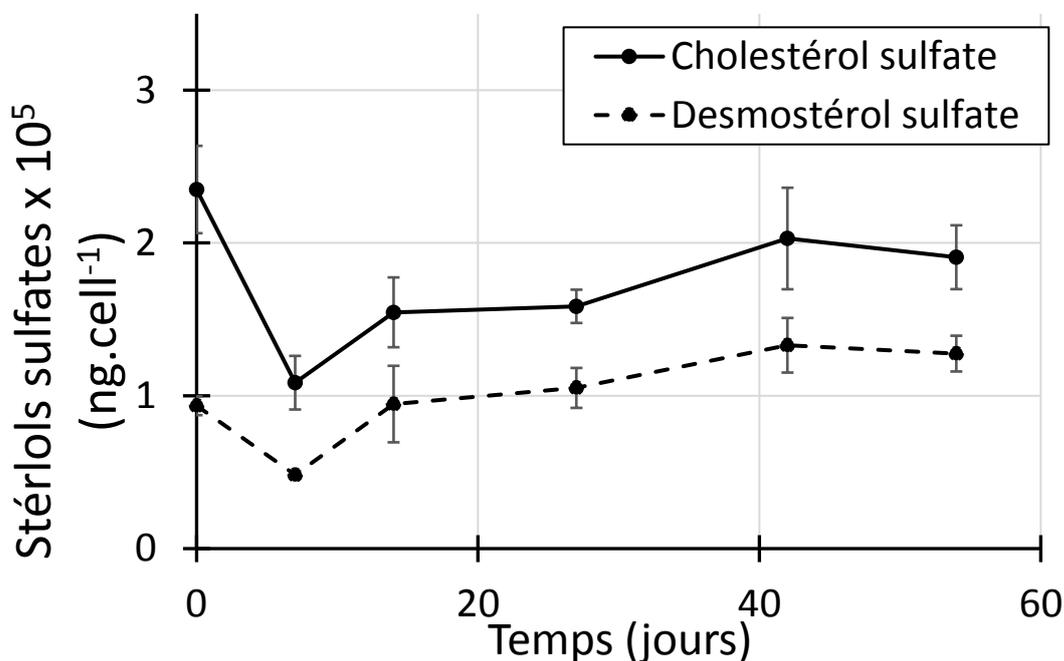


Figure 4.8. Cholestérol and desmostérol sulfates par cellules pour les cultures n°1 et n°2 (n = 6). Les barres d'erreur représentent l'écart type standard.

4.5.3.5. Protéines

Compte-tenu de l'apparition relativement précoce de levures pendant l'acclimatation de la culture n°3, seuls les échantillons des deux premières cultures ont été analysés. Dans le milieu naturel, les protéines ne sont pas produites pour être stockées. Cependant, en réponse à des stress nutritifs, ou à certains stades de leur développement, les acides aminés de certains organismes peuvent être recyclés, à l'instar de formes de stockage carbonées, pour alimenter le métabolisme en énergie ou pour synthétiser de nouvelles molécules (Araújo et al. 2010 ; McLoughlin et al. 2020 ; Watanabe et al. 2013).

Protéines totales – Durant les trois premiers jours d'obscurité, les protéines totales de *F. cylindrus* ont nettement diminué en raison de la dernière division opérée par une fraction de la population (Fig. 4.9). La composition en acides aminés n'étant pas connue, il n'est pas possible d'estimer avec précision la quantité de carbone que représente le réservoir de protéines. Cependant, en partant du principe que le carbone représente en moyenne

environ 45.6% de la masse molaire des acides aminés protéinogènes trouvés chez les diatomées, on peut calculer que le carbone des protéines représentait en moyenne 28.9% du quota de carbone au jour 3. La teneur en protéines est ensuite restée stable jusqu'au 27^{ème} jour de la période d'obscurité. Dans la culture n°2 (la seule dépourvue de contamination importante au jour 54), dont les protéines représentaient 30,5% du carbone total au jour 3, la teneur en protéines a diminué d'environ 27.1% entre les jours 27 et 54, ce qui équivaut à une diminution d'environ 8.26% du quota carbone mesuré au jour 3.

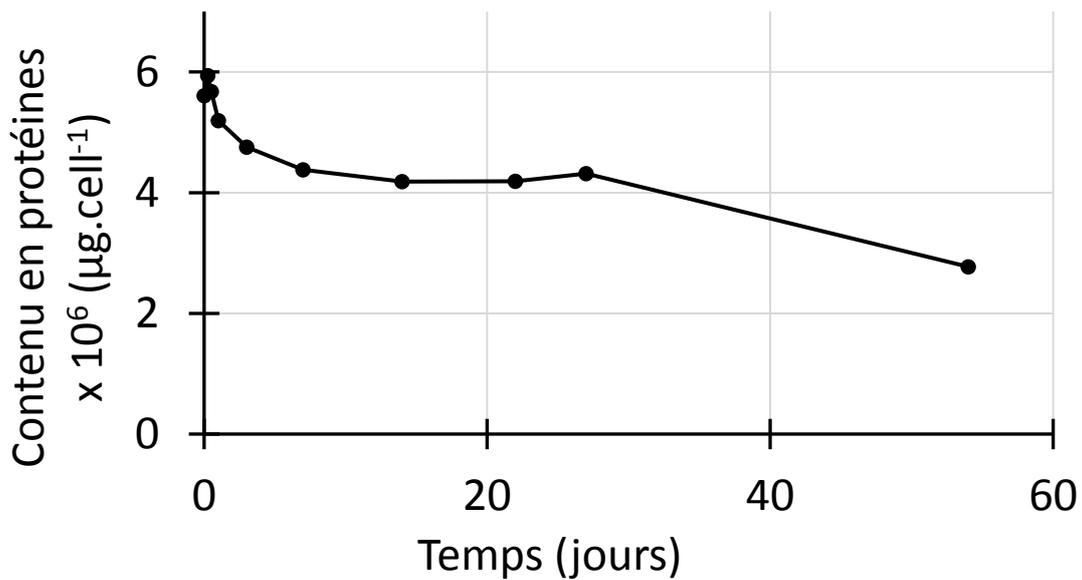


Figure 4.9. Teneur cellulaire en protéines totales pour les cultures n°1 et n°2 (n = 6).

Rubisco et PsbA – Etant donné que les protéines photosynthétiques ne sont *a priori* pas affectées par les levures et bactéries, toutes les données ont été conservées. Une fois les dernières divisions de cellules achevées, les quantités de Rubisco et de PsbA ont augmenté jusqu'à la fin du premier mois d'obscurité (Fig. 4.10). Au 54^{ème} jour, en revanche, les valeurs ont respectivement diminué d'en moyenne 45.6 et 37.0% par rapport à celles du jour 27.

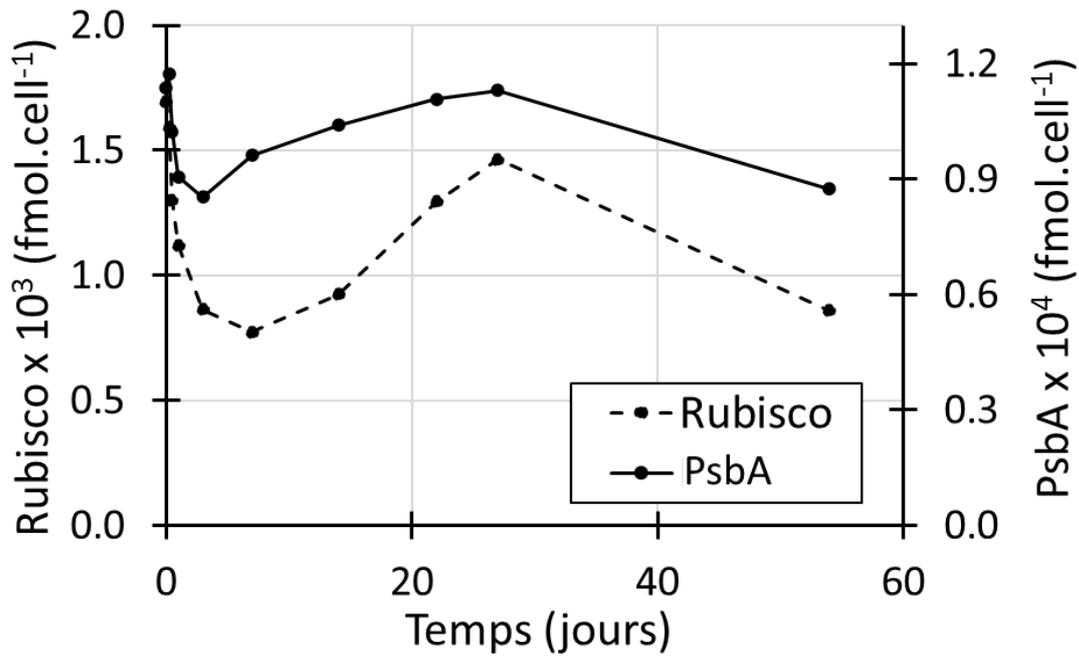


Figure 4.10. Quantités de Rubisco et de PsbA par cellule pour les cultures n°1 et n°2 (n = 2).

4.5.3.6. Pigments

Contrairement aux paramètres présentés précédemment, les profils pigmentaires, n'étant en principe pas affectés par les contaminations, ont tous été exploités.

Comme lors des trois premières expériences, certains pigments ont continuellement diminué à l'obscurité (Fig. 4.11). C'est notamment le cas de la chlorophylle *a* et de la fucoxanthine qui représentent à eux seuls plus de 80% de la masse totale de pigments après trois jours d'obscurité. Il est possible de déterminer la masse de carbone de chacun des pigments d'après leur masse molaire de carbone. Au troisième jour d'obscurité, cette dernière équivalait à 3.24% du quota de carbone. La diminution de la teneur cellulaire en pigments entre le jour 3 et le jour 54 équivalait à 4.34% de la diminution du quota carbone.

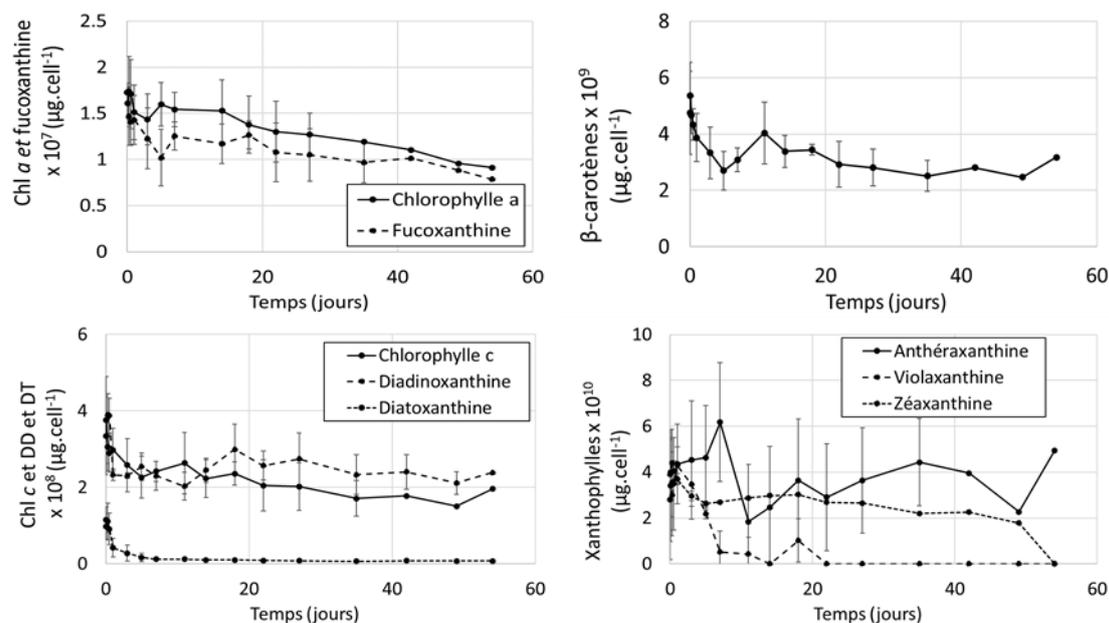


Figure 4.11. Pigments cellulaires mesurés par HPLC (n=3). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.

4.6. Discussion

En compilant les analyses obtenues, nous dépeignons ici la dynamique d'utilisation des grands compartiments de carbone de *F. cylindrus* lors d'une acclimatation à l'obscurité de deux mois.

4.6.1. Diminution drastique de l'activité métabolique

La consommation d'oxygène à l'obscurité pourrait être engendrée par deux processus. Le premier, et probablement le plus important, est la respiration mitochondriale qui résulte du catabolisme de substrats cellulaires et aboutit à la production d'énergie. La seconde est la chlororespiration qui prend place dans le chloroplaste et dont le fonctionnement permet, à l'obscurité ou à de très faibles intensités lumineuses, de produire de l'ATP par le biais d'un apport de pouvoir réducteur (Peltier et Cournac 2002). Cette dernière représente *a priori* une part relativement faible (i.e., au plus 20%) de la respiration totale (Bennoun 1982 ; Peltier et al. 1987). Chez les diatomées, la diminution du pH engendrée par la chlororespiration dans les thylakoïdes, entrainerait un gradient de pH suffisamment

important pour enclencher la conversion de DD en DT à l'obscurité (Jakob et al. 2001). Une quantité importante de DT a pu être observée chez une souche de *Chaetoceros neogracilis* au cours d'une acclimatation à l'obscurité d'un mois (Lacour et al. 2019). Cependant, ça n'a pas été le cas ici, la DT présente à T0 ayant rapidement été convertie en DD une fois *F. cylindrus* à l'obscurité (Fig. 4.11), et atteint des valeurs extrêmement basses au bout d'une semaine. Dans notre cas, il semble donc probable que la chlororespiration ait pu jouer un rôle significatif dans la survie à long terme. La consommation d'oxygène observée peut donc être majoritairement attribuée à la dégradation de substrats cellulaires alimentant la chaîne respiratoire mitochondriale.

Certaines diatomées peuvent assimiler les nitrates à l'obscurité (Clark et al. 2002) et les respirer grâce à un processus appelé réduction dissimilatrice des nitrates (Kamp et al. 2011 et 2013). Il a été montré qu'à l'obscurité, *Amphora coffeaeformis* pouvait consommer la majeure partie de ses réserves (environ 85 %) en l'espace de 24 h. Ce processus pourrait donc participer à la mise en place d'un état de dormance (Kamp et al. 2011). Il prend cependant place lorsque les algues sont dans des conditions anoxiques, ce qui n'était pas le cas dans nos expériences. Lors des précédentes acclimations à l'obscurité, nous avons par ailleurs pu observer que la concentration en nitrates ne variaient pas (voir Figure S4.6).

La consommation d'oxygène à l'obscurité est corrélée à la quantité de substrat respiré pour générer de l'ATP, et donc à l'activité de la cellule qui nécessite cet apport. Lorsque *F. cylindrus* a été placée à l'obscurité, les données de respiration reflètent une diminution rapide et importante de l'activité cellulaire, comme cela a déjà été observé chez d'autres diatomées (Anderson 1976 ; Waite et Thompson 1992). Au bout d'environ trois semaines, le taux de respiration n'était plus mesurable. C'est également à cette période que la quantité d'ATP par cellule dans l'expérience menée par Kennedy et al. (2019) sur une souche de *F. cylindrus* soumise à l'obscurité durant plusieurs mois, est définitivement passée sous le seuil de détection, pour ne remonter que lorsque la lumière a été de nouveau disponible. Nos données confirment que le coût de maintenance du métabolisme basal est fortement réduit lors d'une période d'obscurité prolongée, ce qui semble permettre à *F. cylindrus* de conserver sa viabilité longtemps après avoir été privée de lumière. L'importance de la réduction de l'activité métabolique pour la survie a été maintes fois illustrée par des observations de l'impact négatif sur le temps de survie que pouvait avoir

une augmentation de la température, qui augmente les taux métaboliques et donc la consommation des réserves.

Tout comme les données de fluorescence de l'ADN après marquage au SYBR Green (voir Chapitre 1) et la sous-régulation globale de l'expression des gènes (Chapitre 3), les données de respiration suggèrent que *F. cylindrus* est entré dans un état de dormance à l'obscurité. Notons que la lente diminution linéaire observée durant les trois semaines d'obscurité suivant le dernier événement de division d'une partie de la culture, laisse penser qu'une transformation physiologique a peu à peu été opérée par les cellules (Martin et al. 2012 ; Schaub et al. 2017).

4.6.2. Consommation lente du carbone cellulaire

Au-delà des trois premiers jours d'acclimatation à l'obscurité, après que les cellules ont eu fini de se diviser, le quota en carbone a nettement diminué, ce qui confirme une nouvelle fois que les diatomées peuvent mobiliser leurs réserves de carbone pour survivre. Chez différents types de microalgues, le carbone total de la cellule ou de ses principaux réservoirs (i.e., sucres, lipides et protéines) diminuent parfois de manière non linéaire : rapidement les jours ou semaines qui suivent la mise à l'obscurité des cultures, et plus lentement ensuite (Dehning et Tilzer 1989 ; Handa 1969 ; Popels et al. 2007 ; Schaub et al. 2017). Ceci suggère qu'un remaniement métabolique, illustré par un ralentissement de la consommation du carbone cellulaire, a éventuellement été opéré. Ici, la diminution du quota de carbone est plus ou moins linéaire au-delà du troisième jour d'obscurité. Cependant, la variabilité importante entre les répliquas ne nous permet peut-être pas d'observer certaines tendances. Dans les travaux de Handa (1969) et de Popels et al. (2007), une transition est également visible lors des premières semaines d'obscurité en ce qui concerne les substrats dégradés par les algues : alors que les sucres étaient préférentiellement dégradés au début de l'acclimatation à l'obscurité, les protéines étaient elles dégradées dans un second temps, alors que les sucres cessent de l'être. Notons également que dans l'études de Handa (1969), la teneur en chlorophylle *a* diminuait en même temps que celle des protéines. Les lipides, eux, semblaient dégradés de manière graduelle et indépendante. La hiérarchie de dégradation des différentes formes de stockage dépend donc parfois de leur nature. Tous ces éléments soulèvent des questions

quant à la manière dont les microalgues gèrent la dynamique de consommation de leurs réserves, et sur les changements métaboliques qui accompagnent les transitions qui ont pu être observées.

4.6.3. La chrysolaminarine est dégradée lors des premières semaines d'obscurité

La fraction soluble non-réductrice, principalement composée de chrysolaminarine (Caballero et al. 2016), a été la seule à évoluer de manière importante. Nos données suggèrent que la majeure partie de cette fraction a été dégradée avant la fin du premier mois d'obscurité, pour ensuite se stabiliser. Ceci fait écho aux observations du paragraphe précédent. Des études ont montré que la nuit, les diatomées peuvent consommer la majeure partie de la fraction soluble des carbohydrates synthétisés lorsque la photosynthèse a été active le jour précédent (Caballero et al. 2016 ; Hitchcock 1980 ; Vårum et al. 1986). Dans notre cas, la chrysolaminarine semble avoir été consommée plus lentement. La tendance observée concorde également avec ce qui a été observé dans le troisième chapitre. En effet, de nombreux gènes de dégradation de la chrysolaminarine, de la glycolyse cytoplasmique et de la voie des pentoses phosphates, n'ont été sous-régulés qu'à partir des jours 16 ou 31 de l'acclimatation à l'obscurité, alors que le reste du métabolisme des carbohydrates l'a été à partir du jour 6.

On peut conclure que la dégradation de la chrysolaminarine fait partie de la stratégie de survie à l'obscurité de *F. cylindrus*. Cependant, elle ne représentait qu'une fraction extrêmement limitée du carbone cellulaire total à T0, et moins de 10% du carbone perdu par les cellules lors du premier mois d'obscurité. Les carbohydrates ne semblent donc pas jouer un rôle prépondérant dans la survie à long terme. Il faut cependant garder à l'esprit que nos conditions d'acclimatation expérimentales diffèrent des conditions vécues par les diatomées polaires avant la nuit polaire. Il se peut que, dans leur environnement naturel, les diatomées accumulent davantage de chrysolaminarine avant la nuit polaire, et que la chrysolaminarine joue, par conséquent, un rôle bien plus important que dans notre expérience. Notons aussi que le protocole d'extraction des carbohydrates a semblé moins efficace avec *F. cylindrus* qu'avec *P. tricornutum*, qui avait été utilisée pour sa mise au point. On ne peut donc pas exclure que les teneurs en carbohydrates de *F. cylindrus*, très faibles en comparaison de ce qui est normalement rapporté dans la littérature et de ce qui a été mesuré chez *P. tricornutum* avec le même protocole, aient été sous-estimées.

4.6.4. Lipides

Contrairement aux autres compartiments macromoléculaires, la plupart des lipides membranaires (MGDG, PL + GL) mesurés ici n'ont pas diminué lors des premiers jours d'obscurité, alors que certaines cellules se divisaient. Ce peut être expliqué par le fait que les cellules en division synthétisaient de nouveaux composants membranaires. Les résultats du Chapitre 3 suggèrent que pendant cette période, FASII était toujours active et que *F. cylindrus* a dû puiser, au moins en partie, dans d'autres compartiments que les lipides pour la synthèse de lipides membranaires. Ils sont ensuite restés stables suggérant qu'ils n'ont pas été sollicités durant le reste de la DA.

Les TAG présents à T0 ont majoritairement été dégradés durant la première semaine. Leur oxydation a pu participer à générer de l'énergie, et le recyclage de leur FA à la synthèse de lipides membranaires. Les données disponibles ne nous permettent cependant pas de savoir à quelle hauteur. Notons que les TAG ne représentaient cependant qu'une faible portion du carbone total et que le stock présent initialement n'a visiblement pas joué de rôle important dans la survie à long terme. Curieusement, dans la suite de l'acclimatation, ils ont été lentement accumulés. Ceci vient supporter les données de RNAseq qui suggéraient que la synthèse de TAG *via* la voie eucaryotique était toujours active à l'obscurité. La forte sous-régulation de FASII passé les premiers jours d'obscurité suggère que ces TAG ont été produits non pas à partir d'acides gras nouvellement synthétisés, mais grâce à un remodelage du contenu lipidique. Notons, que lors d'expériences préliminaires, l'analyse de la composition en acides gras des TAG a révélé qu'ils étaient pour la majorité longs de 16 C à T0, et de 18 C au bout de 27 jours d'obscurité. Ici cependant, aucune des grandes classes de lipides mesurées ne semblait diminuer en parallèle de la synthèse des TAG. La source ayant servi à la synthèse de TAG reste donc inconnue. L'analyse de l'évolution des espèces des autres fractions lipidiques donnera peut-être d'avantage d'indices sur la nature des sources utilisées pour la synthèse des TAG à l'obscurité

La dynamique suivie par les TAG au-delà de la première semaine d'obscurité est par ailleurs surprenante. L'accumulation de TAG a par le passé été suggérée par l'accumulation de corps cellulaires ressemblants à des gouttelettes lipidiques lors de la

métamorphose de diatomées en cellules de résistance (Anderson 1975 ; Doucette et Fryxell 1983). Cependant, ceci se produisait lors de la métamorphose des cellules (i.e., premières semaines d'obscurité). Par la suite, les lipides étaient dégradés et ne continuaient pas de s'accumuler comme nous l'avons observé ici.

La teneur en TAG mesurée n'a pas montré la tendance suivie par les estimations des lipides neutres effectuées par CMF. Chez les diatomées, la très grande majorité des lipides neutres sont sous formes de TAG. Bien que des études aient montré que les monoacylglycérols (MAG), diacylglycérols (DAG) et acides gras libres (FFA) pouvaient parfois représenter une portion relativement importante des lipides neutres chez certaines espèces (Schaub et al. 2017 et références qui y sont mentionnées ; Artamonova et al. 2017), il apparaît peu probable que la majorité de la variation de la teneur en lipides neutres mesurée grâce au BODIPY puisse être attribuable, chez une diatomée, aux MAG, DAG et FFA. Il est donc possible que les données de BODIPY révèlent une diminution de la teneur d'autres lipides neutres comme certains stéroïdes. Cependant, parmi les nombreuses études ayant utilisé le BODIPY 505/515, nous n'en avons trouvé aucune évoquant cette possibilité.

Il n'y a, à notre connaissance, aucun rapport faisant état d'une diminution aussi drastique du contenu cellulaire en SQDG que celle observée ici lors de la première semaine d'obscurité. Les SQDG ne sont pas considérés comme une source d'énergie majeure et ne représentaient qu'une faible fraction du carbone des cellules. Ils représentent en revanche chez *Chlamydomonas* (algues vertes) une source de soufre dans certaines conditions (Sugimoto et al. 2010). Les SQDG auraient pu éventuellement être recyclés pour réinvestir le soufre dans certains acides aminés (cystéine, méthionine) ou pour produire les stérols sulfates par exemple. Cependant, ces derniers ont été synthétisés après la première semaine d'obscurité, alors que les SQDG ont eux été dégradés avant la première semaine.

L'étude de Gallo et al. (2017) a démontré que les stérol sulfates pourraient jouer un rôle de messenger important dans une population de diatomées vieillissante de *Skeletonema marinoi* en provoquant l'apoptose des cellules. Ici, l'augmentation de cholestérol sulfate et de desmostérol sulfate à l'obscurité pourrait suggérer que ces métabolites jouent également un rôle dans le contrôle de la croissance de *F. cylindrus* à l'obscurité. Notons que les données de RNAseq montrent que les transférases de soufre identifiées dans le

génomique de *F. cylindrus* n'étaient pas surexprimées passé les trois premiers jours d'obscurité (données non présentées), y compris celle étant potentiellement spécifique au cholestérol (Gallo et al. 2018). Les enzymes de la synthèse du cholestérol étaient, elles, sous-régulées.

4.6.5. La dégradation des protéines intervient dans un second temps

Durant les 12 premières heures de l'acclimatation à l'obscurité, une légère augmentation de la teneur en protéines a été enregistrée. Différentes études ont montré que, la nuit, les diatomées peuvent consommer une partie de leurs réserves de carbohydrates et de lipides, pour continuer de soutenir la synthèse des protéines nécessaires au fonctionnement de la cellule, et pour anticiper l'activité du jour suivant (Cuhel et al. 1984 ; Granum et Mykkestad 2001 ; Mirón et al. 2003).

Passées les trois premiers jours d'obscurité, les protéines n'ont semblé évoluer de manière significative qu'après un mois d'obscurité. Malheureusement, aucune mesure n'ayant pu être effectuée entre les jours 27 et 54 de l'acclimatation à l'obscurité, il n'est pas possible de connaître précisément la variation des protéines durant cette période. Une consommation excessive des protéines, forme de biomasse dite « fonctionnelle », compromettrait la reprise de l'activité au retour à la lumière. Il n'est donc pas surprenant qu'elles ne semblent avoir été dégradées qu'après l'épuisement de la chrysolaminarine, conformément aux observations de Handa (1969) et Popels et al. (2007). Ceci est, encore une fois, cohérent avec les fonctions de ces deux formes de molécules.

La dégradation des protéines, comme le suggéraient les données de RNAseq du troisième chapitre, a donc bien participé à la survie. Nous n'avons malheureusement pas accès à la composition en acides aminés précise et nous ne pouvons donc pas confirmer le possible rôle prépondérant des BCAA et des acides aminés aromatiques suggéré par les données de RNAseq. Il nous est par ailleurs impossible de connaître avec certitude les familles de protéines dégradées. Cependant, la nette diminution du contenu en Rubisco et en PsbA observée en parallèle de celle du contenu en protéines totales, suggère fortement qu'une partie du chloroplaste des cellules a pu être recyclé. Schlie et al. (2011) et Karsten et al. (2012) ont observé une réduction drastique de la taille des chloroplastes de diatomées polaires soumises à des périodes d'obscurité prolongées. Chez les plantes supérieures, les

protéines photosynthétiques, et notamment la Rubisco, peuvent représenter une source d'énergie importante lors de stress et lors de périodes d'obscurité entraînant un épuisement des réserves de sucres (Hirota et al. 2018). Le recyclage partiel des chloroplastes (i.e., de certains de ses composants, par opposition à la chlorophagie, qui entraîne la dégradation de chloroplastes entiers, Izumi et al. 2017) est effectué *via* un système de transport de type autophagique (He et al. 2014 ; Ishida et al. 2008). Les vésicules permettant le transport d'éléments chloroplastiques sont particulièrement riches en Rubisco. Par ailleurs, chez les plantes en C₃, cette dernière est particulièrement riche en BCAA et en acides aminés aromatiques (Hirota et al. 2018), qui sont parmi les acides aminés les plus énergétiques (Hildebrandt et al. 2015). Notons que d'autres processus pouvant participer à la dégradation sélective d'éléments du chloroplaste lors de stress ont été identifiés chez les plantes (Zhuang et Jiang 2019).

La Rubisco des diatomées est l'une des plus efficaces du monde végétal. Associée au système de concentration du CO₂ que possèdent les diatomées, elle permet aux microalgues phytoplanctoniques tempérées de n'en synthétiser que très peu par rapport à leur contenu protéique total (valeurs w/w comprises entre 1 et 5% en phase de croissance exponentielle ; Losh et al. 2013). Plus récemment, Young et al. (2015) ont en revanche montré que la Rubisco d'une souche de *F. cylindrus* (CCMP1102, souche synonyme de celle utilisée pour nos travaux) ainsi que celle trouvée chez une communauté de microalgues polaires étaient caractérisées par des taux de carboxylation bien plus faibles que ceux des Rubisco d'espèces tempérées. Pour pallier cette limitation, les microalgues polaires synthétisent la Rubisco en bien plus grande quantité (Young et al. 2015). Dans notre cas, la conversion des quantités de Rubisco en unités de masse a permis d'établir qu'elle représentait entre 10 et 20% du contenu en protéines totales au cours de la DA, une proportion conséquente, qui s'inscrit dans la même gamme que celle rapportée par Young et al. (2015).

L'analyse des séquences des sous-unités de la Rubisco de diatomées polaires publiées par Valegård et al. (2018) a révélé que ces protéines étaient un peu moins riches en BCAA et acides aminés aromatiques que celles des plantes en C₃ (environ 36,11% contre 45% ; Hirota et al. 2018). *F. cylindrus* possède donc un réservoir de Rubisco important qui, même s'il est énergétiquement moins riche que celui d'autres organismes photosynthétiques, est susceptible de lui permettre de faire face à de périodes d'obscurité

prolongées, tant que sa taille n'est pas réduite au point d'empêcher la reprise d'activité. Notons qu'une série d'observations de cellules de *F. cylindrus* effectuées au microscope électronique après deux mois d'obscurité n'ont révélé aucune altération de la structure des chloroplastes et des thylakoïdes (données non présentées).

Enfin, il est difficile de donner une explication à l'augmentation du contenu cellulaire en protéines photosynthétiques observée jusqu'à la fin du premier mois d'expérience. Elle est surprenante compte tenu du fait que les cultures étaient privées de lumière depuis déjà deux semaines lorsque l'augmentation a débuté. Nous n'avons pas réussi à trouver dans la littérature d'observations similaires.

4.6.6. Pigments, peu probablement une source alternative d'énergie

Chez certains organismes photosynthétiques, une partie du contenu pigmentaire, et la chlorophylle plus particulièrement, peut être dégradée à l'obscurité. Ceci serait engendré par la nécessité, à certains stades de croissance, de réduire la quantité de chlorophylle libre qui peut entraîner la formation de ROS lorsque la lumière est à nouveau disponible (Hörtensteiner 2006). Une autre raison est la possibilité, une fois la chlorophylle dégradée, de recycler les protéines riches en azote (et en carbone) qui se lient à elle, comme les protéines du PSII par exemple (Hörtensteiner 2006). Ainsi, on a pu observer que, chez *A. thaliana* maintenue durablement à l'obscurité, la chlorophylle est dégradée parallèlement à d'autres molécules riches en carbone, permettant de générer un surplus d'énergie (Araújo et al. 2010 ; Slot et Kitajima 2015).

Chez *F. cylindrus*, les pigments ne représentent qu'une faible part du carbone de la cellule. Cependant, la diminution linéaire observée pour certains d'entre eux dont la chlorophylle *a*, suggère qu'ils ont pu être partiellement recyclés durant l'acclimatation à l'obscurité, mais qu'ils n'ont pas pu constituer eux-mêmes une source d'énergie majeure. Notons que si les voies métaboliques des éléments constitutifs des protéines, sucres et lipides, ainsi que les bilans énergétiques associés, sont relativement bien connus chez les diatomées, l'existence de potentielles voies de dégradation des pigments demeurent obscures (voir Hörtensteiner et Kräutler 2011). Elles n'ont donc pas pu être abordées dans le troisième chapitre.

4.7. Conclusion

Cette étude avait pour but d'estimer l'importance relative des grands compartiments de carbone intracellulaire pour la survie de *F. cylindrus* à l'obscurité prolongée. Les données ont permis de confirmer que la consommation des réserves carbonées, associée au ralentissement du métabolisme, est au cœur de la stratégie de survie de *F. cylindrus*. Alors que les TAG et la chrysolaminarine ont été en grande partie dégradés dans leur quasi-totalité lors de la première semaine et du premier mois d'obscurité respectivement, les protéines ont été mobilisées dans un second temps. Notons qu'une consommation d'environ un tiers du stock de protéines n'a pas empêché *F. cylindrus* de reprendre sa croissance une fois ramenée à la lumière. Les données suggèrent également que certains éléments du chloroplaste pourraient être une source d'énergie de secours importante après l'épuisement des sucres. Cependant, l'absence de modification structurelle des chloroplastes constatée au microscope électronique à transmission va, avec la stagnation des quantités de lipides membranaires au-delà de la première semaine d'obscurité, à l'encontre de cette hypothèse.

La portée de cette étude est malheureusement limitée par différents facteurs (contamination, nombre limité de points de mesure et de répliques techniques) qui ont parfois pu introduire un biais et une variabilité interdisant une interprétation des résultats aussi solide qu'escomptée. Les données suggèrent clairement que certaines fractions macromoléculaires ont été sous-estimées puisque les quantités de carbone contenue dans les lipides, protéines, carbohydrates et pigments n'ont pas dépassé 50 % du carbone total. Etablir un bilan énergétique précis s'est donc avéré impossible.

4.8. Méthodes supplémentaires

4.8.1. Fréquence d'échantillonnage

Tableau 4.1. Fréquence d'échantillonnage des différents paramètres étudiés. Le nombre d'échantillonnages total réalisé pour chaque paramètre est indiqué dans la dernière colonne.

Paramètres		Temps (jours)																				Nombre échantillonnages total		
		0	0,02	0,08	0,25	0,5	1	3	5	7	11	14	18	22	27	29	35	40	41	42	46		49	53
CMF	Sans addition de colorant	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x		x	x	x	20
	BODIPY (lipides neutres)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x			x		x	x	x	19
	SYTOX Green (viabilité)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x			x	x	x	x	x	21
	SYBR Green (axénie)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	22
Concentration et volume cellulaires (Multisizer)		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x		x	x	x	20
Carbone organique particulaire		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x			x		x		x	18	
Respiration		x	x	x	x	x	x		x		x	x		x					x				x	13
Protéines		x	x	x	x	x	x		x		x		x	x		x			x		x		x	15
Lipides		x					x		x		x			x					x				x	7
Carbohydrates		x							x					x									x	4
Pigments		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x				x		x		x	18

4.8.2. Tampon d'extraction des protéines

Tableau 4.2. Composition détaillée du tampon d'extraction des protéines 1 X

Produits	Concentration finale
TRIS Base ^a	28.1 mM
TRIS HCl ^b	21.1 mM
LDS ^c	2%
Glycérol	10%
EDTA	0.5 mM
Pefabloc ^d	0.4 mM

^a Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

^b Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate

^c lithium dodécyl sulfate

^d 4-(2-aminoéthyl)-benzène-sulfonyl fluoride (inhibiteur de protéinase)

Conclusion

Le travail de cette thèse a été réalisé dans le cadre de *Green Life in the Dark*. Cet ambitieux projet est l'un des tous premiers qui a cherché à élucider les stratégies de survie des diatomées à la nuit polaire en utilisant la complémentarité d'approches physiologique, biochimique et génétique.

Chapitre 1. Une approche unicellulaire innovante

Les différentes acclimations à l'obscurité prolongée auxquelles a survécu la souche de *Fragilariopsis cylindrus* étudiée ont une fois de plus illustré la capacité des diatomées polaires à survivre privées de lumière durant plusieurs mois. Le premier chapitre de cette thèse, en s'appuyant sur des techniques de mesures unicellulaires (i.e., cytométrie en flux) présente ainsi une approche novatrice dans l'étude de la physiologie des diatomées soumise à une période d'obscurité prolongée. En permettant de prendre en compte la variabilité individuelle, cette approche pallie certaines des limitations imposées par les techniques de physiologie utilisées par le passé. Ceci est d'autant plus intéressant que le stress imposé par l'absence de lumière sur une très longue période a favorisé un processus de différenciation au sein de la population initiale. On a en effet pu observer l'émergence de populations avec des propriétés et des potentiels de survie distincts. Le travail accompli pourrait être étoffé *via* l'utilisation de nouveaux marqueurs fluorescents. Ces derniers pourraient améliorer notre capacité à étudier les caractéristiques des différentes populations apparues sous l'influence du traitement, et ainsi augmenter nos chances d'identifier les facteurs exerçant un contrôle sur la viabilité des cellules. En premier lieu, l'utilisation de marqueurs caractérisés par des propriétés spectrométriques différentes permettrait de combiner les marquages. Par exemple, un marquage combiné de l'ADN et des lipides neutres permettrait de distinguer les populations P1 et P3, et de suivre séparément leur contenu en lipides neutres. En second lieu, d'autres types de marqueurs pourraient être utilisés pour inclure de nouveaux paramètres d'études. Il existe par exemple des techniques permettant de mesurer l'activité d'enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des carbohydrates (Chandrasekaran et al. 2013). D'autres

marqueurs encore permettent de détecter une activité autophagique ou de mesurer l'activité des lysosomes (Warnes 2013). Le nombre grandissant de rapporteurs de processus biologiques de plus en plus divers offre des possibilités presque illimitées.

Pour terminer, la cytométrie en flux pourrait être associée à d'autres techniques. Isoler les différentes populations avec un cytomètre trieur pourrait par exemple permettre d'étudier la régulation de l'expression de leur matériel génétique, leur composition macromoléculaire respective, ou encore de les observer séparément au microscope. L'intérêt réside encore une fois dans la combinaison d'approches complémentaires, mais également dans le fait de pouvoir étayer les données de cytométrie en flux présentées dans le Chapitre 1. En effet, la principale limitation de ces dernières réside dans le fait qu'elles ne fournissent que des proxys des paramètres étudiés. La possibilité de trier les cellules pour les observer séparément a été explorée en collaboration avec Dominique Marie et Sophie Le Panse, responsables respectivement des plateformes de cytométrie et de microscopie électronique de la Station Biologique de Roscoff (France), et mérite d'être approfondie dans le futur.

Chapitre 2. Métabolisme du carbone

Le second chapitre de cette thèse a permis de faire une revue bibliographique du métabolisme du carbone des diatomées, et de reconstruire, au moins partiellement, les voies importantes du métabolisme du carbone de *F. cylindrus* en identifiant et en compilant les gènes candidats du génome publié en 2017 par Mock et collaborateurs. Au-delà des gènes déjà identifiés par d'autres études, la sélection des gènes a principalement reposée sur des BLASTp. Elle ne saura se passer d'analyses plus approfondies pour confirmer l'identité de certains gènes mais pourra servir de point de départ aux études futures.

Chapitre 3. Première analyse du métabolisme du carbone par transcriptomique

La troisième partie de cette thèse a permis de générer, à la suite du travail de Kennedy et al. (2019), une des premières séries de données biomoléculaires acquises dans ce champ de recherche. Notre travail s'est concentré sur le métabolisme du carbone qui était au cœur des objectifs de cette thèse. Il a mis en lumière l'implication de différentes voies de dégradation des compartiments de carbone, et notamment la voie catabolique des BCAA (et possiblement de la tyrosine et de la phénylalanine), dans la stratégie de survie de *F. cylindrus*. L'utilisation des BCAA comme source d'énergie alternative est un processus largement répandu dans les périodes de stress énergétique chez de nombreux organismes. Cependant, l'importance des BCAA dans le métabolisme des diatomées n'a, jusqu'à présent, bénéficié que de peu d'attention. Il sera judicieux d'en tenir davantage compte dans le futur.

Alors que les données transcriptomiques confortent le fait, comme attendu, que le métabolisme d'un organisme photosynthétique soumis à une obscurité prolongée est grandement réduit, il est en revanche surprenant de constater le faible nombre de voies métaboliques qui ont été surexprimées sur le long terme à l'obscurité. Retenons que la régulation de la transcription n'est pas le seul mécanisme *via* lequel l'expression du génome peut être modulée, et que, par conséquent, les modifications ne reflètent pas nécessairement avec fidélité les variations de l'activité du métabolisme. Les résultats obtenus devront donc être confirmés et approfondis en utilisant des techniques alternatives et/ou complémentaires comme la RT-qPCR (réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel) ou la génération de lignes mutantes.

Dans le cadre d'une acclimatation à l'obscurité, les premières heures de stress sont probablement décisives dans la mise en place des processus permettant une acclimatation optimale aux nouvelles conditions. Dans notre expérience, les premiers jours d'acclimatation ont systématiquement été ponctués, chez certaines cellules, par l'achèvement du cycle cellulaire entamé avant le début du traitement. Il est cependant difficile d'estimer les répercussions de ce phénomène, que ce soit sur les données d'expression différentielle ou sur la composition des grands compartiments carbonés. Puisque les cellules en phase de division étaient largement minoritaires, on peut penser que leur influence sur les paramètres mesurés l'était aussi, auquel cas les variations observées ne seraient en grande partie que le reflet de l'acclimatation à l'obscurité. Cependant, il est également possible que l'activité des cellules en phase de division ait

été nettement plus élevée que celle des cellules s'acclimatant à l'obscurité, lesquelles sont *a priori* caractérisées par une diminution drastique de leur métabolisme. On ne peut donc pas exclure que la dynamique de nos données reflète, au moins en partie, la contribution des cellules se divisant. Cela vient donc questionner la validité des résultats obtenus lors des premiers jours des expériences, notamment en ce qui concerne la régulation de la transcription du génome. Il sera donc judicieux à l'avenir de tenter de s'affranchir de ce biais, par exemple en acclimatant les cultures à un cycle jour-nuit plutôt qu'à une lumière continue.

L'analyse des données de transcriptomique a suscité certaines hypothèses intéressantes, comme la possible implication de l'autophagie, hypothèse que de futures études pourront peut-être approfondir. Une expérience aussi particulière que la nôtre imposent de nombreux défis (durée, coût) qui s'accompagnent de risques non négligeables (contamination, mortalité des cultures). Un ratio risques/bénéfices trop important pourrait donc, dans certains cas, décourager l'exploration d'hypothèses suggérées par les premières expériences. Approfondir l'étude des différentes populations observées dans le premier chapitre, par exemple, nécessiterait de remettre en place des expériences coûteuses d'une durée de plusieurs mois, et ne peuvent donc être envisagées à la légère. Mais puisque les cellules stabilisent assez rapidement leur métabolisme à l'obscurité, on peut s'attendre à ce qu'une majorité de processus clés impliqués dans la survie se mettent en place durant les premiers jours ou premières semaines d'expériences. L'occurrence de l'autophagie par exemple, bien qu'elle ne soit appuyée que par quelques tendances observées dans les données d'expression différentielle, pourrait donc faire l'objet d'une étude ciblée plus courte.

Chapitre 4. Dynamique des réservoirs cellulaires de carbone

Le troisième volet de cette thèse présente une des descriptions les plus complètes à ce jour de la dynamique des principaux compartiments de carbone chez une diatomée soumise à une obscurité prolongée. Nos analyses ont confirmé que la stratégie de survie reposait en partie sur la dégradation d'une fraction des réserves énergétiques cellulaires accumulées avant la période d'obscurité. Tandis que les TAG et la chrysolaminarine (lipides et carbohydate de réserve chez les diatomées) semblent être mobilisés et

consommés en grande partie au cours des premières semaines d'acclimatation, les protéines (biomasse fonctionnelle) semblent, elles, jouer un rôle primordial à plus long terme, une fois la chrysolaminarine épuisée. L'hypothèse selon laquelle le déclenchement de la consommation des protéines est régulée par l'épuisement la chrysolaminarine reste cependant à confirmer. Nos résultats démontrent que les cellules de *F. cylindrus* parviennent à survivre et à reprendre leur croissance après une longue période d'obscurité en mettant en œuvre une stratégie d'utilisation des stocks de molécules impliquées dans leur fonctionnement. Notamment, la diminution des pigments, des protéines photosynthétiques, et de certains lipides associés à l'appareil photosynthétique suggère qu'une importante source de substrats destinés aux voies cataboliques pourraient provenir des chloroplastes. Davantage d'observations par microscopie électronique à transmission, effectuées en ce moment au sein du projet, permettront d'explorer cette éventualité en analysant les variations de la structure des chloroplastes.

Le travail effectué dans ce quatrième chapitre a malheureusement souffert de certaines limitations de nature expérimentale : contamination des cultures, variabilité importante de certaines mesures, fréquence d'échantillonnage limitée par les volumes nécessaires aux analyses. Les futures études, en plus de se baser sur les résultats obtenus ici pour approfondir le travail effectué, ne pourront se passer de réaliser à nouveau certaines mesures pour confirmer nos hypothèses. L'établissement d'un bilan énergétique exhaustif était l'un des objectifs de ce chapitre, mais le manque de robustesse de certaines données ne nous ont pas permis d'y parvenir, même si les importances respectives des différents compartiments de carbone, sources potentielles d'énergie et de métabolites, ont pu être estimées. Les futurs travaux devront, dans la mesure du possible, approfondir le travail effectué en traduisant les changements observés en devises énergétiques. Notons que les mesures des différents éléments ont été faites avec des méthodes toutes différentes les unes des autres, chacune d'entre elle pouvant être soumise à ses propres limitations/approximations.

L'étude de « l'homéostasie énergétique » des diatomées polaires à l'obscurité pourrait également être abordée d'un point de vue davantage mécanistique. Les mécanismes permettant la mise en place de dormances propres à différents types d'organismes ont été largement étudiés par le passé, que ce soit chez les microorganismes unicellulaires ou chez des organismes nettement plus complexes comme certains mammifères. En

revanche, les conditions nécessaires à la survie, au-delà de la nécessité d'un apport énergétique, ont été peu étudiées. Le premier chapitre de cette thèse a montré que la survie de *F. cylindrus* à l'obscurité dépendait non seulement de sa capacité à survivre sans lumière, mais aussi de son aptitude à redémarrer sa croissance une fois la lumière revenue. Nous avons aussi pu mettre en évidence deux causes de mortalité dues à l'obscurité, la première probablement inhérente à un épuisement des réserves énergétiques, la seconde à un potentiel arrêt anticipé du mécanisme de dormance. Les résultats du premier chapitre illustrent bien que les cellules doivent satisfaire différentes conditions pour survivre à la nuit polaire. Parmi les fonctions dont le maintien semble indispensable et nécessitent un apport d'énergie significatif, on peut citer (1) le renouvellement des protéines impliquées dans les voies cataboliques fournissant l'énergie et les métabolites nécessaires aux autres fonctions indispensables à la cellule, (2) la synthèse de molécules de signal impliquées dans la mise en place et le maintien de la dormance, (3) la respiration mitochondriale, source *a priori* indispensable d'ATP, (4) les systèmes de transport des composés cellulaires, et (5) le maintien de l'intégrité des membranes grâce à une composition en lipides adaptée et au maintien des gradients transmembranaires. En ce qui concerne la reprise d'activité consécutive au retour à la lumière, on peut évoquer : (1) la capacité de détecter les photons, médiée par des photorécepteurs chez les diatomées, (2) l'inhibition des processus engendrés par les molécules de signal impliquées dans la dormance, (3) l'adaptation au stress lumineux (i.e., synthèse ou maintien suffisant du contenu de xanthophylles, capacité à convertir DD en DT, et élimination et/ou réduction des ROS), et (4) la photosynthèse permettant d'exploiter la lumière et permettant une reprise de la croissance, possiblement épaulée par les réserves de carbone restantes à la fin de la période d'obscurité. La modélisation de ces processus et de leur coût énergétique pourrait éventuellement permettre, dans le futur, d'anticiper le devenir d'une cellule en connaissant son état physiologique.

Pistes de recherche alternatives

Le travail effectué ici a porté sur l'acclimatation à l'obscurité. Cependant, le projet qui en est à l'origine s'inscrit dans un contexte nettement plus large, celui de la nuit polaire. L'approche choisie ici (i.e., conditions contrôlées en laboratoire, limitation du nombre de paramètres variant avec le traitement) pour étudier la survie des diatomées à la nuit polaire

n'est évidemment pas suffisante pour cerner toute la question. Le travail à abattre reste colossal, et je propose ici quelques pistes qu'il me semble important de considérer dans le futur.

Espèces étudiées

La première chose à laquelle on peut naturellement penser est l'étroitesse (imposée par des limites logistiques inhérentes à tous projets de recherche) du prisme d'espèces ayant représenté le groupe des diatomées dans notre étude : une seule. Il faudra évidemment à l'avenir inclure d'autres espèces, et en priorité certains représentants du groupe des diatomées centriques. Ces dernières, desquelles dérivent les diatomées pennées comme *F. cylindrus*, ont pu évoluer différemment, et pourraient par conséquent posséder des stratégies de survie d'une nature différente. Alors que la formation de spores a rarement été observée chez les diatomées pennées, certaines espèces centriques appartenant notamment aux genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira*, sont par exemple connues pour produire des spores lors de différents types de stress (McQuoid et Hobson 1996). Deuxièmement, on pourrait envisager d'étudier des diatomées caractéristiques de différents habitats. Le fait, entre autres, que *F. cylindrus* soit capable de croître aussi bien attachée à la glace de mer que dans la colonne d'eau en faisait une bonne candidate pour notre étude. Pour aller encore plus loin, on pourrait également envisager d'étudier des diatomées évoluant exclusivement dans la glace, la colonne d'eau, ou encore dans les sédiments.

De nouvelles possibilités s'ouvrent avec l'étude de la nuit polaire sur le terrain

Notre compréhension du fonctionnement des écosystèmes polaires pendant la période hivernale en est encore à ses balbutiements. Du fait de la difficulté d'accès de ces zones (i.e., glace, obscurité totale, conditions météorologiques), leur exploration est périlleuse et nécessite une logistique extrêmement lourde et coûteuse. On a par ailleurs longtemps pensé que cette saison était, d'un point de vue biologique, « morte ». Les équipes de recherche ont donc naturellement concentré leurs efforts sur la période estivale, pendant laquelle la majorité de la production primaire annuelle a lieu. Aujourd'hui, certaines

initiatives, à l'image des campagnes océanographiques organisées depuis une dizaine d'années par Jorgen Berge (Université de Tromsø), ou plus récemment, de l'expédition d'envergure MOSAiC, soulignent la nécessité, si l'on veut comprendre les écosystèmes polaires dans leur globalité, d'enfiler son bonnet pour aller voir ce qui s'y passe en plein hiver. Les travaux publiés jusqu'à aujourd'hui ne se sont malheureusement pas suffisamment penchés sur le devenir des diatomées en hiver. A l'avenir, la multiplication des études menées sur le terrain nous permettra (1) d'étudier avec précision les conditions physico-chimiques caractérisant les trois niches écologiques mentionnées plus haut en hiver afin, par exemple, de reproduire plus fidèlement en laboratoire les conditions abiotiques susceptibles d'exercer un contrôle sur la survie ; (2) d'étudier, de comprendre et d'intégrer une dimension du problème ignorée jusque-là : l'influence des facteurs biotiques (i.e., compétition, symbiose, par exemple) ; (3) de savoir dans quelle(s) niche(s) (et donc quelles conditions) les diatomées qui initient le *bloom* printanier passent préférentiellement l'hiver (i.e., ont le meilleur taux de survie, leur permettant de dominer la production primaire lorsque la lumière revient).

Enfin, les études sur le terrain permettront de définir dans quelle mesure l'hétérotrophie peut aider les diatomées à survivre (qu'elles soient hétérotrophes strictes ou non). La portée des études déjà réalisées sur ce sujet, effectuées majoritairement en laboratoire, sont également limitées par notre ignorance de la qualité et de la quantité des substrats disponibles aux pôles en hiver, ainsi que de la compétitivité des diatomées face aux hétérotrophes stricts vis-à-vis de ces ressources.

Influence des conditions de croissance précédant l'obscurité

Les conditions de croissance des diatomées qui précèdent la nuit polaire dans leur milieu naturel peuvent déterminer dans une grande mesure la nature et la taille des compartiments de carbone ainsi que leur composition macromoléculaire (Sackett et al. 2013 ; Palmisano et Sullivan 1982) et, par conséquent, leur importance relative vis-à-vis de la survie. À l'approche de la nuit polaire, les algues sont notamment confrontées non seulement à une réduction de l'intensité lumineuse (unique paramètre pris en compte dans notre étude), mais aussi à une diminution de la photopériode et de la température, ainsi qu'à des variations de la salinité plus ou moins intenses en fonction de leur localisation

dans la colonne d'eau ou dans la glace. L'étude de l'influence séparée ou combinée de ces paramètres sur les compartiments de carbone permettrait d'améliorer notre compréhension des principaux facteurs qui affectent la survie d'une espèce telle que *F. cylindrus*. Certaines études (Fahl et Kattner 1993 ; Fryxell 1989) ont par exemple suggéré que les communautés polaires trouvées dans la glace pouvaient accumuler de grandes quantités de lipides de réserve (molécules à fort quotient énergétique), alors que dans notre cas, ils ne constituaient qu'une fraction très limitée de la biomasse. Pour que le tableau soit complet, il faudrait aussi considérer la transition « hiver-été ». Le mode de réexposition à la lumière (i.e., intensité, qualité, photopériode, vitesse de réexposition) sera bien entendu au cœur de cette problématique.

Le rôle des molécules de signal, un domaine peu exploré chez les diatomées

Finalement, il serait également nécessaire d'étudier les signaux intracellulaires (et molécules de signal associées) responsables de la gestion d'éventuels points de contrôle clés, notamment lors des transitions « été ⇔ hiver », chose qui n'a jamais été faite. Comme évoqué à la fin du premier chapitre, l'absence de lumière ne peut *a priori* pas être le seul facteur permettant la mise en place des processus impliqués dans la survie à long terme. Il existe un retard (logique) de notre compréhension des microorganismes autotrophes aquatiques, comme les diatomées, vis-à-vis des organismes autotrophes terrestres. L'étude du fonctionnement de nombreuses plantes supérieures bénéficie depuis longtemps des enjeux économiques et sociétaux qu'elles suscitent. On pourra donc puiser dans ses découvertes de nombreuses pistes additionnelles. Chez *A. thaliana* par exemple, l'épuisement des sucres de réserves lors de périodes étendues d'obscurité constitue le signal permettant la mise en place de processus permettant la survie à long terme (comme une augmentation drastique de l'activité de l'autophagie par exemple ; voir Ma et Li 2021). La lumière, de manière plus intuitive, permet d'inverser ces processus. Il serait donc intéressant d'explorer le rôle (de facteur transcriptionnel par exemple) éventuellement joué par les stérols sulfates évoqués dans le quatrième chapitre dans la mise en place de la dormance. A l'instar du rôle possiblement joué par les stérols sulfates dans la gestion de l'obscurité prolongée chez *F. cylindrus*, l'implication d'autres molécules connues pour réguler le métabolisme de certains organismes, comme les phytohormones, certains lipides (sphingolipides et phosphatidylinositol phosphates en

particulier) ou encore l'oxide nitrique, synthétisé par *F. cylindrus* lors de différents types de stress (Kennedy et McMin 2020), pourrait être explorée.

L'étude du mystère de la survie des diatomées à la nuit polaire a, en définitive, encore de belles années devant elle.

Bibliographie

- Abida, H. 2015. Characterization of lipid metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Thèse de Doctorat. Université Paris-Saclay (ComUE).
- Adams, E., & Frank, L. 1980. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annual review of biochemistry*, 49(1): 1005-1061.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. 2002. Chromosomal DNA and its packaging in the chromatin fiber. [Eds.] *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland science, New York. USA, pp. 198-216.
- Allen, A.E., LaRoche, J., Maheswari, U., Lommer, M., Schauer, N., Lopez, P.J., ... & Bowler, C. 2008. Whole cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* to iron starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30): 10438-10443.
- 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): 203207.
- AL-Quraan, N.A. 2015. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen species under UV treatments: insight from *Arabidopsis thaliana* calmodulin mutants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(4): 86.
- Álvarez, C., García, I., Moreno, I., Pérez-Pérez, M.E., Crespo, J.L., Romero, L.C., and Gotor, C. 2012. Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(11): 4621-4634.
- Anderson, O.R. 1975. The ultrastructure and cytochemistry of resting cell formation in *Amphora coffeaeformis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 11(3): 272-281.
- Anderson, O.R. 1976. Respiration and photosynthesis during resting cell formation in *Amphora coffeaeformis* (Ag.) Kutz. *Limnology and Oceanography*, 21(3): 452-456.
- Antia, N.J. 1976. Effects of temperature on the darkness survival of marine microplanktonic algae. *Microbial ecology*, 3(1): 41-54.
- Araújo, W.L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T.R., Tohge, T., Krahnert, I., ... & Fernie, A.R. 2010. Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Cell*, 22(5): 1549-1563.
- Araújo, W.L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., & Fernie, A.R. 2011. Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in plant science*, 16(9): 489-498.

- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., ... & Brzezinski, M.A. 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306(5693): 79-86.
- Aronsson, H., Schöttler, M.A., Kelly, A.A., Sundqvist, C., Dörmann, P., Karim, S., and 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.
- Arrigo, K.R., & van Dijken, G.L. 2004. Annual cycles of sea ice and phytoplankton in Cape Bathurst polynya, southeastern Beaufort Sea, Canadian Arctic. *Geophysical Research Letters*, 31(8).
- Artamonova, E.Y., Svenning, J.B., Vasskog, T., Hansen, E., & Eilertsen, H.C. 2017. Analysis of phospholipids and neutral lipids in three common northern cold water diatoms: *Coscinodiscus concinnus*, *Porosira glacialis*, and *Chaetoceros socialis*, by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, 29(3): 1241-1249.
- Ashraf, M.F.M.R., & Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2): 206-216.
- Aslam, S.N., Strauss, J., Thomas, D.N., Mock, T., & Underwood, G.J. 2018. Identifying metabolic pathways for production of extracellular polymeric substances by the diatom *Fragilariopsis cylindrus* inhabiting sea ice. *The ISME journal*, 12(5): 1237-1251.
- Bai, X., Song, H., Lavoie, M., Zhu, K., Su, Y., Ye, H., ... & Qian, H. 2016. Proteomic analyses bring new insights into the effect of a dark stress on lipid biosynthesis in *Phaeodactylum tricornerutum*. *Scientific reports*, 6(1): 1-10.
- Baldisserotto, C., Ferroni, L., Moro, I., Fasulo, M.P., & Pancaldi, S. 2005. Modulations of the thylakoid system in snow xanthophycean alga cultured in the dark for two months: comparison between microspectrofluorimetric responses and morphological aspects. *Protoplasma*, 226(3-4): 1251-1255.
- Barros, J.A., Cavalcanti, J.H.F., Medeiros, D.B., Nunes-Nesi, A., Avin-Wittenberg, T., Fernie, A.R., & Araújo, W.L. 2017. Autophagy deficiency compromises alternative pathways of respiration following energy deprivation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 175(1): 62-76.
- Basu, S., Patil, S., Mapleson, D., Russo, M.T., Vitale, L., Fevola, C., ... & Montresor, M. 2017. Finding a partner in the ocean: molecular and evolutionary bases of the response to sexual cues in a planktonic diatom. *New Phytologist*, 215(1): 140-156.
- Bender, S.J., Durkin, C.A., Berthiaume, C.T., Morales, R.L., & Armbrust, E. 2014. Transcriptional responses of three model diatoms to nitrate limitation of growth. *Frontiers in Marine Science*, 1, 3.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340(4): 783-795.

- Bennoun, P. 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(14): 4352-4356.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. 2003. Biochemistry, vol. W.H. Freeman and company, New York.
- Bhaduri, S., Zhang, H., Erramilli, S., & Cramer, W.A. 2019. Structural and functional contributions of lipids to the stability and activity of the photosynthetic cytochrome b6f lipoprotein complex. *Journal of Biological Chemistry*, 294(47): 17758-17767.
- Biernacki, C., Celeux, G., Govaert, G. 2000. Assessing a mixture model for clustering with the integrated completed likelihood. *IEEE T. Pattern Anal.* 22: 719-725.
- Biersmith, A., & Benner, R. 1998. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. *Marine Chemistry*, 63(1): 131-144.
- Block, A., Widhalm, J.R., Fatihi, A., Cahoon, R.E., Wamboldt, Y., Elowsky, C., ... & Basset, G.J. 2014. The origin and biosynthesis of the benzenoid moiety of ubiquinone (coenzyme Q) in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(5): 1938-1948.
- Booth, B.C., & Horner, R.A. 1997. Microalgae on the Arctic Ocean Section, 1994: species abundance and biomass. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 44(8): 1607-1622.
- Booth, B.C., Larouche, P., Bélanger, S., Klein, B., Amiel, D. & Mei, Z.P. 2002. Dynamics of *Chaetoceros socialis* blooms in the North Water. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(22): 5003-5025.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., & Wijffels, R.H. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124: 217-226.
- Bricaud, A., Bédhomme, A. L., & Morel, A. 1988. Optical properties of diverse phytoplanktonic species: experimental results and theoretical interpretation. *Journal of plankton research*, 10:851-873.
- Broddrick, J.T., Du, N., Smith, S.R., Tsuji, Y., Jallet, D., Ware, M.A., ... & Allen, A.E. 2019. Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *New Phytologist*, 222(3): 1364-1379.
- Bunt, J.S., & Lee, C.C. 1972. Data on the composition and dark survival of four sea-ice microalgae. *Limnology and Oceanography*, 17(3): 458-461.
- Burch, A.R., & Franz, A.K. 2016. Combined nitrogen limitation and hydrogen peroxide treatment enhances neutral lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Bioresource technology*, 219: 559-565.
- Caballero, M.A., Jallet, D., Shi, L., Rithner, C., Zhang, Y., & Peers, G. 2016. Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal research*, 20: 180-188.

- Caldana, C., Degenkolbe, T., Cuadros-Inostroza, A., Klie, S., Sulpice, R., Leisse, A., ... & Hannah, M.A. 2011. High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of *Arabidopsis* to eight environmental conditions. *The Plant Journal*, 67(5): 869-884.
- Calder, P.C., & Yaqoob, P. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*, 35(3): 266-272.
- Cárdenas, M.L., Cornish-Bowden, A., & Ureta, T. 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1401(3): 242-264.
- Carreto, J.I., & Carignan, M.O. 2011. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine drugs*, 9(3): 387-446.
- Chandrasekaran, A., Deng, K., Koh, C.Y., Takasuka, T., Bergeman, L.F., Fox, B.G., ... & Singh, A.K. 2013. A universal flow cytometry assay for screening carbohydrate-active enzymes using glycan microspheres. *Chemical Communications*, 49(48): 5441-5443.
- Chansang, H., & Cooksey, K.E. 1977. The glucose transport system of *Amphora coffeaeformis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 13(1): 51-57.
- Chapman, K.D., Dyer, J.M., & Mullen, R.T. 2012. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *Journal of lipid research*, 53(2): 215-226.
- Chauton, M.S., Winge, P., Brembu, T., Vadstein, O., & 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, C., Li, Q., Zhou, Q., Sun, L., Zheng, M., & Gao, Y. 2014. Accumulation of free amino acids in marine diatom resting cells during rejuvenation. *Journal of sea research*, 85: 483-490.
- Clark, DR., Flynn, K.J., & Owens, N.J. 2002. The large capacity for dark nitrate-assimilation in diatoms may overcome nitrate limitation of growth. *New Phytologist*, 155(1): 101-108.
- Claros, M.G., & Vincens, P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European journal of biochemistry*, 241(3), 779-786.
- Cohen, J.H., Berge, J., Moline, M.A., Johnsen, G., Zolich, A.P. 2020. Light in the Polar Night. In: Berge J., Johnsen G., Cohen J. [eds] POLAR NIGHT Marine Ecology. *Advances in Polar Ecology*, vol 4. Springer, Cham, pp. 37-66.
- Couso, I., Pérez-Pérez, M.E., Martínez-Force, E., Kim, H.S., He Y., Umen, J.G., & Crespo, J.L. 2018. Autophagic flux is required for the synthesis of triacylglycerols and ribosomal protein turnover in *Chlamydomonas*. *Journal of experimental botany*, 69(6):1355-1367.

- Cuhel, R.L., Ortner, P.B., & Lean, D.R. 1984. Night synthesis of protein by algae. *Limnology and Oceanography*, 29(4): 731-744.
- Cullen, J., & Lewis, M.R. 1988. The kinetics of algal photoadaptation in the context of vertical mixing. *Journal of Plankton Research*, 10: 1039-1063.
- Darley, W.M. 1977. Biochemical composition. In Werner, D. [Eds.] *The biology of diatoms*. Blackwell. Oxford, UK. pp. 198-223.
- Däschner, K., Couée, I., & Binder, S. 2001. The mitochondrial isovaleryl-coenzyme a dehydrogenase of *Arabidopsis* oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism. *Plant physiology*, 126(2):601-612.
- De Stefano, L., Rea, I., Rendina, I., De Stefano, M., & Moretti, L. 2007. Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*. *Optics Express*. 15(26): 18082-18088.
- Degerlund, M., & Eilertsen, H.C. 2010. Main species characteristics of phytoplankton spring blooms in NE Atlantic and Arctic waters (68–80 N). *Estuaries and coasts*, 33(2): 242-269.
- Dehning, I., & Tilzer, M.M. 1989. Survival of *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae) in darkness. *Journal of Phycology*, 25(3): 509-515.
- Delorme-Axford, E., Abernathy, E., Lennemann, N.J., Bernard, A., Ariosa, A., Coyne, C.B., ... & Klionsky, D.J. 2018. The exoribonuclease Xrn1 is a post-transcriptional negative regulator of autophagy. *Autophagy*, 14(5): 898-912.
- Demé, B., Cataye, C., Block, M.A., Maréchal, E., & Jouhet, J. 2014. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *The FASEB Journal*, 28(8): 3373-3383.
- Depauw, F.A., Rogato, A., Ribera d'Alcalá, M., & Falciatore, A. 2012. Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *Journal of experimental botany*, 63(4): 1575-1591.
- Deschamps, P., & Moreira, D. 2012. Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome biology and evolution*, 4(7): 683-688.
- Desgeorges, M.M., Freyssenet, D., Chanon, S., Castells, J., Pugnère, P., Béchet, D., ... & Defour, A. 2014. Post-transcriptional regulation of autophagy in C2C12 myotubes following starvation and nutrient restoration. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 54: 208-216.
- Dickson, R.C. 2008. Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *Journal of lipid research*, 49(5): 909-921.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... & Gingeras, T.R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1): 15-21.

- Dorrell, R.G., Gile, G., McCallum, G., Méheust, R., Bapteste, E.P., Klinger, C.M., ... & Bowler, C. 2017. Chimeric origins of ochrophytes and haptophytes revealed through an ancient plastid proteome. *elife*, 6, e23717.
- Dorrell, R.G., Villain, A., Perez-Lamarque, B., de Kerdrel, G.A., McCallum, G., Watson, A.K., ... & Blanc, G. 2021. Phylogenomic fingerprinting of tempo and functions of horizontal gene transfer within ochrophytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(4).
- Doucette, G.J., & Fryxell, G.A. 1983. *Thalassiosira antarctica*: vegetative and resting stage chemical composition of an ice-related marine diatom. *Marine biology*, 78(1): 1-6.
- Doucette, G.J., & Fryxell, G.A. 1985. *Thalassiosira antarctica* (Bacillariophyceae): Vegetative and resting stage ultrastructure of an ice-related marine diatom. *Polar Biology*, 4(2): 107-112.
- Drebes, G. 1966. On the life history of the marine plankton diatom *Stephanopyxis palmeriana*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 13(1): 101.
- Du Preez, D.R., & Bate, G.C. 1992. Dark survival of the surf diatom *Anaulus australis* Drebes et Schulz. *Botanica marina*, 35(4): 315-320.
- Dunn, Jr, W.A. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in cell biology*, 4(4): 139-143.
- Dunn, T.M., Lynch, D.V., Michaelson, L.V., & Napier, J.A. 2004. A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany*, 93(5): 483-497.
- Durbin, E.G. 1978. Aspects of the biology of resting spores of *Thalassiosira nordenskiöldii* and *Detonula confervacea*. *Marine Biology*, 45(1): 31-37.
- Eilertsen, H.C., Sandberg, S., & Tøllefsen, H. 1995. Photoperiodic control of diatom spore growth: a theory to explain the onset of phytoplankton blooms. Marine ecology progress series. *Oldendorf*, 116(1): 303-307.
- Eizadora, T.Y., Zendejas, F.J., Lane, P.D., Gaucher, S., Simmons, B.A., & Lane, T.W. 2009. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation. *Journal of Applied Phycology*, 21(6): 669.
- Fabris, M., Matthijs, M., Rombauts, S., Vyverman, W., Goossens, A., & Baart, GJ. 2012. The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway. *The Plant Journal*, 70(6): 1004-1014.
- Fahl, K., & Kattner, G. 1993. Lipid content and fatty acid composition of algal communities in sea-ice and water from the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biology*, 13(6): 405-409.

- Falciatore, A., Jaubert, M., Bouly, J.P., Bailleul, B., & Mock, T. 2020. Diatom molecular research comes of age: model species for studying phytoplankton biology and diversity. *The Plant Cell*, 32(3): 547-572.
- Falkowski, P.G., & LaRoche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*, 27(1): 8-14.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., & Taylor, F.J.R. 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682): 354-360.
- Fan, J., Yu, L., & Xu, C. 2019. Dual role for autophagy in lipid metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 31(7): 1598-1613.
- Fernie, A.R., Obata, T., Allen, A.E., Araújo, W.L., & Bowler, C. 2012. Leveraging metabolomics for functional investigations in sequenced marine diatoms. *Trends in plant science*, 17(7): 395-403.
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W., & Milo, R. 2013. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 110: 10039-10044.
- Frankel, L.B., Lubas, M., & Lund, A.H. 2017. Emerging connections between RNA and autophagy. *Autophagy*, 13(1): 3-23.
- Frawley, L.E., & Orr-Weaver, T.L. 2015. Polyploidy. *Current Biology*, 25: R353–R358.
- French, F.W., & Hargraves, P.E. 1985. Spore formation in the life cycles of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus danicus*. *Journal of Phycology*, 21(3): 477-483.
- Fromm, H. 2020. GABA signaling in plants: targeting the missing pieces of the puzzle. *Journal of Experimental Botany*, 71(20): 6238-6245.
- Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell & Environment*, 15(4): 381-392.
- Fryxell, G.A. 1989. Marine phytoplankton at the Weddell Sea ice edge: seasonal changes at the specific level. *Polar Biology*, 10(1): 1-18.
- Fryxell, G.A., & Prasad, A.K.S.K. 1990. *Eucampia antarctica* var. *recta* (Mangin) stat. nov.(Biddulphiaceae, Bacillariophyceae): life stages at the Weddell Sea ice edge. *Phycologia*, 29(1): 27-38.
- Gaidarenko, O., Sathoff, C., Staub, K., Huesemann, M.H., Vernet, M., & Hildebrand, M. 2019. Timing is everything: Diel metabolic and physiological changes in the diatom *Cyclotella cryptica* grown in simulated outdoor conditions. *Algal Research*, 42: 101598.
- Gallo, C., d'Ippolito, G., Nuzzo, G., Sardo, A., & Fontana, A. 2017. Autoinhibitory sterol sulfates mediate programmed cell death in a bloom-forming marine diatom. *Nature communications*, 8(1): 1-11.

- Gallo, C., Nuzzo, G., d'Ippolito, G., Manzo, E., Sardo, A., & Fontana, A. 2018. Sterol sulfates and sulfotransferases in marine diatoms. *Methods in enzymology*, 605: 101-138.
- 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 tricorutum*. *The Plant Cell*, 26(4): 1681-1697.
- Geuther, R. 1977. Al Lehninnger, Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function. *Journal of Basic Microbiology*, 17(1): 86-87.
- Gibson, C.E., & Fitzsimons, A.G. 1990. Induction of the resting phase in the planktonic diatom *Aulacoseira subarctica* in very low light. *British Phycological Journal*, 25(4): 329-334.
- Gleitz, M., & Kirst, G.O. 1991. Photosynthesis-irradiance relationships and carbon metabolism of different ice algal assemblages collected from Weddell Sea pack ice during austral spring (EPOS 1). *Polar Biol.*, 11:385-392.
- Gleitz, M., & Thomas, D.N. 1993. Variation in phytoplankton standing stock, chemical composition and physiology during sea-ice formation in the southeastern Weddell Sea, Antarctica. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*, 173:211-230.
- Gloyn, A.L., Odili, S., Zelent, D., Buettger, C., Castleden, H.A., Steele, A.M., ... & d'Annunzio, G. 2005. Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14): 14105-14113.
- Goldman, J.C., Hansell, D.A., & Dennett, M.R. 1992. Chemical characterization of three large oceanic diatoms: potential impact on water column chemistry. *Marine ecology progress series*, 257-270.
- Gosselin, M., Legendre, L., Therriault, J.C., Demers, S., & Rochet, M. 1986. Physical control of the horizontal patchiness of sea-ice microalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 289-298.
- Gosselin, M., Levasseur, M., Wheeler, P.A., Horner, R.A., & Booth, B. C. 1997. New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean. *Deep-Sea Research Part II-Top Stud Oceanography*, 44: 623-1644.
- Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., & Bux, F. 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, 114: 507-511.
- Granum, E., & Myklestad, S.M. 1999. Effects of NH₄⁺ assimilation on dark carbon fixation and β -1, 3glucan metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 35(6): 1191-1199.
- Granum, E., & Myklestad, S.M. 2001. Mobilization of β -1, 3-glucan and biosynthesis of amino acids induced by NH₄⁺ addition to N-limited cells of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 37(5): 772-782.

- Granum, E., Kirkvold, S., & Myklestad, S. 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series*, 242: 83-94.
- Green, B.R., Alami M., Zhu, S., Guo, J., & Maldonado, M. 2013. The LHC superfamily and the complex roles of its members in photoacclimatation. *The Molecular Life of Diatoms*, Paris, France.
- Gruber, A., Rocap, G., Kroth, P.G., Armbrust, E.V., & Mock, T. 2015. Plastid proteome prediction for diatoms and other algae with secondary plastids of the red lineage. *The Plant Journal*, 81(3): 519-528.
- Gryder, R.M., & Adams, E. 1969. Inducible degradation of hydroxyproline in *Pseudomonas putida*: pathway regulation and hydroxyproline uptake. *Journal of bacteriology*, 97(1): 292-306.
- Gschloessl, B., Guerneur, Y., & Cock, J.M. 2008. HECTAR: a method to predict subcellular targeting in heterokonts. *BMC bioinformatics*, 9(1): 1-13.
- Gu, W., Zhao, G., Eddy, C., & Jensen, R.A. 1995. Imidazole acetol phosphate aminotransferase in *Zymomonas mobilis*: molecular genetic, biochemical, and evolutionary analyses. *Journal of Bacteriology*, 177(6): 1576-1584.
- Guerrini, F., Cangini, M., Boni, L., Trost, P., & Pistocchi, R. 2000. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. *Journal of Phycology*, 36(5): 882-890.
- Guiry, M.D. 2012. "How many species of algae are there?". *Journal of Phycology*. 48 (5): 1057-1063.
- Guo, T., Nan, Z., Miao, C., Jin, X., Yang, W., Wang, Z., ... & Ge, W. 2019. The autophagy-related gene Atg101 in *Drosophila* regulates both neuron and midgut homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 294(14): 5666-5676.
- Handa, N. 1969. Carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Biology*, 4: 208-214.
- Hannun, Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 274(5294): 1855-1859.
- Hargraves, P.E., & French, F. 1975. Observations on the survival of diatom resting spores. *Beih. Nova Hedwigia*, 53:229-38.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., & Danquah, M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3): 1037-1047.
- Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., Steidinger, K.A., & Tangen, K. 1996. "Marine Diatoms". In Carmelo R. Tomas (ed.). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. *Academic Press*. pp. 5–385.

- He, C., & Klionsky, D.J. 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43: 67-93.
- He, Y., Yu, C., Zhou, L., Chen, Y., Liu, A., Jin, J., ... & Jiang, D. 2014. Rubisco decrease is involved in chloroplast protrusion and Rubisco-containing body formation in soybean (*Glycine max.*) under salt stress. *Plant physiology and biochemistry*, 74: 118-124.
- Heck, J.N., Mellman, D.L., Ling, K., Sun, Y., Wagoner, M.P., Schill, N.J., & Anderson, R.A. 2007. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 42(1): 15-39.
- Hellebust, J.A. 1971. Glucose uptake by *Cyclotella cryptica*: dark induction and light inactivation of transport system. *Journal of Phycology*, 7(4): 345-349.
- Hellebust, J.A., & Lewin, J. 1977. Heterotrophic nutrition. *The biology of diatoms*, 169-197.
- Hildebrandt, T.M., Nesi, A.N., Araújo, W.L., & Braun, H.P. 2015. Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*, 8(11): 1563-1579.
- Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., & Ishida, H. 2018. Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 59(7): 1363-1376.
- Hitchcock, G.L. 1980. Diel variation in chlorophyll a, carbohydrate and protein content of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Biology*, 57(4): 271-278.
- Hochstrasser, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics*, 30(1): 405-439.
- Hollibaugh, J.T., Seibert, D.L.R., & Thomas, W.H. 1981. Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species. *Journal of phycology*, 17(1): 19.
- Horner, R., & Alexander, V. 1972. Algal populations in Arctic sea ice: an investigation of heterotrophy. *Limnology and Oceanography*, 17(3): 454-458.
- Hörtensteiner, S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 55-77.
- Hörtensteiner, S., & Kräutler, B. 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011: 977-988.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S.I., Natsume, T., Hara, T., & Mizushima, N. 2009. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5(7): 973-979.
- Hsiao, S.I.C. 1992. Dynamics of ice algae and phytoplankton in Frobisher Bay. *Polar Biology*, 12: 645-651.

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4): 621-639.
- Huang, W., Río Bártulos, C., & Kroth, P.G. 2016. Diatom Vacuolar 1, 6- β -Transglycosylases can Functionally Complement the Respective Yeast Mutants. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(4): 536-546.
- Huang, W., Haferkamp, I., Lepetit, B., Molchanova, M., Hou, S., Jeblick, W., ... & Kroth, P.G. 2018. Reduced vacuolar β -1, 3-glucan synthesis affects carbohydrate metabolism as well as plastid homeostasis and structure in *Phaeodactylum tricornutum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18): 4791-4796.
- Huang, B., Marchand, J., Blanckaert, V., Lukomska, E., Ulmann, L., Wielgosz-Collin, G., ... & Morant-Manceau, A. 2019. Nitrogen and phosphorus limitations induce carbon partitioning and membrane lipid remodelling in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Phycology*, 54(3): 342-358.
- Huysman, M. J., Martens, C., Vyverman, W., & de Veylder, L. 2014. Protein degradation during the diatom cell cycle: annotation and transcriptional analysis of SCF and APC/C ubiquitin ligase genes in *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Genomics*, 14: 39-46.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., ... & Ohsumi, Y. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811): 488-492.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., ... & Mae, T. 2008. Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an ATG Gene-Dependent Autophagic Process1 [W][OA]. *Plant Physiology*, 148: 143.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., & Chun, J. 2004. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry*, 73(1): 321-354.
- Ishizaki, K., Larson, T.R., Schauer, N., Fernie, A.R., Graham, I.A., & Leaver, C.J. 2005. The critical role of *Arabidopsis* electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *The Plant Cell*, 17(9): 2587-2600.
- Izumi, M., Hidema, J., Makino, A., & Ishida, H. 2013. Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 161(4): 1682-1693.
- Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., ... & Ishida, H. 2015. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant physiology*, 167(4): 1307-1320.
- Izumi, M., Ishida, H., Nakamura, S., & Hidema, J. 2017. Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *The Plant Cell*, 29(2): 377-394.

- Izumi, M., Nakamura, S., & Li, N. 2019. Autophagic Turnover of chloroplasts: Its roles and regulatory mechanisms in response to sugar starvation. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Jakob, T., Goss, R., & Wilhelm, C. 2001. Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Plant Physiology*, 158(3): 383-390.
- Jakob, T., Wagner, H., Stehfest, K., & 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.
- Jallet, D., Caballero, M.A., Gallina, A.A., Youngblood, M., & Peers, G. 2016. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 18: 51-60.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L., & Sheen, J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell*, 9(1): 5-19.
- Jenkins, G.M., & Frohman, M.A. 2005. Phospholipase D: a lipid centric review. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(19-20): 2305-2316.
- Jewson, D.H., Granin, N.G., Zhdanov, A.A., Gorbunova, L.A., Bondarenko, N.A., & Gnatovsky, R.Y. 2008. Resting stages and ecology of the planktonic diatom *Aulacoseira skvortzowii* in Lake Baikal. *Limnology and Oceanography*, 53(3): 1125-1136.
- Jewson, D.H., Lowry, S.F., & Bowen, R. 2006. Co-existence and survival of diatoms on sand grains. *European Journal of Phycology*, 41(2): 131-146.
- Jiang, Q., Zhao, L., Dai, J., & Wu, Q. 2012. Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. *PLoS One*, 7(7).
- Kajikawa, M., Yamauchi, M., Shinkawa, H., Tanaka, M., Hatano, K., Nishimura, Y., ... & Fukuzawa, H. 2019. Isolation and characterization of *Chlamydomonas* autophagy-related mutants in nutrient-deficient conditions. *Plant and Cell Physiology*, 60(1): 126-138.
- Kamp, A., de Beer, D., Nitsch, J.L., Lavik, G., & Stief, P. 2011. Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14): 5649-5654.
- Kamp, A., Stief, P., Knappe, J., & de Beer, D. 2013. Response of the ubiquitous pelagic diatom *Thalassiosira weissflogii* to darkness and anoxia. *PLoS One*, 8(12): e82605.
- Kang, S. H., & Fryxell, G. A. 1992. *Fragilariopsis cylindrus* (Grunow) Krieger: the most abundant diatom in water column assemblages of Antarctic marginal ice-edge zones. *Polar Biology*, 12: 609-627.

- Kang, J.H., Katsikis, G., Li, Z., Sapp, K.M., Stockslager, M.A., Lim, D., ... & Miettinen, T.P. 2020. Monitoring and modeling of lymphocytic leukemia cell bioenergetics reveals decreased ATP synthesis during cell division. *Nature communications*, 11(1): 1-13.
- Karsten, U., Schlie, C., Woelfel, J., & Becker, B. 2012. Benthic diatoms in Arctic seas: ecological functions and adaptations. *Polarforschung*. 81:77-84.
- Kennedy, F., Martin, A., Bowman, J.P., Wilson, R., & McMinn, A. 2019. Dark metabolism: a molecular insight into how the Antarctic sea-ice diatom *Fragilariopsis cylindrus* survives long-term darkness. *New Phytologist*, 223(2): 675-691.
- Kennedy, F., Martin, A., & McMinn, A. 2020. Insights into the production and role of nitric oxide in the Antarctic sea-ice diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Journal of Phycology*, 56(5): 1196-1207.
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. 2011. Unraveling algal lipid metabolism: recent advances in gene identification. *Biochimie*, 93(1): 91-100.
- Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., ... & Bartek, J. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4ème edition). *Autophagy*, pp. 1-382.
- Knorr, S., Sinn, M., Galetskiy, D., Williams, R.M., Wang, C., Muller, N., Mayans, O., Schleheck, D., & Hartig, J.S. 2018. Widespread bacterial lysine degradation proceeding via glutarate and L-2-hydroxyglutarate. *Nature Communications*, 9(1): 5071.
- Kobayashi, K. 2016. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *Journal of plant research*, 129(4): 565-580.
- Koester, J. A., Swalwell, J. E., von Dassow, P., & Virginia Armbrust, E. 2010. Genome size differentiates co-occurring populations of the planktonic diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyta). *BMC Evol. Biol.* 10:1.
- Kokabi, K., Gorelova, O., Zorin, B., Didi-Cohen, S., Itkin, M., Malitsky, S., ... & Khozin-Goldberg, I. 2020. Lipidome Remodeling and Autophagic Respose in the Arachidonic-Acid-Rich Microalga *Lobosphaera incisa* Under Nitrogen and Phosphorous Deprivation. *Frontiers in plant science*, 11.
- 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 tricorutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PloS one*, 3(1): e1426.
- Krüssel, L., Junemann, J., Wirtz, M., Birke, H., Thornton, J.D., Browning, L.W., ... & Hildebrandt, T. 2014. The mitochondrial sulfur dioxygenase ETHE1 is required for amino acid catabolism during carbohydrate starvation and embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, pp-114.

- Kuwata, A., & Takahashi, M. 1990. Life-form population responses of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, to oligotrophication in regionally upwelled water. *Marine Biology*, 107(3): 503-512.
- Kuwata, A., Hama, T., & Takahashi, M. 1993. Ecophysiological characterization of two life forms, resting spores and resting cells, of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, formed under nutrient depletion. *Marine Ecology Progress Series*, 245-255.
- Kuwata, A., & Takahashi, M. 1999. Survival and recovery of resting spores and resting cells of the marine planktonic diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* under fluctuating nitrate conditions. *Marine Biology*, 134(3): 471-478.
- Kuwata, A., & Jewson, D.H. 2015. Ecology and evolution of marine diatoms and pamales. In *Marine protists* (pp. 251-275). Springer Japan.
- Kvernvik, A. C., Hoppe, C. J. M., Lawrenz, E., Prášil, O., Greenacre, M., Wiktor, J. M., & Leu, E. 2018. Fast reactivation of photosynthesis in Arctic phytoplankton during the polar night. *Journal of phycology*, 54: 461-470.
- Lacour, T., Morin, P. I., Sciandra, T., Donaher, N., Campbell, D. A., Ferland, J., & Babin, M. 2019. Decoupling light harvesting, electron transport and carbon fixation during prolonged darkness supports rapid recovery upon re-illumination in the Arctic diatom *Chaetoceros neogracilis*. *Polar Biology*, 1-13.
- Lane, J.D., Korolchuk, V.I., Murray, J.T., Rabanal-Ruiz, Y., & Otten, E.G. 2017. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in biochemistry*, 61(6):565-584.
- Lavaud, J, Strzepek, R.F., & Kroth, P.G. 2007. Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography*, 52: 1188-1194.
- Lehninger, A.L. 1975. Sugars, storage polysaccharides and cell walls. *Biochemistry*. Worth Publishers Inc., New York, 249-276.
- Lennon, J.T., & Jones, S.E. 2011. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2): 119-130.
- Leu, E., Mundy, C.J., Assmy, P., Campbell, K., Gabrielsen, T.M., Gosselin, M., Juul-Pedersen, T., & Gradinger, R. 2015. Arctic spring awakening—steering principles behind the phenology of vernal ice algal blooms. *Progress in Oceanography*, 139: 151-170.
- 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*, 112(2): 412-417.
- Lewin J.C. 1953. Heterotrophy in diatoms. *Microbiology*, 9(2): 305-313.

- Lewin, J., & Hellebust, J.A. 1970. Heterotrophic nutrition of the marine pennate diatom, *Cylindrotheca fusiformis*. *Canadian journal of microbiology*, 16(11): 1123-1129.
- Li, F., Chung, T., & Vierstra, R.D. 2014. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy-and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(2): 788-807.
- Liang, Q., Yang, P., Tian, E., Han, J., & Zhang, H. 2012. The *C. elegans* ATG101 homolog EPG-9 directly interacts with EPG-1/Atg13 and is essential for autophagy. *Autophagy*, 8(10) :1426-1433.
- Liang, Y., Kong, F., Torres-Romero, I., Burlacot, A., Cuine, S., Légeret, B., ... & Li-Beisson, Y. 2019. Branched-chain amino acid catabolism impacts triacylglycerol homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, 179(4): 1502-1514.
- Lombardi, A.T., & Wangersky, P.J. 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 77(1): 39-47.
- Long, F., Liu, W., Jiang, X., Zhai, Q., Cao, X., Jiang, J., & Xu, J. 2021. State-of-the-art technologies for biofuel production from triglycerides: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 148: 111269.
- Losh, J.L., Young, J.N., & Morel, F.M. 2013. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytologist*, 198(1): 52-58.
- Love, M.I., Huber, W., & Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12): 550.
- Lucas, K.A., Filley, J.R., Erb, J.M., Graybill, E.R., & Hawes, J.W. 2007. Peroxisomal metabolism of propionic acid and isobutyric acid in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 24980-24989.
- Lund, J.W.G. 1954. The seasonal cycle of the plankton diatom, *Melosira italica* (Ehr.) Kutz. subsp. subarctica O. Mull. *The Journal of Ecology*. 151-179.
- Lupette, J., Jaussaud, A., Seddiki, K., Morabito, C., Brugière, S., Schaller, H., & Maréchal, E. 2019. The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal Research*, 38, 101415.
- Lyon, B.R., & Mock, T. 2014. Polar microalgae: new approaches towards understanding adaptations to an extreme and changing environment. *Biology*, 3(1): 56-80.
- Ma, L., & Li, G. 2021. *Arabidopsis* FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 negatively regulates carbon starvation responses. *Plant, Cell & Environment*, 44(6): 1816-1829.
- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T., & Geider, R.J. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of phycology*, 38(1): 17-38.

- Maeda, Y., Nojima, D., Yoshino, T., & Tanaka, T. 2017. Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728): 20160408.
- Magaletti, E., Urbani, R., Sist, P., Ferrari, C.R., & Cicero, A.M. 2004. Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N-and P-limitation. *European Journal of Phycology*, 39(2): 133-142.
- Magasanik, B., & Bowser, H.R. 1955. The degradation of histidine by *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 213(57): 1-580.
- Mann, D.G. 1994. Auxospore formation, reproductive plasticity & cell structure in *Navicula ulvacea* and the resurrection of the genus *Dickieia* (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, 29: 141-157.
- Mann, D.G., & Droop, S.J.M. 1996. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. In *Biogeography of freshwater algae* (pp. 19-32). Springer, Dordrecht.
- Manoharan, K., Lee, T.K., Cha, J.M., Kim, J.H., Lee, W.S., Chang, M., & Cho, J.H. 1999. Acclimation of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) to prolonged darkness by use of an alternative carbon source from triacylglycerides and galactolipids. *Journal of phycology*, 35(2): 287-292.
- Margalef, R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica acta*, 1(4): 493-509.
- Marinov, I., Doney S.C., & Lima I.D. 2010. Response of ocean phytoplankton community structure to climate change over the 21st century: partitioning the effects of nutrients, temperature and light. *Biogeosciences*, 7(12): 3941.
- Martin, A., McMinn, A., Heath, M., Hegseth, E.N., & Ryan, K.G. 2012. The physiological response to increased temperature in over-wintering sea ice algae and phytoplankton in McMurdo Sound, Antarctica and Tromsø Sound, Norway. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 428: 57-66.
- Martin, T., Steele, M., & Zhang, J. 2014. Seasonality and long-term trend of Arctic Ocean surface stress in a model. *Journal of Geophysical Research*, 119: 1723-1738.
- Martinson, D.G., & Steele, M. 2001: Future of the Arctic sea ice cover: Implications of an Antarctic analog. *Geophysical Research Letters*, 28: 307-310.
- Matrai, P.A., Olson, E., Suttles, S., Hill, V., Codispoti, L.A., Light, B., & Steele, M. 2013. Synthesis of primary production in the Arctic Ocean: I. Surface waters, 1954–2007. *Progress in Oceanography*, 110: 93-106.
- McLoughlin, F., Marshall, R.S., Ding, X., Chatt, E.C., Kirkpatrick, L.D., Augustine, R.C., ... & Vierstra, R.D. 2020. Autophagy plays prominent roles in amino acid, nucleotide, and carbohydrate metabolism during fixed-carbon starvation in maize. *Plant Cell*, 32(9): 2699-2724.

- McMinn A., Ashworth C., & Ryan K. 1999. Growth and productivity of Antarctic sea ice algae under PAR and UV irradiances. *Botanica Marina*, 42: 401-407.
- McQuoid, M.R., & Hobson, L.A. 1996. Diatom resting stages. *Journal of Phycology*, 32(6): 889-902.
- McQuoid, M.R., & Godhe, A. 2004. Recruitment of coastal planktonic diatoms from benthic versus pelagic cells: Variations in bloom development and species composition. *Limnology and oceanography*, 49(4): 1123-1133.
- Medlin, L., Kooistra, W.H.C.F., & Schmid, A.M. 2000. A review of the evolution of the diatoms-a total approach using molecules, morphology and geology. In The origin and early evolution of the diatoms: fossil, molecular and biogeographical approaches. A. Witkowski et J. Sieminska [eds.], Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland, pp. (pp. 13-35).
- Mercer, C.A., Kaliappan, A., & Dennis, P.B. 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5(5) :649-662.
- Michaeli, S., & Fromm, H. 2015. Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? *Frontiers in plant science*, 6: 419.
- Milligan, A.J., et Morel, F.M. 2002. A proton buffering role for silica in diatoms. *Science*, 297(5588): 1848-1850.
- Minoda, A., Sonoike, K., Okada, K., Sato, N., & 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.
- Mirón, A.S., Garcia, M.C.C., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M., & Chisti, Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricorutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 16(3): 287-297.
- Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22): 2861-2873.
- Mock, T., Otilar, R.P., Strauss, J., McMullan, M., Paajanen, P., Schmutz, J., ... & Grigoriev, I.V. 2017. Evolutionary genomics of the cold-adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature*, 541(7638): 536-540.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., ... & Sheen, J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300(5617): 332-336.
- Moore E.R., Bullington B.S., Weisberg A.J., Jiang Y., Chang J., & Halsey K.H. 2017. Morphological and transcriptomic evidence for ammonium induction of sexual reproduction in *Thalassiosira pseudonana* and other centric diatoms. *PLoS One*. 12(7): e0181098.

- Morin, P.I. 2017. Acclimatation à la nuit polaire puis au retour de la lumière chez la diatomée arctique *Fragilariopsis cylindrus*. Master dissertation, Université Laval, Québec, 61 pp.
- Morin, P.I., Lacour T., Grondin P.L., Bruyant F., Ferland J., Forget M.H., ... & Babin M. 2020. Response of the sea-ice diatom *Fragilariopsis cylindrus* to simulated polar night darkness and return to light. *Limnology and Oceanography*, 65(5): 1041-1060.
- Moroni, F. 1999. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *European journal of pharmacology*, 375(1-3): 87-100.
- Mühlroth, A., Winge, P., El Assimi, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Hohmann-Marriott, M.F., ... & Bones, A.M. 2017. Mechanisms of phosphorus acquisition and lipid class remodeling under P limitation in a marine microalga. *Plant Physiology*, 175(4): 1543-1559.
- Munder, M.C., Midtvedt, D., Franzmann, T., Nüske, E., Otto, O., Herbig, M., ... & Malinowska, L. 2016. A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid-to a solid-like state promotes entry into dormancy. *Elife*, 5, e09347.
- Mundy, C.J., Gosselin, M., Ehn, J., Gratton, Y., Rossnagel, A., Barber, D.G., ... & Darnis, G. 2009. Contribution of under-ice primary production to an ice-edge upwelling phytoplankton bloom in the Canadian Beaufort Sea. *Geophysical Research Letters*, 36(17).
- Mundy, C.J., Gosselin, M., Gratton, Y., Brown, K., Galindo, V., Campbell, K., Levasseur, M., Barber, D., Papakyriakou, T., & Bélanger, S. 2014. Role of environmental factors on phytoplankton bloom initiation under landfast sea ice in resolute passage, Canada. *Marine Ecology Progress Series*, 497: 39-49.
- Murphy, D.J. 2012. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 249(3): 541-585.
- Mus, F., Toussaint, J.P., Cooksey, K.E., Fields, M.W., Gerlach, R., Peyton, B.M., and Carlson, R.P. 2013. Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(8): 3625-3642.
- Naik, S.M., & Anil, A.C. 2018. Survival in the dark: strategies adopted by *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta). *Marine Biology Research*, 14: 448-453.
- Nakov, T., Beaulieu, J.M., & Alverson, A.J. 2018. Insights into global planktonic diatom diversity: The importance of comparisons between phylogenetically equivalent units that account for time. *The ISME journal*, 12(11): 2807-2810.
- Nelson, D.L., Lehninger, M., & Cox, M.M. 2008. In Freeman, W.H. [Eds.] *Lehninger principles of biochemistry*. New York, pp. 1158.
- Niemi, A., Michel, C., Hille, K., & Poulin, M. 2011. Protist assemblages in winter sea ice: setting the stage for the spring ice algal bloom. *Polar Biology*, 34(12): 1803-1817.

- Noda, N.N., & Mizushima, N. 2016. Atg101: not just an accessory subunit in the autophagy-initiation complex. *Cell structure and function*, 41(1): 13-20.
- Nunn, B.L., Faux, J.F., Hippmann, A.A., Maldonado, M.T., Harvey, H.R., Goodlett, D.R., ... & Strzepek, R.F. 2013. Diatom proteomics reveals unique acclimation strategies to mitigate Fe limitation. *PLoS One*, 8(10): e75653.
- Nuzzo, G., Gallo, C., d'Ippolito, G., Cutignano, A., Sardo, A., & Fontana, A. 2013. Composition and quantitation of microalgal lipids by ERETIC 1H NMR method. *Marine drugs*, 11(10): 3742-3753.
- Nymark, M., Valle, K.C., Hancke, K., Winge, P., Andresen, K., Johnsen, G., ... & Brembu, T. 2013. Molecular and photosynthetic responses to prolonged darkness and subsequent acclimation to reillumination in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS one*, 8(3): e58722.
- Obata, T., Fernie, A.R., & Nunes-Nesi, A. 2013. The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. *Metabolites*, 3(2): 325-346.
- Odate, T., & Maita, Y. 1990. Seasonal distribution and vertical flux of resting spores of *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species in the neritic water of Funaka Bay, Japan. *Bulletin of the faculty of fisheries hokkaido university*, 41(1): 1-7.
- Ohanian, J., & Ohanian, V. 2001. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(14): 2053-2068.
- Oku, O., & Kamatani, A. 1995. Resting spore formation and phosphorus composition of the marine diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* under various nutrient conditions. *Marine Biology*, 123(2): 393-399.
- Oku, O., & Kamatani, A. 1997. Resting spore formation of the marine planktonic diatom *Chaetoceros anastomosans* induced by high salinity and nitrogen depletion. *Marine Biology*, 127(3): 515-520.
- Oku, O., & Kamatani, A. 1999. Resting spore formation and biochemical composition of the marine planktonic diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* in culture: ecological significance of decreased nucleotide content and activation of the xanthophyll cycle by resting spore formation. *Marine Biology*, 135(3): 425-436.
- Olsen, R.O., Hess-Erga, O.K., Larsen, A., Hoffmann, F., Thuestad, G., & Hoell, I.A. 2016. Dual staining with CFDA-AM and SYTOX Blue in flow cytometry analysis of UV-irradiated *Tetraselmis suecica* to evaluate vitality. *Aquatic Biology*, 25: 39-52.
- Ong, M. S., Richmond, T. J., & Davey, C. A. 2007. DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core. *Journal of Molecular Biology*, 368: 1067-1074.
- Onyshchenko, A., Roberts, W.R., Ruck, E.C., Lewis, J.A., & Alverson, A.J. 2021. The genome of a nonphotosynthetic diatom provides insights into the metabolic shift to heterotrophy and constraints on the loss of photosynthesis. *New Phytologist*.
- Pahl, S.L., Lewis, D.M., Chen, F., & King, K.D. 2010. Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): Effect of

- some environmental factors. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(3): 235-239.
- Palmisano, A.C., & Sullivan, C.W. 1982. Physiology of sea ice diatoms. I. Response of three polar diatoms to a simulated summer-winter transition. *Journal of Phycology*, 18(4): 489-498.
- Palmisano, A.C., & Sullivan, C.W. 1983. Physiology of sea ice diatoms. II. Dark survival of three polar diatoms. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(1): 157-160.
- Palmisano, A.C., Lizotte, M.P., Smith, G.A., Nichols, P.D., White, D.C., & Sullivan, C.W. 1988. Changes in photosynthetic carbon assimilation in Antarctic sea-ice diatoms during spring bloom: variation in synthesis of lipid classes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 116: 1-13.
- Pan, Y., Hu, F., Yu, C., Li, C., Huang, T., & Hu, H. 2020. Amino acid catabolism during nitrogen limitation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Plant Science*, 11: 2015.
- Pan, Y., Yang, J., Gong, Y., Li, X., & Hu, H. 2017. 3-Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase involved in isoleucine catabolism regulates triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728): 20160409.
- Peltier, G., Ravenel, J., & Verméglio, A. 1987. Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 893(1): 83-90.
- Peltier, G., & Cournac, L. 2002. Chlororespiration. *Annual review of plant biology*, 53(1): 523-550.
- Pelusi, A., Santelia, M.E., Benevenuto, G., Godhe, A., & Montresor, M. 2019. The diatom *Chaetoceros socialis*: spore formation and preservation. *European Journal of Phycology*, 1-10.
- Peperzak, L., & Brussaard, C. P. 2011. Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton. *Journal of Phycology*, 47: 692-702.
- Pérez-Pérez, M.E., Couso, I., Heredia-Martínez, L.G., & Crespo, J.L. 2017. Monitoring autophagy in the model green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells*, 6(4): 36.
- Perrette, M., Yool, A., Quartly, G.D. & Popova, E.E. 2011. Near-ubiquity of ice-edge blooms in the Arctic. *Biogeosciences*, 8(2): 515-524.
- Peters, E. 1996. Prolonged darkness and diatom mortality: II. Marine temperate species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 207(1-2): 43-58.
- Peters, E., & Thomas, D.N. 1996. Prolonged darkness and diatom mortality I: Marine Antarctic species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 207(1-2): 25-41.

- Pitcher, G.C. 1990. Phytoplankton seed populations of the Cape Peninsula upwelling plume, with particular reference to resting spores of *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) and their role in seeding upwelling waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 31(3): 283-301.
- Popels, L.C., MacIntyre, H.L., Warner, M.E., Zhang, Y., & Hutchins, D.A. 2007. Physiological responses during dark survival and recovery in *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *Journal of Phycology*, 43(1): 32-42.
- Poulin, M., Daugbjerg, N., Gradinger, R., Ilyash, L., Ratkova, T., & von Quillfeldt, C. H. 2011. The pan-Arctic biodiversity of marine pelagic and sea-ice unicellular eukaryotes: a first-attempt assessment. *Marine Biodiversity*. 41: 13-28.
- Price, N. M., Harrison, G. I., Hering, J. G., Hudson, R. J., Nirel, P. M., Palenik, B., & Morel, F. M. 1989. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biological oceanography*, 6(5-6): 443-461.
- Pu, Y., Luo, X., & Bassham, D.C. 2017. TOR-dependent and-independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 8: 1204.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rao, A.V., & Rao, L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3): 207-216.
- Ras, J., Claustre, H., & Uitz, J. 2008. Spatial variability of phytoplankton pigment distributions in the Subtropical South Pacific Ocean: comparison between in situ and predicted data. *Biogeosciences*. 5: 353-369.
- Redfield, A.C. 1934. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton (Vol. 1). Liverpool: University Press of Liverpool.
- Reeves, S., McMinn, A., & Martin, A. 2011. The effect of prolonged darkness on the growth, recovery and survival of Antarctic sea ice diatoms. *Polar Biology*, 34: 1019-1032.
- Remmers, I.M., D'Adamo, S., Martens, D.E., de Vos, R.C., Mumm, R., America, A.H., ... and Lamers, P.P. 2018. Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* during nitrogen limitation. *Algal research*, 35: 33-49.
- Richmond, T. J., & Davey, C. A. 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. 423:145.
- Ricketts, T.R. 1966. On the chemical composition of some unicellular algae. *Phytochemistry*, 5(1): 67-76.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675-709.

- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *The plant cell*, 14(suppl 1): S185-S205.
- Rózańska, M., Poulin, M., & Gosselin, M. 2008. Protist entrapment in newly formed sea ice in the Coastal Arctic Ocean. *Journal of Marine Systems*, 74(3): 887-901.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J-P., & Bougaran, G. 2015. The use of fluorescent Nile Red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology Biofuels*, 8: 42.
- Russo, E., Campos, A. M., d'Ippolito, G., Manzo, E., Carotenuto, Y., Fontana, A., & Nuzzo, G. 2021. Implementation in lipid extraction and analysis from phytoplankton: *Skeletonema marinoi* as case study. *Marine Chemistry*, 232: 103964.
- Ryu, J.Y., Jeong, S.W., Kim, S.Y., Ko, Y., Yoon, S., Choi, S.B., & Park, Y.I. 2008. Cyanobacterial glucokinase complements the glucose sensing role of *Arabidopsis thaliana* hexokinase 1. *Biochemical and biophysical research communications*, 374(3): 454-459.
- Sackett, O., Petrou, K., Reedy, B., De Grazia, A., Hill, R., Doblin, M., ... & Heraud, P. 2013. Phenotypic plasticity of southern ocean diatoms: key to success in the sea ice habitat? *PloS one*, 8(11): e81185.
- Sakshaug E., & Andresen K. 1986. Effect of light regime upon growth rate and chemical composition of a clone of *Skeletonema costatum* from the Trondheimsfjord, Norway. *Journal of Plankton Research*, 8(4): 619-637.
- Sakshaug, E. 1989. the physiological ecology of polar phytoplankton, 2. In Proceedings of the Sixth Conference of the Comité Arctique International, 13-15 May 1985 (Vol. 6, p. 61). Brill Archive.
- Sakshaug, E. 2004 Primary and Secondary Production in the Arctic Seas. In Stein, R., & MacDonald, R. W. [Eds.] *The Organic Carbon Cycle in the Arctic Ocean*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 57-81.
- Salvato, F., Havelund, J.F., Chen, M., Rao, R.S.P., Rogowska-Wrzesinska, A., Jensen, O.N., ... and Møller, I.M. 2014. The potato tuber mitochondrial proteome. *Plant physiology*, 164(2): 637-653.
- Sato, D., & Nozaki, T. 2009. Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB life*, 61(11): 1019-1028.
- Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B., & Napier, J.A. 2017. Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728): 20160407.
- Schaub, I., Wagner H., Graeve, M., & Karsten, U. 2017. Effects of prolonged darkness and temperature on the lipid metabolism in the benthic diatom *Navicula perminuta* from the Arctic Adventfjorden, Svalbard. *Polar Biology*, 1-15.

- Schlie, C., Woelfel, J., Rüdiger, F., Schumann, R., & Karsten, U. 2011. Ecophysiological performance of benthic diatoms from arctic waters. *In The diatom world* (pp. 421-436). Springer, Dordrecht.
- Sciandra, T., Forget, M. H., Bruyant, F., Béguin, M., Lacour, T., Bowler, C., & Babin, M. 2022. The possible fates of *Fragilariopsis cylindrus* (polar diatom) cells exposed to prolonged darkness. *Journal of Phycology*, DOI: 10.1111/jpy.13232.
- Scrucca, L., Fop, M., Murphy, T.B., & Raftery, A.E. 2016. mclust 5: clustering, classification and density estimation using Gaussian finite mixture models. *The R journal*, 8(1): 289.
- Shih, C.Y., Kang, L.K., & 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: 4354.
- Shikata, T., Iseki, M., Matsunaga, S., Higashi, S.I., Kamei, Y., & Watanabe, M. 2011. Blue and Red Light Induced Germination of Resting Spores in the Red-Tide Diatom *Leptocylindrus danicus*. *Photochemistry and photobiology*, 87(3): 590-597.
- Shiman, R., Gray, D.W., & Hill, M.A. 1994. Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. I. Kinetic properties of the enzyme's iron and enzyme reduction site. *Journal of Biological Chemistry*, 269(40): 24637-24646.
- Sicko-Goad, L. 1986a. Rejuvenation of *Melosira granulata* (Bacillariophyceae) resting cells from the anoxic sediments of Douglas Lake, Michigan, II. electron microscopy 1. *Journal of phycology*, 22(1): 28-35.
- Sicko-Goad, L., Stoermer, E.F., & Fahnenstiel, G. 1986b. Rejuvenation of *Melosira granulata* (Bacillariophyceae) resting cells from the anoxic sediments of Douglas lake, Michigan. I. light microscopy and 14c uptake. *Journal of Phycology*, 22(1): 22-28.
- Sicko-Good, L., Simmons, M.S., Lazinsky, D., & Hall J. 1988. Effect of light cycle on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. *Journal of phycology*, 24(1): 1-7.
- Sicko-Goad, L., Stoermer, E.F., & Kociolek, J.P. 1989. Diatom resting cell rejuvenation and formation: time course, species records and distribution. *Journal of Plankton Research*, 11(2): 375-389.
- Singh, R., & Cuervo, A.M. 2011. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell metabolism*, 13(5): 495-504.
- Slot, M., & Kitajima, K. 2015. Whole-plant respiration and its temperature sensitivity during progressive carbon starvation. *Functional Plant Biology*, 42(6): 579-588.
- Smayda, T.J., & Mitchell-Innes, B. 1974. Dark survival of autotrophic, planktonic marine diatoms. *Marine Biology*, 25(3): 195-202.

- Smith, A.E., & Morris, I. 1980. Pathways of carbon assimilation in phytoplankton from the Antarctic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 25(5): 865-872.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., & Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1): 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. Erratum in *Analytical Biochemistry* 1987, 163(1): 279.
- Smith, R.E.H., Clement, P., & Head, E.J. 1990. Night metabolism of recent photosynthate by sea ice algae in the high Arctic. *Marine Biology*, 107(2): 255-261.
- Smith, S.R., Abbriano, R.M., & Hildebrand, M. 2012. Comparative analysis of diatom genomes reveals substantial differences in the organization of carbon partitioning pathways. *Algal Research*, 1(1): 2-16.
- Sorhannus, U. 2007. A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution. *Marine Micropaleontology*, 65(1-2): 1-12.
- Soto-Burgos, J., & Bassham, D.C. 2017. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one*, 12(8): e0182591.
- Spiegel, S., & Milstien, S. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(5): 397-407.
- Storer, A.C., & Cornish-Bowden, A. 1976. Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. *Biochemical Journal*, 159(1): 7-14.
- Stosch, V., & Fecher, K. 1979. "Internal thecae" of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. *Journal of Phycology*, 15(3): 233-243.
- Strauss, J. 2012. A genomic analysis using RNA-Seq to investigate the adaptation of the psychrophilic diatom *Fragilariopsis cylindrus* to the polar environment. PhD Thesis, University of East Anglia, 227pp.
- Sugie, K., & Kuma, K. 2008. Resting spore formation in the marine diatom *Thalassiosira nordenskioeldii* under iron- and nitrogen-limited conditions. *Journal of plankton research*, 30(11): 1245-1255.
- Sugie, K., Kuma, K., Fujita, S., & Ikeda, T. 2010. Increase in Si: N drawdown ratio due to resting spore formation by spring bloom-forming diatoms under Fe- and N-limited conditions in the Oyashio region. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 382(2): 108-116.
- Suroy, M., Panagiotopoulos, C., Boutorh, J., Goutx, M., & Moriceau, B. 2015. Degradation of diatom carbohydrates: a case study with N- and Si-stressed *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 470: 1-11.

- Suzuki, H., Kaizuka, T., Mizushima, N., & Noda, N.N. 2015. Structure of the Atg101–Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation. *Nature structural & molecular biology*, 22(7): 572.
- Talbert, P.B., Meers, M.P., & Henikoff, S. 2019. Old cogs, new tricks: the evolution of gene expression in a chromatin context. *Nature Reviews Genetics*, 20: 283.
- Tanaka T., Maeda Y., Veluchamy A., Tanaka M., Abida H., Maréchal E., ... & Yoshino T. 2015. Oil accumulation by the oleaginous diatom *Fistulifera solaris* as revealed by the genome and transcriptome. *The Plant Cell*, 27(1): 162-176.
- Thangaraj, S., Giordano, M., & Sun, J. 2020. Comparative proteomic analysis reveals new insights into the common and specific metabolic regulation of the diatom *Skeletonema dohrnii* to the silicate and temperature availability. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1599.
- Thomas, D.N., & Gleitz, M. 1993. Allocation of photoassimilated carbon into major algal metabolite fractions: variation between two diatom species isolated from the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biology*, 13: 281-286.
- Tillmann, U., Baumann, M.E., & Aletsee, L. 1989. Distribution of carbon among photosynthetic end products in the bloom-forming arctic diatom *Thalassiosira antarctica* COMBER. *Polar Biology*, 10: 231-238.
- Tjellström, H., Andersson, M.X., Larsson, K.E., & Sandelius, A.S. 2008. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant, cell & environment*, 31(10): 1388-1398.
- Tong, L. 2013. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(5): 863-891.
- Traller, J.C., Cokus, S.J., Lopez, D.A., Gaidarenko, O., Smith, S.R., McCrow, J.P., ... & Hildebrand, M. 2016. Genome and methylome of the oleaginous diatom *Cyclotella cryptica* reveal genetic flexibility toward a high lipid phenotype. *Biotechnology for biofuels*, 9(1): 1-20.
- Tréguer, P., Bowler, C., Moriceau, B., Dutkiewicz, S., Gehlen, M., Aumont, O., ... & Pondaven, P. 2018. Influence of diatom diversity on the ocean biological carbon pump. *Nature Geoscience*, 11(1): 27-37.
- Tuchman N.C., Schollett M.A., Rier S.T., & Geddes P. 2006. Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions. *Hydrobiologia*, 561(1): 167-177.
- Uitz J., Claustre H., Gentili B., & Stramski D. 2010. Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. *Global Biogeochemical Cycles*, 24(3).
- Urzica, E.I., Vieler, A., Hong-Hermesdorf, A., Page, M.D., Casero, D., Gallaher, S.D., ... & Merchant, S.S. 2013. Remodeling of membrane lipids in iron-starved *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42): 30246-30258.

- Valegård, K., Andralojc, P.J., Haslam, R.P., Pearce, F.G., Eriksen, G.K., Madgwick, P.J., ... & Andersson, I. 2018. Structural and functional analyses of Rubisco from arctic diatom species reveal unusual posttranslational modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 293(34): 13033-13043.
- Valenzuela, J., Mazurie, A., Carlson, R.P., Gerlach, R., Cooksey, K.E., Peyton, B.M., & Fields, M.W. 2012. Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnology for biofuels*, 5(1): 40.
- Valenzuela, J., Carlson, R.P., Gerlach, R., Cooksey, K., Peyton, B.M., Bothner, B., and Fields, M.W. 2013. Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(15): 7049-7059.
- van Oijen, T., van Leeuwe, M.A., & Gieskes, W.W. 2003. Variation of particulate carbohydrate pools over time and depth in a diatom-dominated plankton community at the Antarctic Polar Front. *Polar Biology*, 26(3): 195-201.
- van Tol, H. M., Amin, S. A., & Armbrust, E. V. 2017. Ubiquitous marine bacterium inhibits diatom cell division. *ISME J.* 11: 31.
- Van Wychen, S., & Laurens, L.M. 2016. Determination of total carbohydrates in algal biomass: laboratory analytical procedure (LAP) (No. NREL/TP-5100-60957). National Renewable Energy Lab. (NREL), Golden, CO (United States).
- Vance, J.E., & Steenbergen, R. 2005. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in lipid research*, 44(4): 207-234.
- Vancoppenolle, M., Meiners, K. M., Michel, C., Bopp, L., Brabant, F., Carnat, G., ... & Van Der Merwe, P. 2013. Role of sea ice in global biogeochemical cycles: emerging views and challenges. *Quaternary science reviews*, 79: 207-230.
- Vårum, K.M., Østgaard, K., & Grimsrud, K. 1986. Diurnal rhythms in carbohydrate metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 102(2-3): 249-256.
- Veuger, B., & van Oevelen, D. 2011. Long-term pigment dynamics and diatom survival in dark sediment. *Limnology Oceanography*, 56: 1065-1074.
- Villanova, V., Fortunato, A.E., Singh, D., Dal, Bo D., Conte, M., Obata, T., ... & Pagliardini, J. 2017. Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 372(1728): 20160404.
- von Dassow, P., Petersen, T. W., Chepurinov, V. A., & Virginia Armbrust, E. 2008. Inter- and intraspecific relationships between nuclear DNA content and cell size in selected members of the centric diatom genus *Thalassiosira* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 44: 335-349.
- von Quillfeldt, C.H. 2000. Common diatom species in arctic spring blooms: their distribution and abundance. *Botanica Marina*, 43(6): 499-516.

- Wagner, H., Jakob, T., Fanesi, A., & 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 B: Biological Sciences*, 372(1728): 20160410.
- Waite, A.A., Thompson, P.A., & Harrison, P.J. 1992. Does energy control the sinking rates of marine diatoms? *Limnology and Oceanography*, 37(3): 468-477.
- Walter, B., Peters, J., & van Beusekom, J.E. 2017. The effect of constant darkness and short light periods on the survival and physiological fitness of two phytoplankton species and their growth potential after re-illumination. *Aquatic Ecology*, 51(4): 591-603.
- Wang, M., Toda, K., Block, A., & Maeda, H.A. 2019. TAT1 and TAT2 tyrosine aminotransferases have both distinct and shared functions in tyrosine metabolism and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(10): 3563-3576.
- Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W., & Welti, R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in lipid research*, 45(3): 250-278.
- Warnes, G. 2014. Measurement of autophagy by flow cytometry. *Current protocols in cytometry*, 68(1): 9-45.
- Wassmann, P. 2011. Arctic marine ecosystems in an era of rapid climate change, *Progress in Oceanography*, (1-4): 1-17.
- Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., ... & Hoefgen, R. 2013. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 162(3): 1290-1310.
- Watmough, N.J., & Frerman, F.E. 2010. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(12): 1910-1916.
- Wen, X., & Klionsky, D.J. 2016. An overview of macroautophagy in yeast. *Journal of molecular biology*, 428(9): 1681-1699.
- Werner, I., Ikävalko, J., & Schünemann, H. 2007. Sea-ice algae in Arctic pack ice during late winter. *Polar Biology*, 30(11): 1493-1504.
- Wilce, R.T. 1967. Heterotrophy in arctic sublittoral seaweeds: an hypothesis. *Botanica Marina*, 10(3-4): 185-197.
- Wulff, A., Roleda, M.Y., Zacher, K., & Wiencke, C. 2008. UV radiation effects on pigments, photosynthetic efficiency and DNA of an Antarctic marine benthic diatom community. *Aquatic Biology*, 3(2): 167-177.
- Xie, Y., Kang, R., Sun, X., Zhong, M., Huang, J., Klionsky, D.J., & Tang, D. 2015. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy. *Autophagy*, 11(1): 28-45.

- Yaffe, M.B., & Elia, A.E. 2001. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Current opinion in cell biology*, 13(2): 131-138.
- Yang, R., & Wei, D. 2020. Improving fucoxanthin production in mixotrophic culture of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* by LED Light shift and nitrogen supplementation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 820.
- Yoneda, K., Yoshida, M., Suzuki, I., Watanabe, M.M. 2016. Identification of a major lipid droplet protein in a marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell Physiology*, 57: 397-406.
- Youle, R.J., & Narendra, D.P. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1): 9-1.
- Young, J.N., Goldman, J.A., Kranz, S.A., Tortell, P.D., Morel, F.M. 2015. Slow carboxylation of Rubisco constrains the rate of carbon fixation during Antarctic phytoplankton blooms. *New Phytologist*, 205: 172-181.
- Zaslavskaja, L.A., Lippmeier, J.C., Kroth, P.G., Grossman, A.R., & Apt, K.E. 2001. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *Journal of Phycology*, 36(2): 379-386.
- Zhang, Q., Gradinger, R., & Spindler, M. 1998. Dark survival of marine microalgae in the high Arctic (Greenland Sea). *Polarforschung*, 65(3): 111-116.
- Zhang, Y., Lu, S., Zhang, C., & Gao, Y. 2010. Distribution and germination of viable diatom resting stage cells in sediments of the East China Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 29(5): 121-128.
- Zhao, L., Dai, J., & Wu, Q. 2014. Autophagy-like processes are involved in lipid droplet degradation in *Auxenochlorella protothecoides* during the heterotrophy-autotrophy transition. *Frontiers in plant science*, 5: 400.
- Zheng, Z., Chen, H., & Du, N. 2019. Characterization of the complete plastid genome of *Fragilariopsis cylindrus*. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(1): 1138-1139.
- Zhuang, X., & Jiang, L. 2019. Chloroplast degradation: multiple routes into the vacuole. *Frontiers in plant science*, 10: 359.
- Zienkiewicz, K., Du, Z.Y., Ma, W., Vollheyde, K., & Benning, C. 2016. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae—molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9): 1269-1281.
- Zulu, N.N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. 2018. Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in lipid research*, 70: 1-16.

Annexe A – Chapitre 1

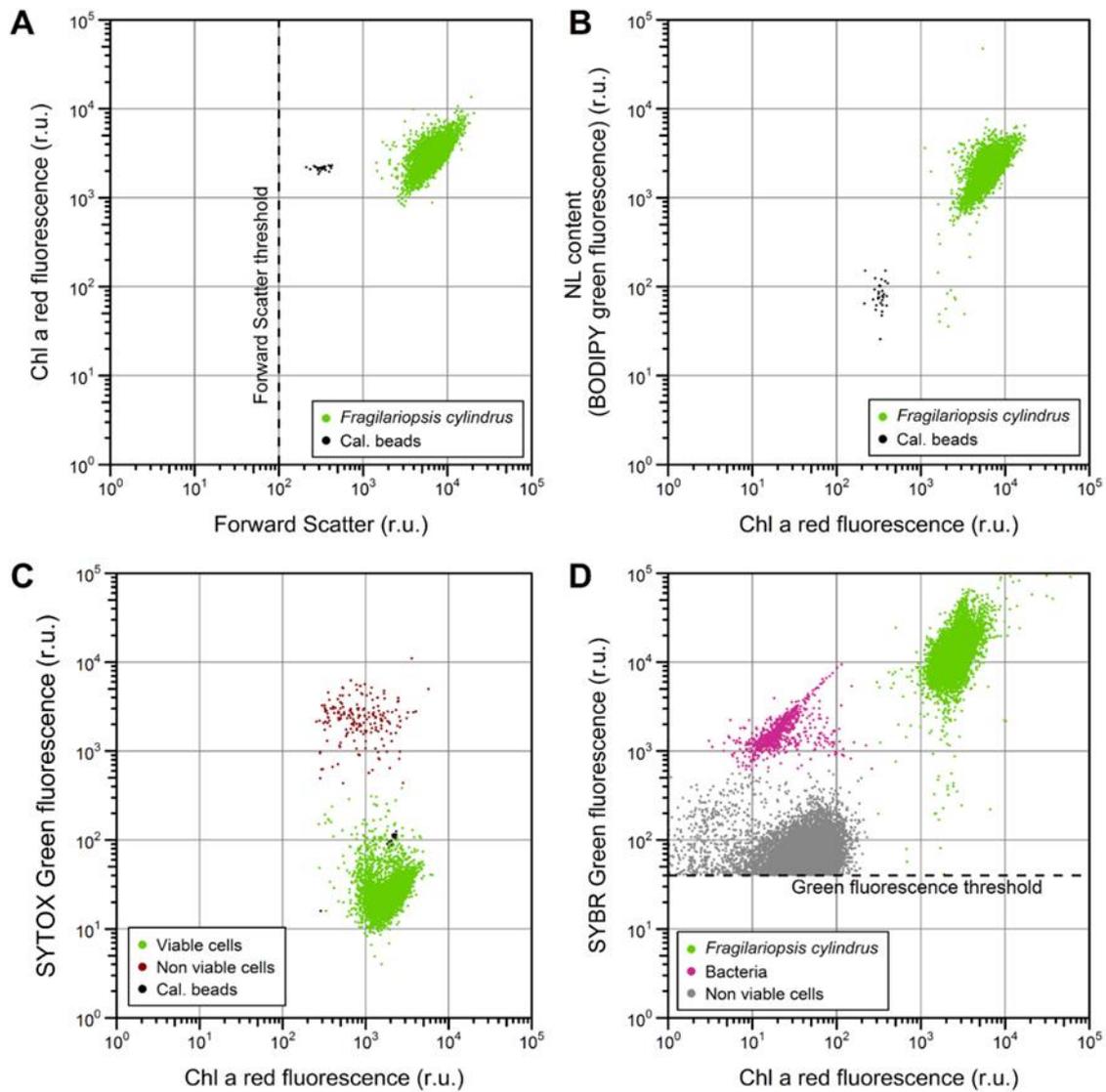


Figure S1. 1. Example of cytograms showing (A) the cell concentration, the red fluorescence and the FSC, (B) the neutral lipids content, (C) the viability, (D) the genetic material fluorescence and to detect the eventual presence of contaminant organisms. Relative units (r.u.).

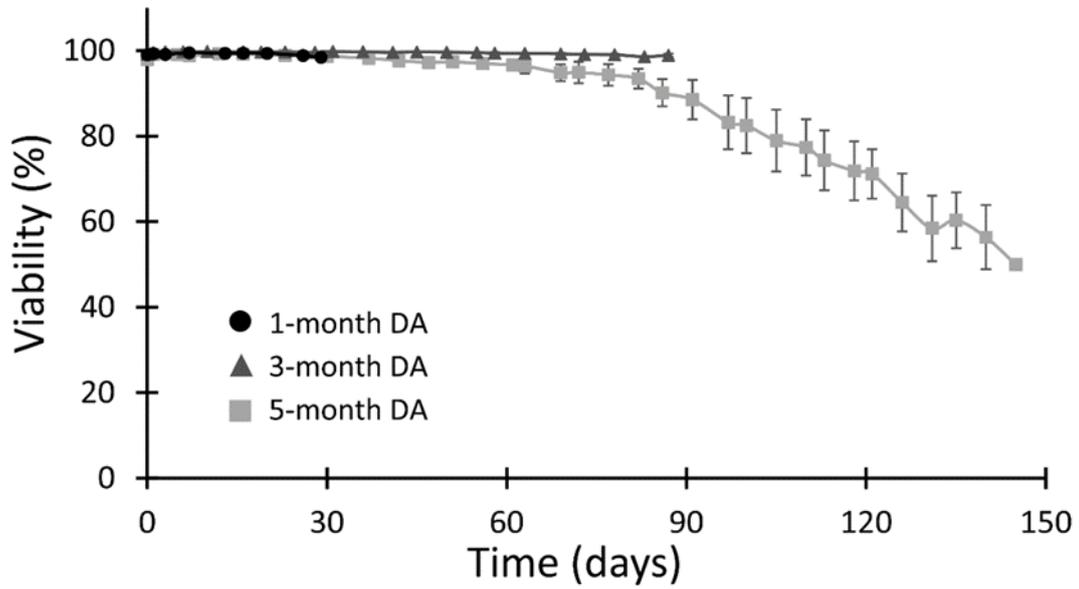


Figure S1. 2. Viability of cultures for each of the three DA before RL estimated with SYTOX Green (i.e. membrane permeability test). Each point is the mean of the technical replicates of all biological replicates ($n = 9$) with their standard deviation as the error bars.

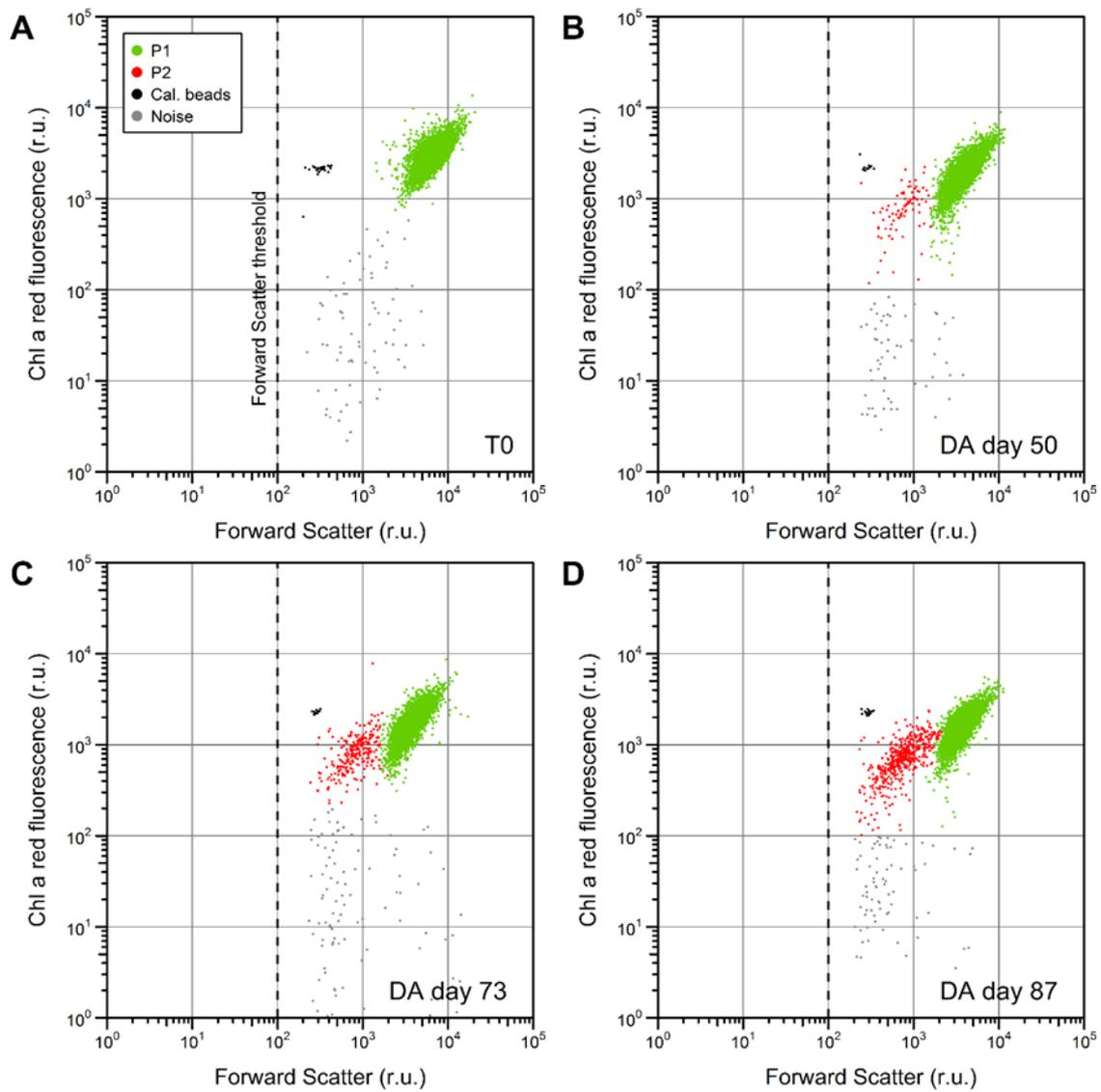


Figure S1.3. Appearance of the P2 population (red) next to the P1 population (green) during DA. The four panels are cytograms selected from all those available and deemed relevant to visually illustrate P2 appearance during DA. Cal. beads = calibration beads. Relative units (r.u.).

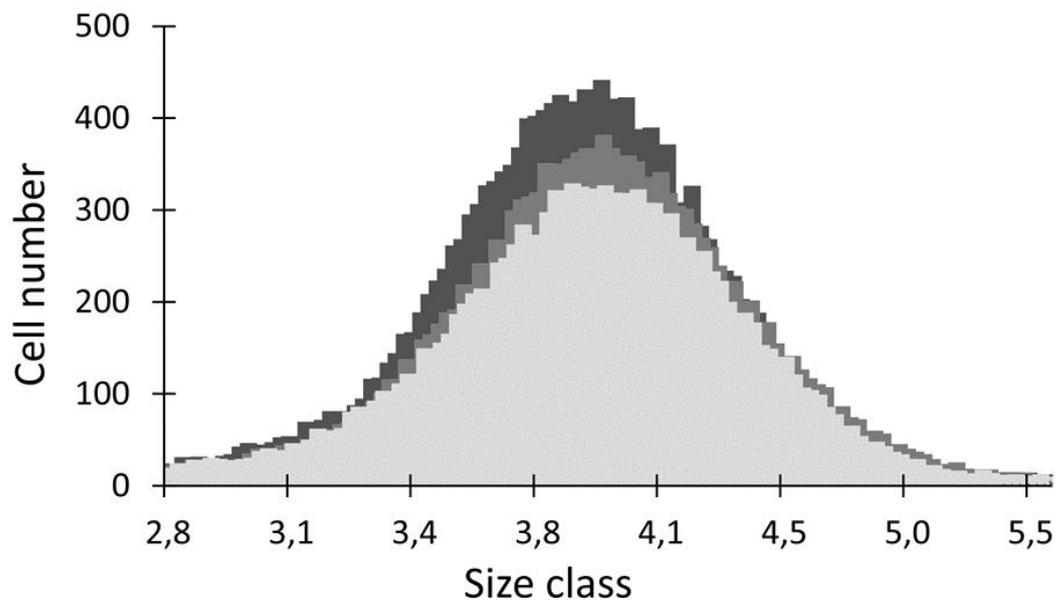


Figure S.1. 4. Size distribution curves of the three cultures of *F. cylindrus* after three months of darkness estimated on the Multisizer 4. For each of the three biological replicates, cell numbers in 12.5 μl are given for each size bean (0.16 μm) between 2.5 and 6 μm . Each point is the mean of three technical replicates ($n = 3$).

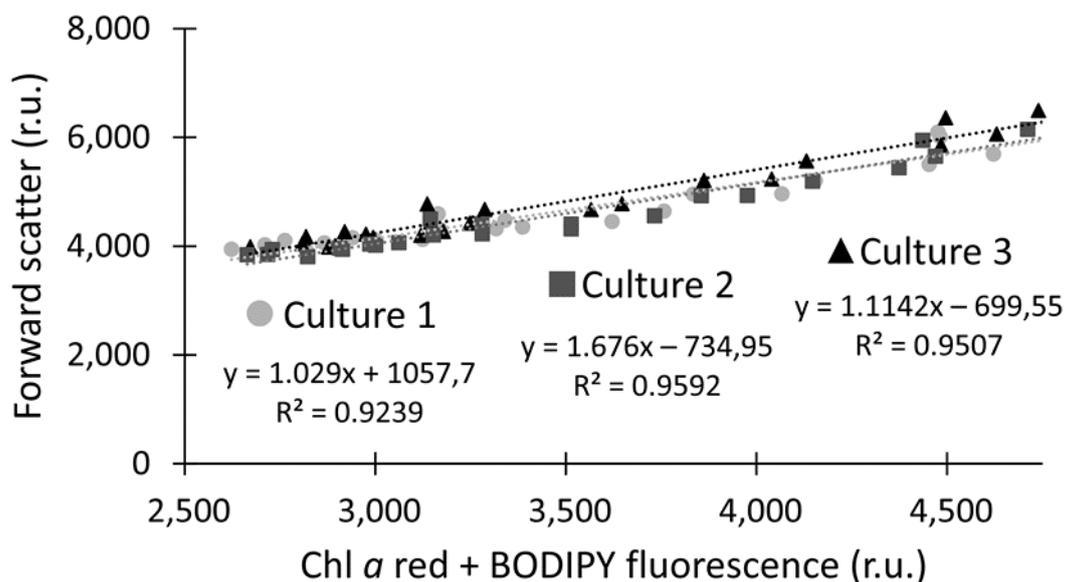


Figure S.1. 5. Linear regression between the FSC and red fluorescence and green fluorescence values of the population containing P1 and P3 showing the dependency of FSC estimations on chl *a* and NL contents in darkness for the 3-month DA cultures. Each point is the mean of the technical replicates for each biological replicate ($n = 3$). Relative units (r.u.).

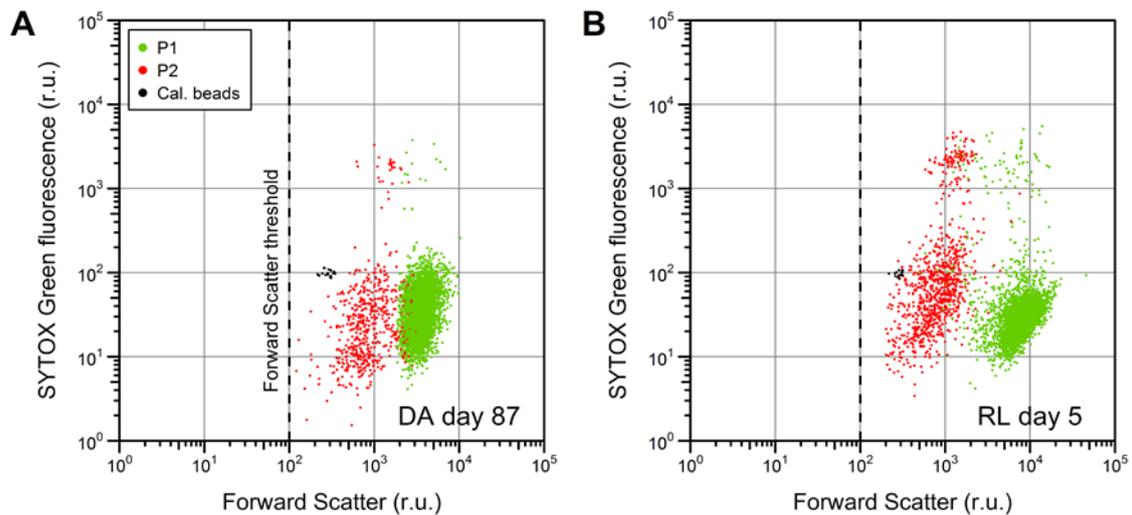


Figure S1. 6. Viability of P1 et 2 stained with SYTOX Green (A) after 3-month DA and (B) after five days of re-illumination. During DA, the majority of P2 was not stained and cells were viable according to the protocol. However, the same cells were also not stained by SYTOX Green during RL, although they underwent significant degradation of their contents after re-exposure to light. Relative units (r.u.).

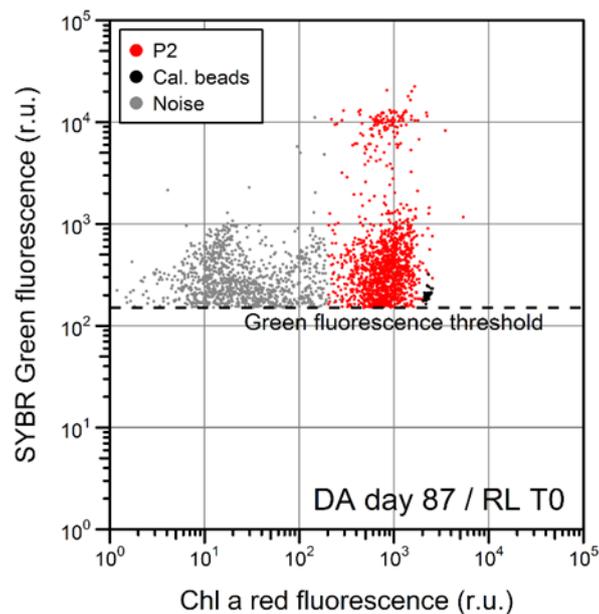


Figure S1. 7. DNA stained with SYBR Green fluorescence pattern of P2. P1 and P3 cells have been removed to better see P2 cells distribution. Because the noise represented an extremely dense cloud of particles, a detection threshold was set on the green fluorescence in order to detect enough *F. cylindrus* cells. Because of this, the P2 population could not be detected in its entirety as some of its cells were characterized by very low SYBR Green fluorescence. Relative units (r.u.).

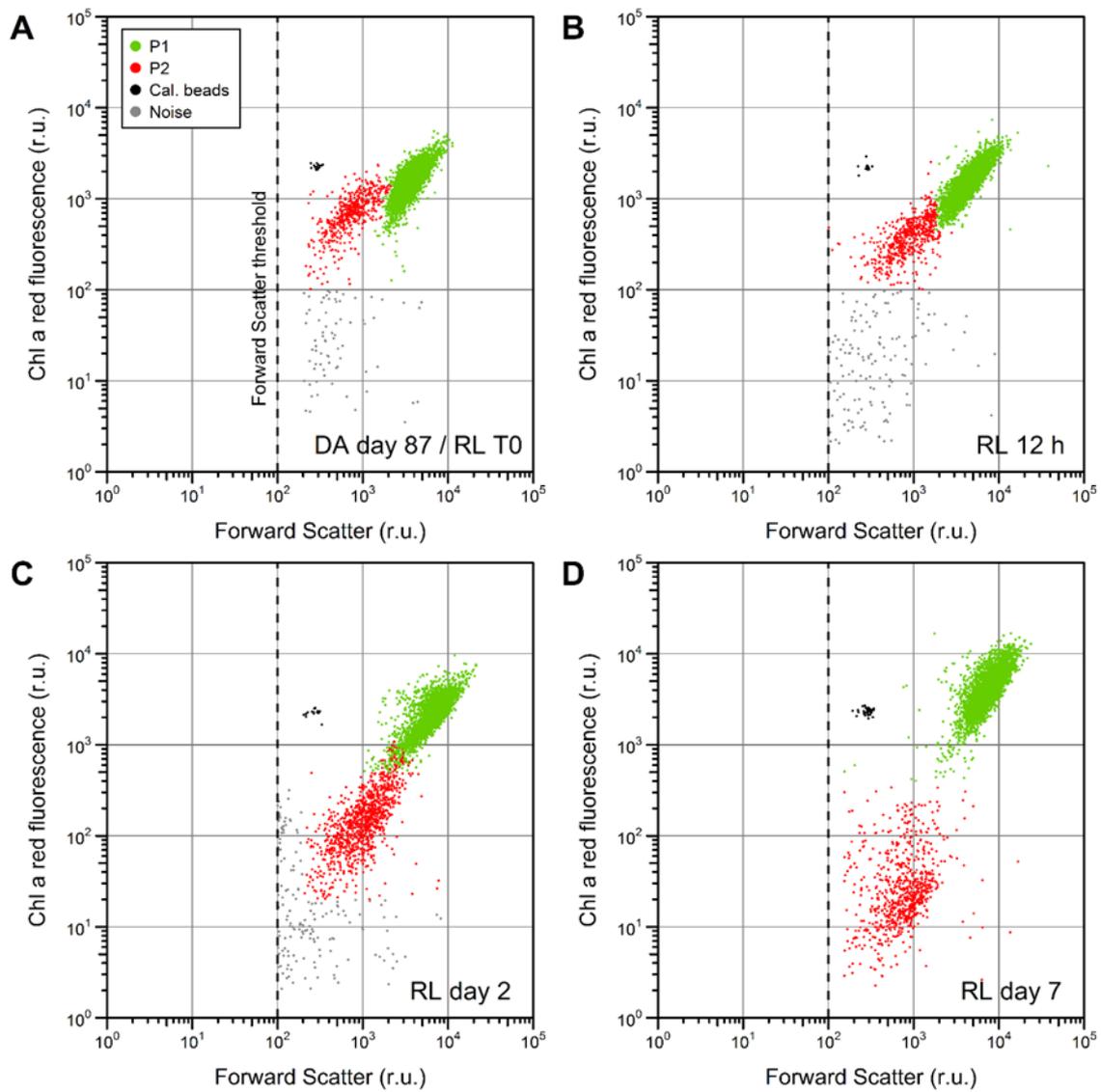


Figure S1. 8. Decrease of the FSC and red fluorescence of P2 cells during RL. The four panels are cytograms selected from all those available and deemed relevant to visually illustrate P2 degradation during RL. Cal. beads = calibration beads. Relative units (r.u.).

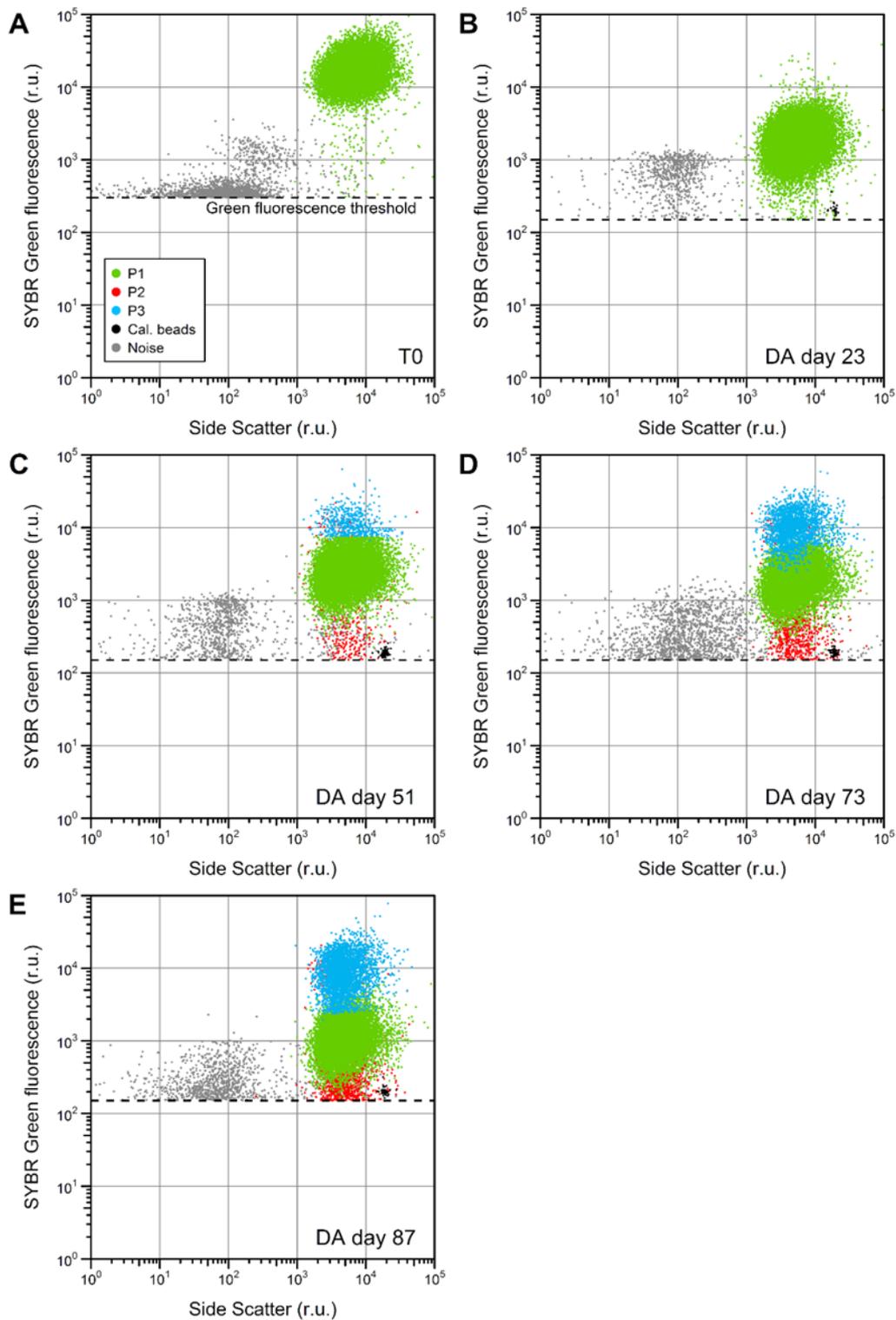


Figure S1. 9. Appearance and development of the P3 population (blue) during DA. The SYBR Green fluorescence of P1 first decreases during the first weeks. After approximately 50 days, cells with very high SYBR Green fluorescence start to appear over P1 and continue to accumulate afterward to form P3. Cells belonging to P2, identified via FSC and red fluorescence values, are also distinguishable from the two other populations and are characterized by a lower SYBR Green fluorescence similar to that of the background noise. The five panels are cytograms selected from

all those available and deemed relevant to visually illustrate P3 appearance during DA. Cal. beads = calibration beads. Relative units (r.u.).

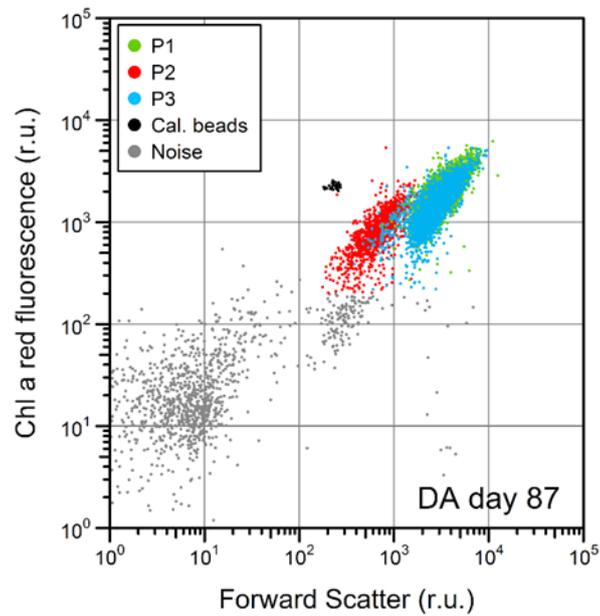


Figure S1. 10. Cytogram showing no differences between P1 and 3 in terms of FSC and red fluorescence at day 87 of DA. Relative units (r.u.).

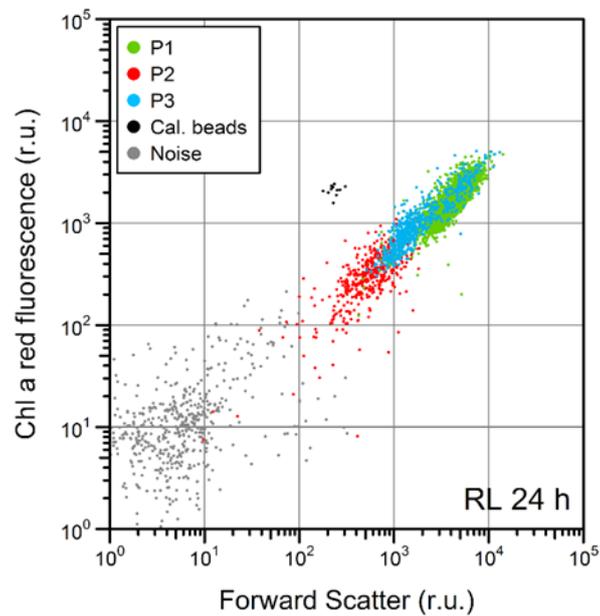


Figure S1. 11. Cytograms showing P3 red fluorescence and FSC decreasing 24 h after RL, rejoining progressively the P2 population. Relative units (r.u.).

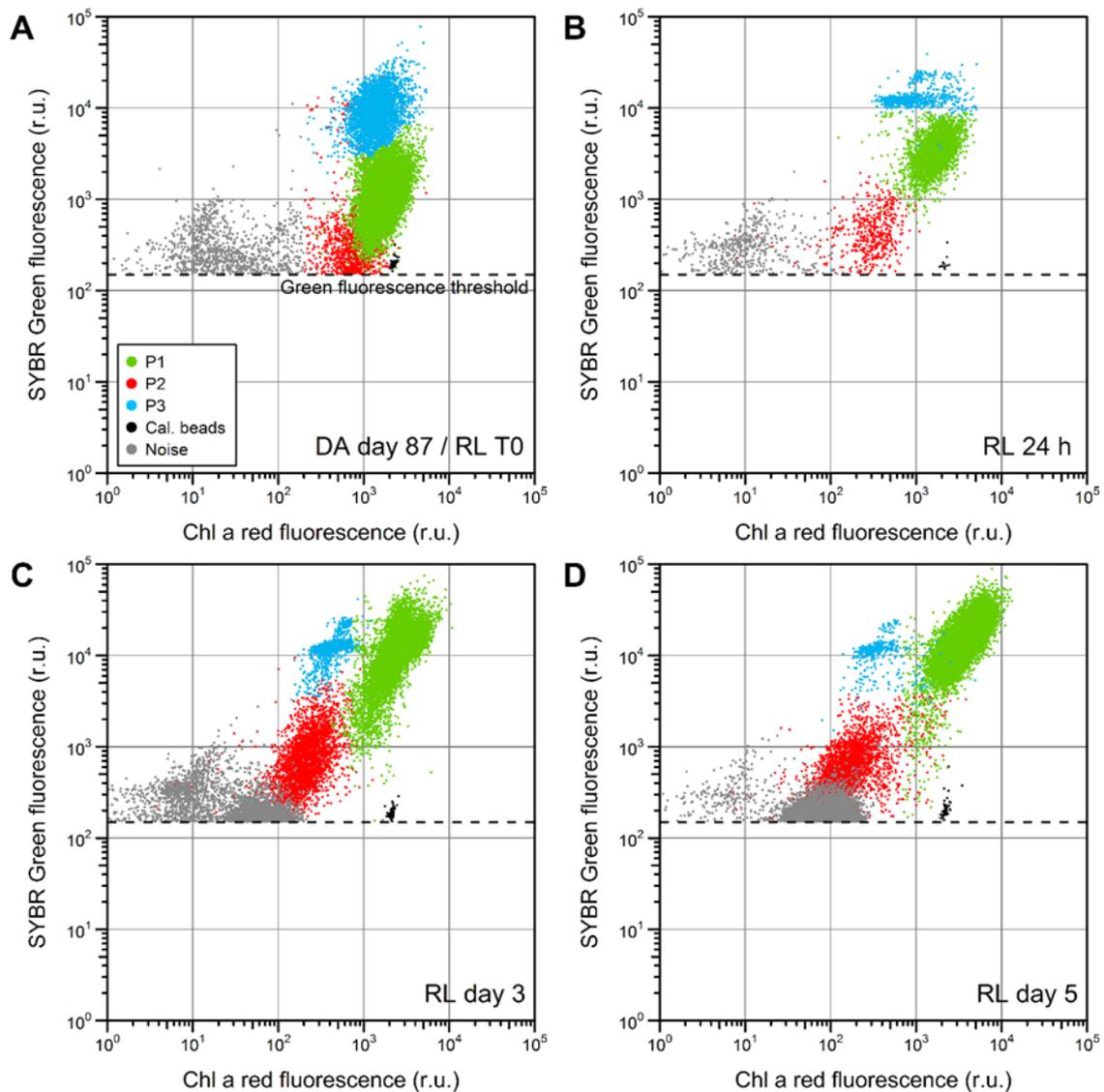


Figure S1. 12. Degradation of the P3 population (blue) during RL. While the red fluorescence of P1 began to increase 8 hours after the start of RL, the red fluorescence of P3 never stopped decreasing. On the third day, the green SYBR fluorescence of P1 had already increased significantly while that of P3 remained unchanged. The cell concentration of the P3 population decreased, whereas the P2 population increased significantly. It is also evident here that P2 cells, losing their red fluorescence, are lost in the background noise, probably composed of the remains of dead cells. Note that only 5,000 events instead of 2,0000 were counted 24 h after RL. The four panels are cytograms selected from all those available and deemed relevant to visually illustrate P3 degradation during DA. Cal. beads = calibration beads. Relative units (r.u.).

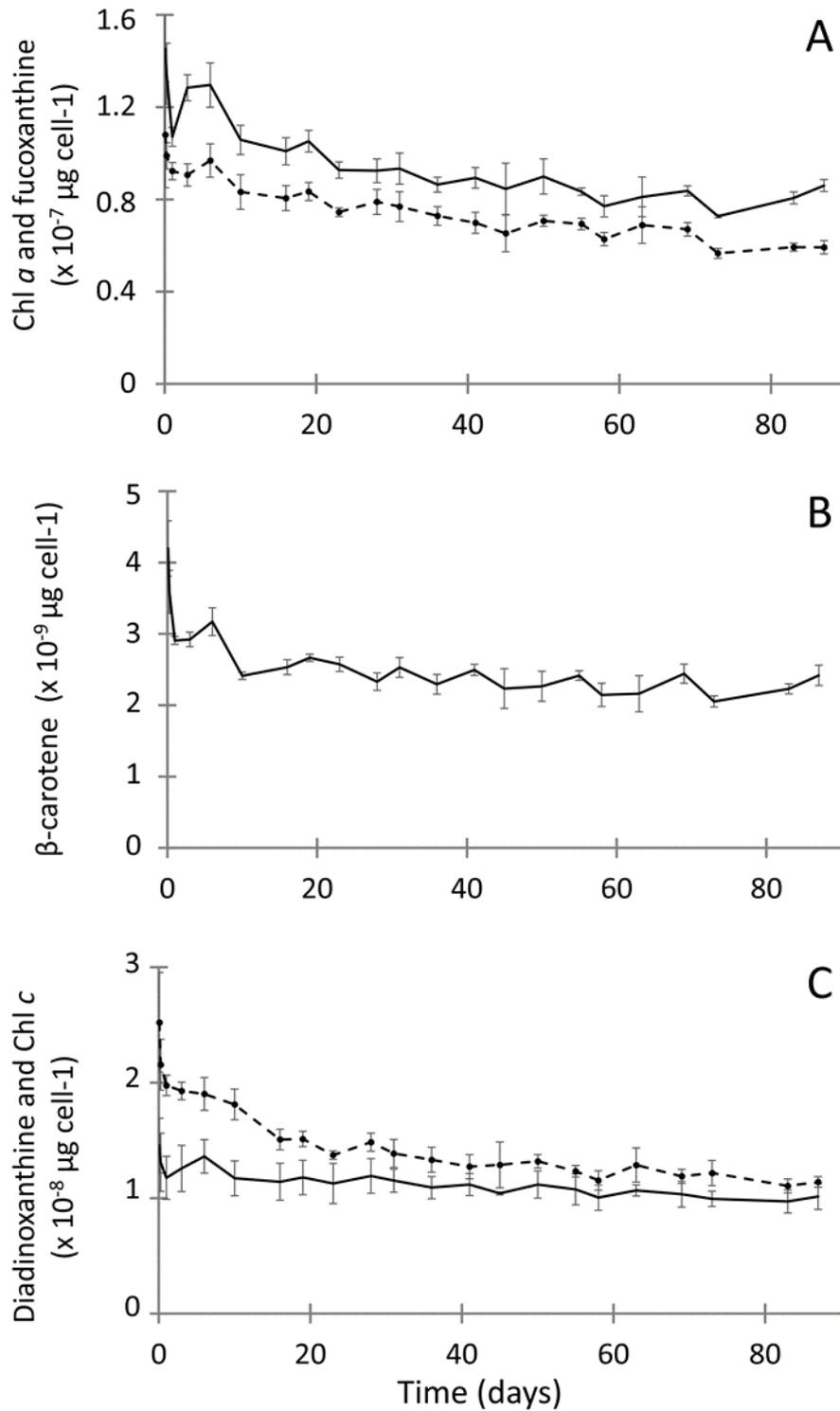


Figure S1.13. Average cell pigment contents during the 3-month DA. (A) Chlorophyll *a* (solid line) and fucoxanthin (dashed line). (B). β -carotenes. (C). Diadinoxanthin (solid line) and Chlorophyll *c* (dashed line). Each point is the mean of the three biological replicates ($n = 3$) with their standard deviation as the error bars.

Annexe B – Chapitre 2

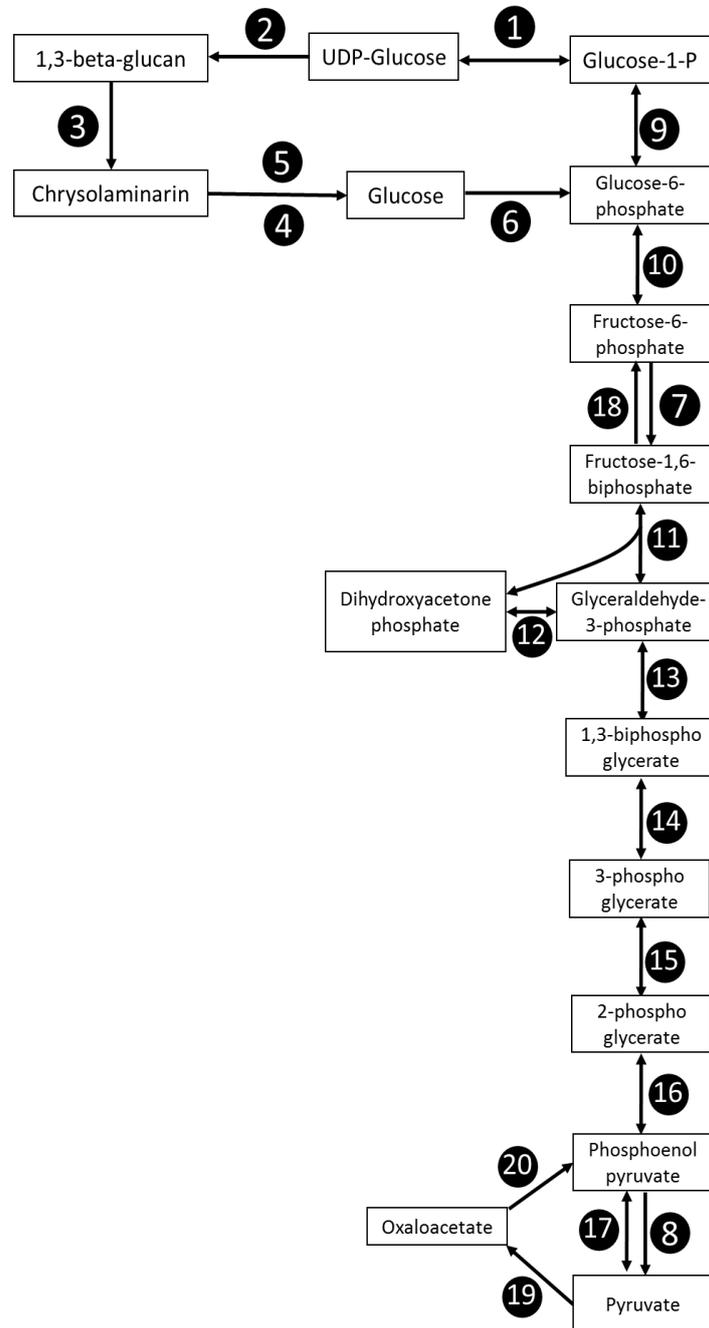


Figure S3. 1. Schematic representation of chrysolaminarin metabolism, gluconeogenesis and glycolysis. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 1. P: phosphate.

Table S3. 1. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the chrysolaminarin metabolism, gluconeogenesis and glycolysis. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 1. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Chrysolaminarin synthesis	UDP-glucose pyrophosphorylase	1	183667	0	0	0	-5.4	-4.3	-5.5	-4	-4.5
			242958	0	0	0	-3.9	-4.1	-4.9	0	-5
			211962	2.31	0	0	0	0	-2.3	-1.9	-4.1
			204039	2.33	0	0	-2.1	-3.4	-3.4	-2.4	-3.2
	1,3-beta-D-glucan synthase	2	146907	0	0	0	-3.2	-5.1	-3.7	-2.2	-4.8
	1,6-β-transglycosylase	3	186340	0	0	0	-2.7	-3.4	-1.9	0	-3.6
			158781	0	0	0	-4.1	-4.3	-3	0	0
			146754	0	0	0	-2.2	-3.1	-2.2	0	-3.3
			149258	0	0	0	-2.6	-3.6	-3.2	0	-3.6
			149475	2.73	0	0	-4.6	-4.3	-5.2	-4.3	-4
Chrysolaminarin degradation	β-glucosidase	4	182486	0	0	0	0	0	0	0	0
			257905	4.08	3.16	0	0	0	-2.2	0	0
			136431	3.97	2.54	0	0	-3.6	-2.5	-2.7	-3.7
			136663	4.23	2.84	0	0	-3.4	-3	-2.8	-2.2
			184113	2.6	0	0	0	0	0	0	-3.6
			229896	0	0	0	0	-3.3	-2.6	0	-4.4
			181839	0	0	0	-2.5	-6.2	-3.7	-2.5	-6.6
			266812	0	0	0	0	-2.2	0	0	-4.3
			238068	2.85	0	0	-2.9	-2.7	-3.3	-3.1	0

	Exo-1,3-beta glucanase	4	207213	3.9	3.19	2.52	0	0	0	0	-2
			210338	3.68	2.89	2.22	0	0	0	0	-2.6
			206507	0	3.07	5.12	0	0	-2.4	0	-2.3
			215534	0	0	3.38	0	0	-2.2	0	-2.4
	Endo-1,3-beta glucanase	4, 5	206115	2.21	0	0	-2.1	-2	-2.4	-2	-4.7
			200557	0	0	0	-4.7	-7.8	-8.1	-7.7	-8.1
			260039	0	0	3.47	0	-3.6	-2.2	0	-6.2
			258720	0	0	0	0	0	0	0	0
			247115	0	0	0	-7.2	-7.9	-8.8	-7.3	-7.3
			247607	0	0	0	-3.3	0	-2.8	0	0
			255357	0	0	0	-3.3	-2.8	-2.9	0	0
			260999	0	0	0	-5.5	-6	-5.8	-2.8	-5.6
	265245	0	0	0	-5.7	-5.7	-5.4	-2.4	-4.3		
Glycolysis (non reversible steps)	Hexokinase (glucokinase)	6	216851	5.48	5.3	4.16	3.33	0	2.12	3.27	0
			192661	5.43	5.41	4.21	3.32	0	2.13	3.21	0
			160331	4.22	3.46	0	0	0	-5.4	-4.2	0
			266757	4.74	4.54	0	0	0	0	0	0
	ATP-PFK1	7	149102	3.82	3.24	0	0	-2.2	-2	0	-3.7
	Pyruvate kinase	8	206568	2.88	2.29	0	0	-2.6	-2.5	0	-4.7
			183459	0	0	0	-3.1	0	-3.7	-2.9	0
			189631	0	0	0	-2.9	0	-3.8	-2.9	0
			195803	4.12	0	3.19	-4.8	-5.5	-6.9	-6.3	-4.1
			225883	0	0	0	0	0	0	0	0

			229842	0	0	0	-2.9	-2.5	-3.8	-2.8	-2.6
			206063	0	0	0	-4.4	-4.8	-5.4	-4.8	-5.7
			274784	0	-3.4	0	-6.1	-5.3	-6.9	-5	-2.3
			262507	0	0	0	-2.7	-1.8	-3.5	-2.1	-3.1
			161430	0	0	0	-5.4	-7.2	-7.3	-8.1	-5.1
Glycolysis and neoglucogenesis (reversible steps)	Phosphoglucomutase	9	276716	2.59	0	0	-5.2	-5.1	-6	-4.9	-4.9
	Glucose-6-phosphate isomerase	10	274454	0	0	0	-4.6	-4.7	-6.8	-5.2	-5.9
			255097	0	0	0	0	0	0	0	-2.6
			157591	0	0	0	0	0	0	0	-2.6
			180623	0	0	0	0	0	0	0	0
			185205	0	0	0	-2.2	-3.4	-2.1	0	-3.2
			227998	0	0	0	-2.6	-3.6	-2.5	0	-3.4
			Fructose biphosphate aldolase	11	191311	3.76	6.33	4.8	5.64	3.79	0
	199285	4.24			4.86	2.44	2.02	0	0	-3.3	-4
	206976	0			0	3.77	-4.2	0	-5	-3.9	-4.1
	270038	0			0	3.76	-4.3	0	-5	-3.9	-4
	179823	0			0	-3.9	-8.8	-6.1	-9.6	-7.2	-5
	272546	0			0	0	-5.3	-4.9	-6.3	-5.1	-5.8
	269285	0			0	0	-4.8	-4	-5.7	-5	-5.9
	Triose-phosphate isomerase	12	269372	0	0	2.68	-2.9	-3	-3.8	-2	-3.9
			272879	0	0	2.37	-3.6	-3	-3.5	0	-3.7
			274452	2.76	2.25	1.72	0	-1.6	-2.5	-1.7	-2.5
			170563	0	0	0	-7.4	-6.8	-8.9	-8.4	-4.9

		174626	0	0	-3.1	-5.9	-6.5	-8.9	-7.4	-4.1
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	173478	2.59	0	0	-6	-3.4	-8.5	-8.3	-6.1
		177007	0	0	0	-6.5	-3.6	-9	-8.4	-6.2
		269867	3.28	2.49	2.09	0	-2.4	-3	0	-4.7
		270428	0	0	2.89	-7.5	0	-9.5	-9.6	-5.4
		272389	0	0	0	-7	0	-9.7	-8.9	-5.5
		275635	0	0	0	-6.3	-3.6	-7.8	-6.6	-6.3
		209715	0	2.8	3.53	0	0	-1.9	0	-3
		266589	0	0	2.9	0	0	-2.5	0	-3.3
		Phosphoglycerate kinase	171765	0	0	3.65	-5.7	-5.1	-9.1	-7.4
	209933		0	0	3.77	-6.2	-4.9	-8.6	-7.7	-5.5
	209502		0	0	0	-4.8	-6.4	-6.5	-5.3	-7.8
	252873		0	0	0	-4.2	-6	-5.3	-4.3	-7.4
	208673		3.79	2.91	2.03	0	0	0	0	-1.6
	278505		3.11	2.35	0	0	0	0	0	-4.5
	210020		0	0	0	-2.5	0	-2.4	0	-3.1
	262813		0	0	0	-2.5	0	-3	0	-4.3
	Phosphoglycerate mutase	211179	0	0	0	-3.5	0	-4.8	-4.7	-4.3
		211438	0	0	0	-3.8	0	-5.1	-4.9	-4.9
		185691	0	0	0	-3.4	-3	-5.2	-5.7	-4.5
		198999	0	0	0	-6.5	-5.7	-7.5	-5	-3.4
		194239	0	0	2.61	-3.1	0	-3.3	0	0
		212304	0	0	2.67	-2.3	0	-3.3	0	0

		185681	0	0	0	0	-3.4	-3	0	-3.8		
		203763	0	0	0	-2.7	-3.8	-3.4	-2.2	-3		
		161213	0	0	0	0	-3.2	-3.7	-2.2	-3.5		
		173652	0	0	-2.6	-5.5	-6.3	-5.1	-4.1	-3.3		
		177229	0	0	0	-5.9	-6.9	-5.5	-4.2	-2.9		
		178750	0	0	0	0	-2.3	-2.1	0	-4.1		
		211467	3.16	4.47	0	0	0	-3.9	-3.7	-3		
		211667	4.25	4.47	0	0	0	-3.7	-3.5	-2.6		
		161031	2.59	0	0	0	0	0	0	-2.9		
		161037	2.98	2.77	0	0	0	0	0	0		
		161224	0	0	0	-4.9	-5.5	-7.2	-5.2	-4.3		
		Enolase	16	168155	0	0	2.34	0	0	-3.7	-3.8	-4.1
				210137	0	0	2.38	-2.2	0	-4.2	-4.3	-4.5
261136	0			0	-3.9	-7.8	-5.7	-8.6	-7.1	-5.5		
184892	0			0	0	-2.2	-3.4	-2.7	0	0		
199088	0			0	0	-3.4	-4.9	-4.5	-2.9	-3		
Pyruvate orthophosphate dikinase	17	225939	0	0	0	-2.6	-3.4	-3.1	0	-3.7		
		252182	0	0	0	-2.7	-3.1	-3.7	-2.6	-3.1		
		233532	3.54	2.5	0	0	0	0	0	-3		
		247496	3.27	0	0	0	0	0	0	0		
		264967	0	0	3.33	0	-5	-5.4	-2.1	-5.9		
		220851	0	0	3.45	0	-5	-5.1	0	-6.2		
		241305	0	0	0	-2.8	-3.7	-3.7	-2.9	0		

			252886	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Neoglucogenesis (non reversible steps)	Fructose-1,6-biphosphatase	18	174198	0	0	0	-5.7	-3.6	-6.4	-5.7	-5.9			
			173983	0	0	0	-6.3	-3.5	-7	-6.2	-5.9			
			181814	0	0	-3.7	-5.9	-5.9	-7.1	-5.4	-5.4			
			170890	0	0	2.87	-4.7	-2.4	-7.8	-6.5	-4.1			
			275433	0	0	2.34	0	-2.4	-4	-3.7	-4.6			
			278189	0	0	0	-2.8	0	-2.5	-2.6	-3			
			158118	2.68	0	0	-1.6	-2.9	-4.2	-3.6	-5.1			
			201390	2.9	0	0	-1.8	-2.1	-3.8	-3.1	-4.4			
			255025	0	0	0	-3.3	-2.4	-3.3	-2.2	0			
			159322	0	0	0	-3.5	-3.1	-2.8	0	-4.7			
			212780	0	0	3	-4.1	0	-4.6	-3.6	-3.4			
			212570	0	0	3.03	-4	0	-4.9	-3.9	-3.5			
				Pyruvate carboxylase	19	189824	4.59	2.83	2.41	0	0	-1.8	0	-3.1
			182998			4.4	2.48	2.15	0	-2.4	-2.2	0	-3.1	
186931	-3	-3.8	0			-6	-5.9	-7.2	-6.3	-5.4				
202035	0	-3.6	0			-7.5	-5.8	-6.2	-6.5	-4.2				
	PEPCK	20	269498	4.08	2.16	3.2	-2	-3.8	-2.3	0	-1.6			
201986			3.81	0	2.9	-2.5	-4.5	-2.7	0	-1.9				

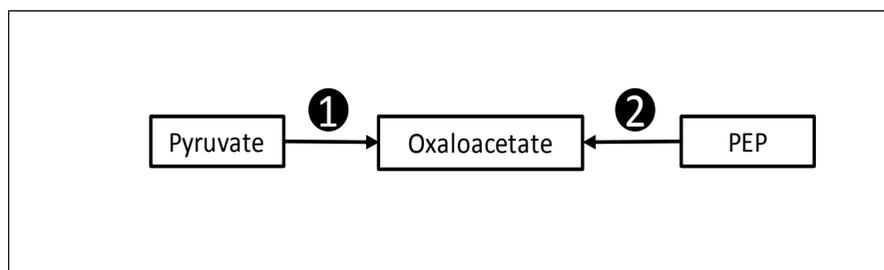


Figure S3. 2. Representation of steps allowing pyruvate and phosphoenolpyruvate into the TCA. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 2. PEP: phosphoenolpyruvate.

Table S3. 2. Differential expression analysis of genes encoding proteins allowing the entrance of pyruvate and phosphoenolpyruvate into the TCA. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 2. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pyruvate and PEP direct entrance into the TCA	Pyruvate carboxylase	1	189824	4.59	2.83	2.41	0	0	-1.8	0	-3.1
			182998	4.4	2.48	2.15	0	-2.4	-2.2	0	-3.1
			186931	-3	-3.8	0	-6	-5.9	-7.2	-6.3	-5.4
			202035	0	-3.6	0	-7.5	-5.8	-6.2	-6.5	-4.2
	PEP carboxylase	2	166717	0	0	0	-5.5	-4.2	-5.5	-5.1	-4.5
			229638	0	0	0	-2.3	0	-3.8	-3.7	-2.9
			187830	0	0	0	-3	-2.2	-3.6	-3.7	-3.5

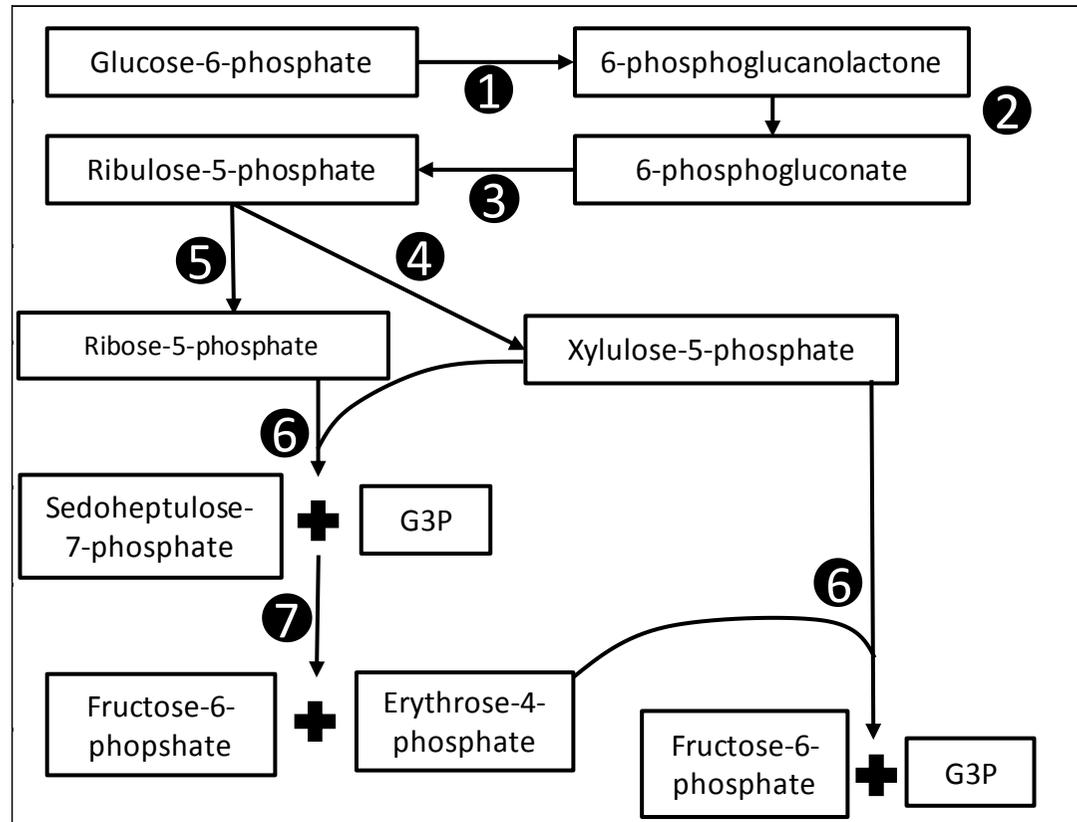


Figure S3. 3. Schematic representation of pentose phosphate pathway. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3.
 3. G3P: glyceraldehyde-3-phosphate.

Table S3. 3. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the pentose phosphate pathway. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 3. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Pentose Phosphate Pathway	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1	207660	3.44	2.85	0	0	0	-2.8	-3.8	-5
			179718	0	2.84	3.37	0	0	0	0	-2.9
	Possible 6-phosphogluconolactonase	2	271518	0	0	0	0	0	-3.3	-3.6	-4.6
			220076	0	0	0	0	0	0	-2.4	-2.5
			259433	3.22	0	0	0	0	-2.2	0	-3.2
	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	3	211512	3.44	3.3	2.11	0	0	-2.8	-6.1	-6.4
			263753	3.71	3.67	2.06	0	0	-2.9	-5.4	-5.9
	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	4	254523	4.99	4.8	3.6	3.05	0	0	2.58	0
			259733	0	0	0	-4.9	-4.7	-5.4	-5.6	-6.5
			273154	0	0	0	-5.6	-4.2	-5.6	-5.9	-5.4
	Ribulose-5-phosphate isomerase	5	207790	2.52	0	0	-3	-2.3	-4.3	-4	-5
			272607	2.76	0	0	-3.4	-3.1	-4.9	-5	-4.7
	Transketolase	6	259678	0	0	0	-6.4	-4.5	-7	-6.6	-6.8
			279206	0	0	0	-6.3	-4.5	-7	-6.6	-6.5
			206407	0	0	0	0	0	-4	-4.5	-4.9
	Transaldolase	7	213583	0	0	0	0	0	-4.2	-5.4	-6.4
			207931	0	0	0	0	-2.5	-4.5	-5.3	-7.1

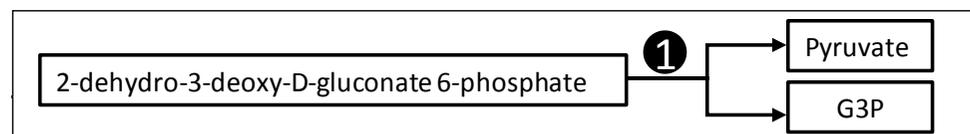


Figure S3. 4. Representation of Entner-Doudoroff pathway last step. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 4. G3P: glyceraldehyde-3-phosphate.

Table S3. 4. Differential expression analysis of the gene encoding the key step in Entner-Doudoroff pathway. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 4. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Enzyme	#	JGI id	Time (days)								
				0.3	1	3	6	16	31	63	87	
Entner-Doudoroff Pathway	KDPG aldolase	1	273054	0	0	2.4	-3.2	0	-5.2	-3.2	-3.2	
			267632	0	0	0	-2.9	0	-4.8	-3.7	-3.4	

Table S3. 5. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in the synthesis of sugar moieties used in exopolysaccharides synthesis. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Enzyme	JGI id	Time (days)								
			0.3	1	3	6	16	31	63	87	
EPS synthesis	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase/phosphoglucomutase fusion protein	197697	0	2.84	2.89	0	0	0	0	0	
		256133	0	0	0	0	0	0	0	0	
		213392	2.64	0	3.27	0	-2.3	-3	0	-2.7	
	Galactokinase	264529	0	0	0	0	0	0	0	0	
		273208	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	213392	2.64	0	3.27	0	-2.3	-3	0	-2.7	

	UDP-glucose/UDP-galactose 4-epimerase	203168	2.81	3.45	0	0	0	0	0	-2.3
		170931	2.31	0	0	0	0	0	0	-3.8
		275222	2.9	0	0	0	0	0	0	0
	UDP-glucose 6-dehydrogenase	215451	0	0	2.79	0	0	-4.9	-4.6	-4.2
		271881	0	0	2.24	0	0	-5	-5.2	-5.3
	UDP-glucuronate 4-epimerase	267198	0	0	0	-5.1	-3.7	-9	-8.4	-7
		216018	0	0	2.39	0	-2.2	-3.6	-3	-5.4
		279148	0	0	2.3	0	-2.5	-4	-3.3	-5.7
	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	196825	0	0	0	-4.2	-4.5	-5.7	-3.5	-3.6
		257303	0	0	0	0	-2.8	-3.4	0	-2.4
		170452	0	-3.7	-4.5	-6.8	-7.6	-9.4	-7.6	-7.4
		176468	0	0	-3	-5.4	-6.1	-7.3	-6.2	-6.5
		268332	0	0	0	-2.2	0	-5.1	-5	-5.8
		270043	0	0	0	-2	0	-4.7	-4.7	-6.2
	bifunctional dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerased / TDP-4-dehydrorhamnose reductase	191088	0	-5.9	-5	-5.1	-7.6	-9.4	-7.7	-6.8
		199348	0	-4.6	-3.6	-5.2	-7	-9.2	-7.5	-6.3
	Mannose-6-phosphate isomerase	274588	0	0	3.11	0	-2.3	-3	0	-4.2
	Phosphomannomutase	237644	0	0	3.22	-2.6	0	-2.5	0	0
		200277	0	0	0	-3.8	0	-5.4	0	0
		267260	0	-3.3	-2.8	-5.6	-4.7	-5.9	-5.1	-6.2
GDP-mannose 4,6-dehydratase	206067	0	-4.6	-4.4	-6.6	-5.2	-9.2	-8	-6.8	
Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase	186511	0	-4.1	-5.6	-6.4	-6.6	-9.3	-7.5	-4.8	
	231027	0	-4.5	-7.5	-7	-6.4	-8.8	-7.3	-4.9	

	Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase	253792	0	0	0	-3.5	-3.2	-3.3	0	-4.6
		273617	0	0	0	0	0	-2	0	-4.3
		269632	0	0	0	0	0	0	0	0
	Phosphoacetylglucosamine mutase	157080	0	0	0	0	0	0	0	-4.2
		194068	0	0	0	0	0	0	0	0
	UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/ UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	209086	0	0	0	0	0	-2.6	0	-3.5
		214147	0	0	0	0	0	-2.4	0	-3
	Chitin synthase	197697	0	2.84	2.89	0	0	0	0	0
		256133	0	0	0	0	0	0	0	0

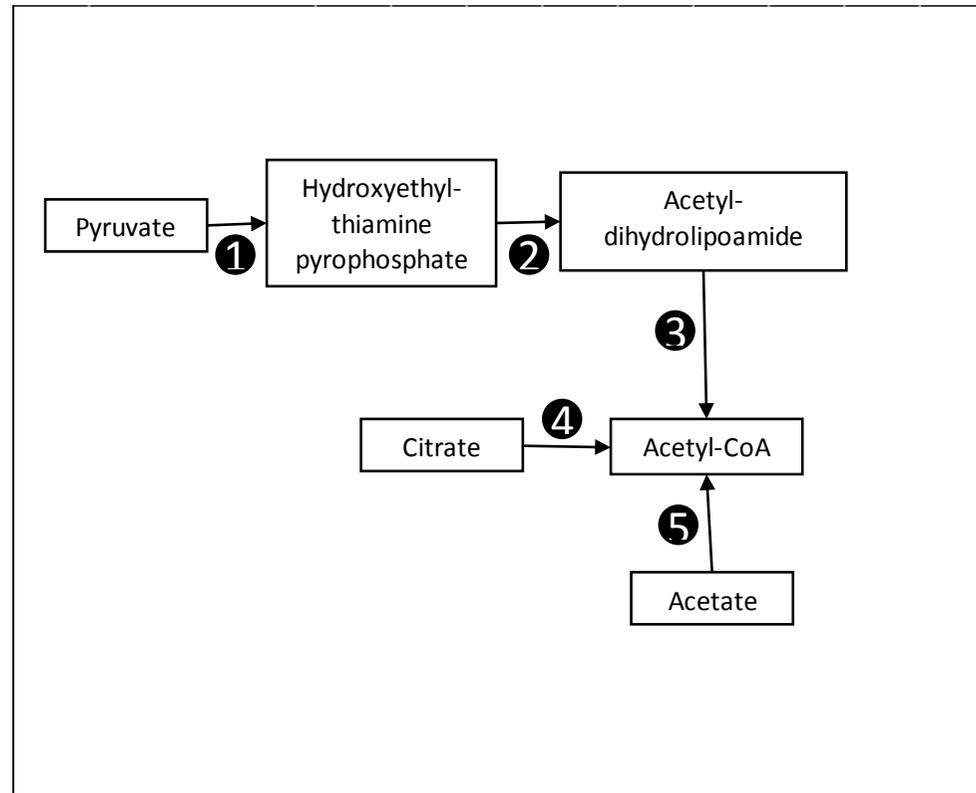


Figure S3. 6. Schematic representation of the steps allowing the production of acetyl-CoA. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 6.

Table S3. 6. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in acetyl-CoA synthesis. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 6. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column. PDC: pyruvate dehydrogenase complex.

	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
Pathway	Enzyme	#	JGI id	L2FC							

Acetyl-CoA production from pyruvate, TCA and acetate	Pyruvate dehydrogenase (PDC E1)	Subunit α	1	187383	0	0	0	-3.22	-3.19	-3.67	-2.33	-4.24
				193273	0	0	0	-3.65	-3	-3.62	-2.31	-4.49
		263399		0	0	2.879	-3.89	0	-4.86	-3.03	-2.65	
		225175		0	0	0	-2.32	-2.42	-2.94	-2.09	-5.13	
		161930		0	0	0	-2.57	-3.98	-3.66	-2.37	-4.35	
	Dihydrolipoamide acetyltransferase (PDC E2)	2		166615	0	0	0	-7.99	-6.13	-8.64	-8.56	-5.32
				170993	0	0	-3.67	-6.31	-4.54	-5.38	-3.84	-4.49
				177421	0	0	-2.47	-5.37	-3.24	-4.15	-2.78	-3.89
				180836	0	0	0	-3.01	-2.2	-2.97	0	-3.52
				199754	0	0	0	-3.96	-2.52	-3.4	0	-3.68
	Dihydrolipoyl dehydrogenase (PDC E3)	3		271375	0	0	0	-2.17	-3.19	-3.22	-2.74	-3.86
				223069	0	0	0	0	0	0	0	0
				186500	0	0	0	-3.54	-3.1	-5.29	-4.86	-3.13
				254981	0	0	0	-4.11	-4.33	-5.12	-3.89	-4.95
	ATP-citrate lyase	4		212647	3.665	2.523	2.162	0	0	0	0	-3.15
				174598	4.835	3.958	3.331	0	0	0	0	-1.92
	Acetyl-CoA synthetase	5		224808	0	0	0	-4.98	-4.38	-5.7	-3.98	-3.37
				227019	-2.81	-2.76	-3.6	-6.17	-5.49	-6.97	-5.67	-4.09
				239808	0	0	0	-2.63	-3.1	-3.01	0	-4.8
	Mitochondrial PDC											
Chloroplastic PDC												

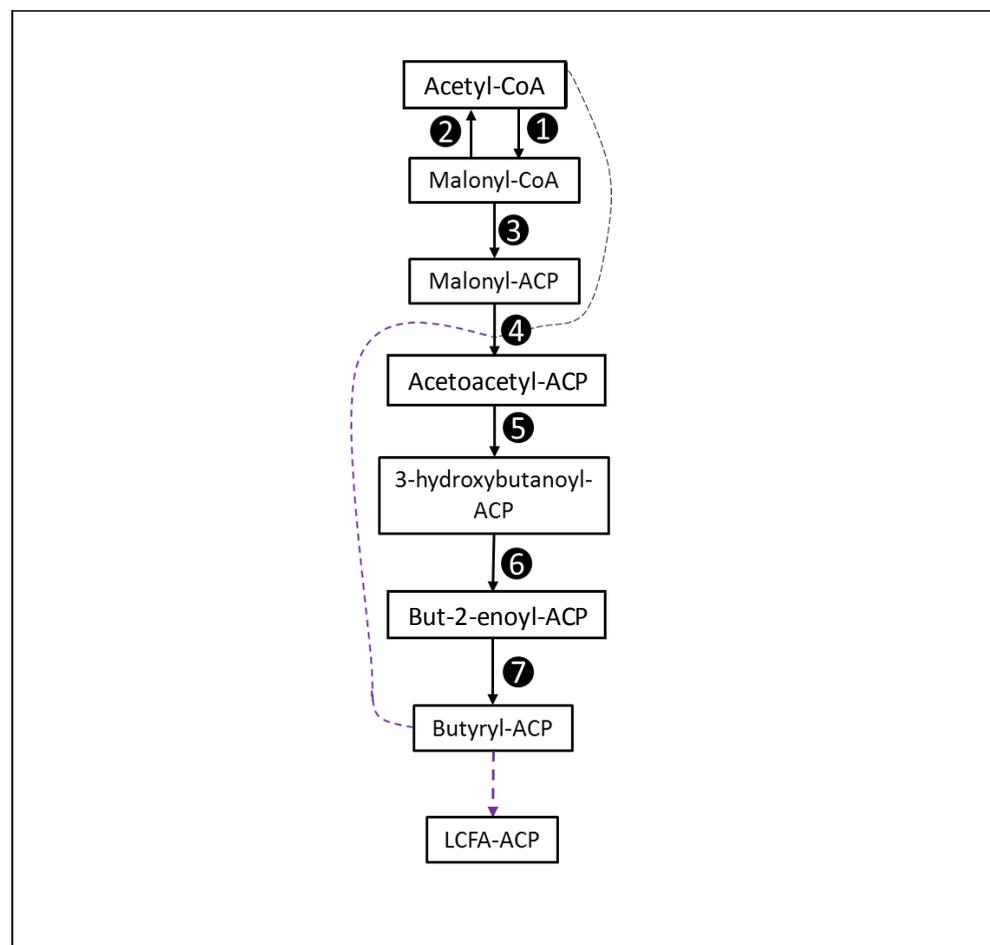


Figure S3. 7. Schematic representation of FASII. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 7.

Table S3. 7. Differential expression analysis of genes encoding proteins belonging to FASII. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 7. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column. LFCA: long chain fatty acid.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
FASII	Acetyl-CoA carboxylase	1	274583	3	0	0	-4.35	-4.58	-6.53	-5.38	-5.77
	Malonyl-CoA decarboxylase	2	140481	0	0	0	-4.48	-5.04	-3.93	-3.16	-3.96
	Malonyl-CoA ACP transacylase	3	206236	0	0	0	-5.86	-4.82	-8.72	-7.27	-6.16
			213818	0	0	0	-5.98	-4.39	-8.38	-6.9	-5.9
	β - ketoacyl-ACP synthase	4	274965	0	-4.65	-3.31	-7.11	-5.4	-7.8	-6.6	-3.85
			227244	0	-4.27	-4.68	-8.1	-6.39	-10.3	-8.32	-5.5
			273692	0	0	3.105	-3.59	0	-3.88	0	-3.11
			205732	0	0	3.234	-3.24	0	-3.86	0	-3.08
			228745	0	0	0	-7.76	-4.52	-8.93	-6.6	-4.66
			271240	2	0	0	0	-3.06	-1.96	0	-3.02
			273623	0	0	0	-1.94	-3.2	-2.51	0	-3.19
			260660	0	0	0	-6.52	-5.92	-7.32	-4.69	-4.93
	276386	0	-2.81	0	-7.4	-7.22	-9.33	-6.38	-5.5		
	β - ketoacyl-ACP reductase	5	188091	0	0	0	-3	0	-4.68	-4.49	-3.64
			198108	0	0	0	-5.82	-4.48	-7.21	-6.72	-3.88
			232706	0	0	0	0	0	0	0	-2.72
			257520	0	0	0	0	0	0	0	-2.24
	β -hydroxyacyl-ACP-deshydratase	6	234205	0	0	3.864	-3.37	0	-4.95	-3.19	-3.85
			273974	0	0	0	-7.57	-7.52	-9.34	-7.04	-5.63
	Enoyl-ACP reductae	7	173527	0	-4.57	0	-8.74	-6.46	-9.89	-8.42	-5.57
273196			0	-4.12	0	-8.9	-6.4	-9.62	-7.72	-5.26	

		232542	0	0	0	0	0	-2.22	0	-3.95
--	--	--------	---	---	---	---	---	-------	---	-------

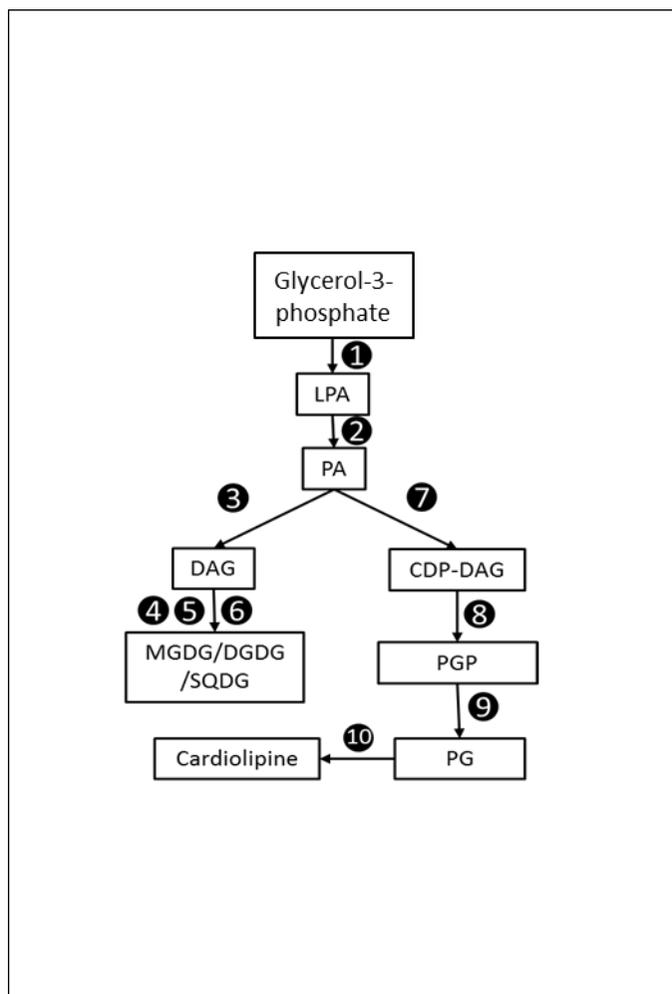


Figure S3. 8. Schematic representation of the procaryotic pathway of glycerolipids synthesis. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 8. DAG: diacylglycerol; DGDG: digalactosyldiacylglycerol; LPA: lysophosphatidic acid; MGDG: monogalactosyldiacylglycerol; PA: phosphatidic acid; PG: phosphatidylglycerol; PGP: phosphatidylglycerol phosphate; SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerol.

Table S3. 8. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the prokaryotic pathway of glycerolipids synthesis. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 8. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Glycerolipids synthesis, prokaryotic route	Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase	1	158787	0	0	4.856	-2.37	0	-3.15	0	0
			158788	0	0	4.839	-2.32	0	-2.9	0	0
	LPA acyltransferase	2	190651	0	0	0	-5.78	-4.37	-5.39	-3.11	-4.7
			189436	0	0	0	-5.64	-4.43	-5.55	-3.31	-4.92
	Phosphatidate phosphatase	3	256838	0	0	0	0	0	-2.35	0	-2.9
	MGDG synthase	4	198887	0	0	0	-3.97	-2.82	-3.93	-2.51	-4.05
			275442	0	0	0	0	0	-2.63	0	-2.96
			278198	0	0	0	0	-2.51	-3.03	0	-2.04
	DGDG synthase	5	138778	0	0	0	-3.32	-4.73	-3.59	-2.04	-3.71
			138807	0	0	0	-2.48	-4.52	-3.36	0	-3.03
			194825	2.44	0	2.713	0	0	0	0	-3.13
			138536	0	0	0	0	-2.73	-2.78	-2.81	-4.11
	SQDG synthase	6	207999	0	0	0	-2.21	0	-2.55	-2.16	-4.39
			158007	3.099	0	0	0	0	0	0	0
			158006	2.438	0	0	0	-2.86	-2.65	0	0
			262455	2.159	0	2.162	0	-2.41	0	0	-4.73
			262828	0	0	2.101	0	-3.06	0	0	-5.55
			268690	0	0	0	-5.37	-5.8	-6.35	-4.13	-5.84
	215561	0	0	0	-4.92	-5.52	-6.25	-4.2	-5.57		
	Phosphatidate cytidylyltransferase	7	229525	0	0	0	-3.27	-2.79	-2.57	0	-4.81

		164141	0	0	0	-2.21	0	-3.72	-2.81	-3.35
		154534	0	0	0	-3.91	-4.26	-7.43	-5.15	-3.99
		264457	0	0	0	0	0	0	0	-2.43
		256620	0	0	0	0	0	0	0	-2.85
		264064	0	0	2.43	0	0	-1.95	0	-4.17
		254333	0	0	0	0	0	0	0	-3.89
	Phosphatidylglycerol-phosphate synthase	162916	2.799	0	0	-3.21	-4.75	-4.42	-2.33	-5
		244906	0	0	0	0	0	0	0	0
		245821	0	0	0	0	-2.63	-3.88	-3.47	0
	PGP phosphatase	185515	0	0	-4.72	-6.34	-5.81	-6.39	-6.06	-4.55
		230110	0	0	-3.2	-7.01	-6.28	-6.86	-7.04	-4.01
	Cardiolipine synthase	153122	0	0	0	0	0	0	0	-3.56
		162874	0	0	0	0	0	-2.52	0	-3.25

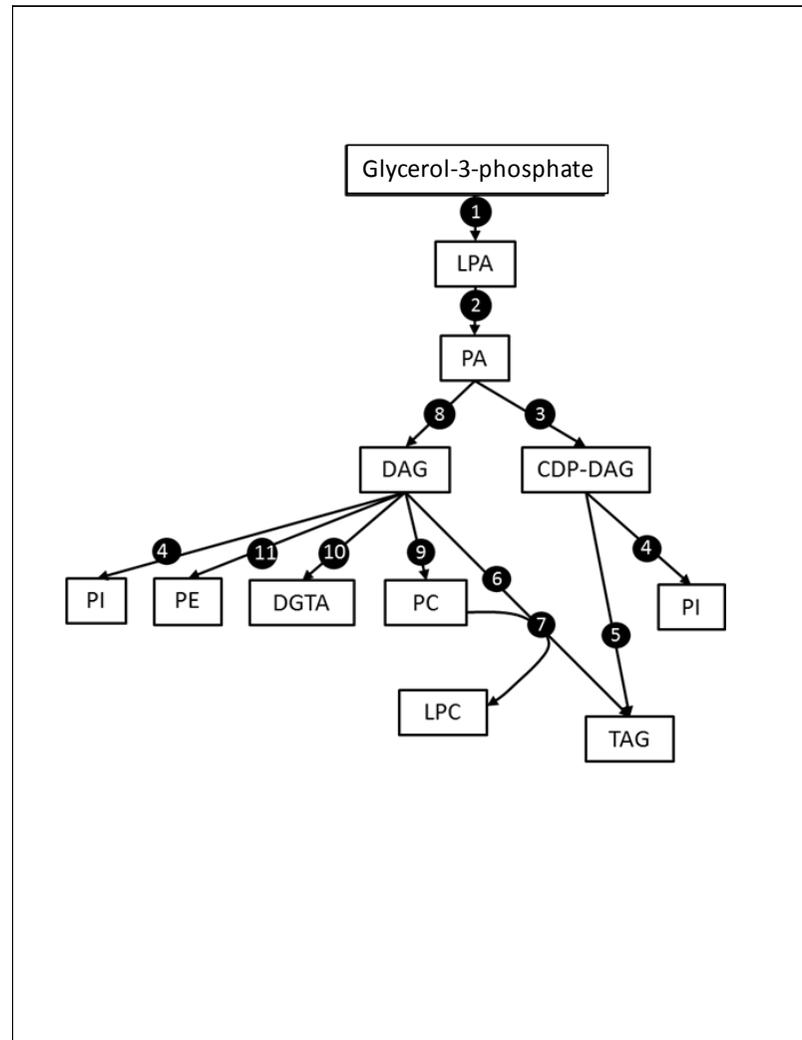


Figure S3. 9. Schematic representation of the eukaryotic pathway of glycerolipids synthesis. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 9. DAG: diacylglycerol; DGTA: diacylglyceryl hydroxymethyltrimethyl- β -alanine; LPA: lysophosphatidic acid; LPC:

lysophosphatidyl choline; PA: phosphatidic acid; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine; PI: phosphatidylinositol phosphate; TAG: triglyceride.

Table S3. 9. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the eukaryotic pathway of glycerolipids synthesis. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 9. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87	
	Enzyme	#	JGI id	L2FC								
Glycerolipids synthesis, eukaryotic route	G3P O-acyltransferase	1	180963	4.48	4.58	4.88	3.313	0	2.42	3.315	0	
	LPA acyltransferase	2	262521	0	0	0	0	0	0	0	0	
			260417	0	0	0	0	0	0	0		
			152960	0	0	0	0	0	-2.33	0	-4.53	
			152950	0	0	0	0	0	-2.25	0	-4.92	
	CDP-DAG synthase	3	162916	2.799	0	0	-3.21	-4.75	-4.42	-2.33	-5	
	PI synthase	4	212958	0	0	0	-2.27	-2.21	-3.78	-2.88	-4.84	
	O-acyltransferase	5	171937	2.493	2.383	0	0	0	0	0	0	-2.21
			276226	0	0	0	0	-2.73	0	0	-2.23	
	Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase	6	182857	4.102	2.765	0	0	0	0	0	0	-3.33
			140159	4.578	3.051	0	0	0	0	0	0	-2.4
			191238	0	0	0	-4.43	-3.22	-4.44	-5.03	-6.77	
			199405	0	0	0	-4.54	-3.41	-4.98	-5.88	-6.62	
			232054	0	0	2.278	-2.04	-2.78	-1.86	0	-3.23	
			233977	0	0	2.289	-2.88	-3.6	-3.15	0	-3.57	
247447	0	0	0	0	0	-3.34	0	0				
	7	166543	3.085	2.676	3.098	0	0	0	0	-3.14		

	Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase		203865	2.894	2.21	2.505	0	0	-1.66	0	-2.15
	Phosphatidate phosphatase	8	161649	0	0	2.699	0	-5.78	-7.53	-7.6	-8.53
			149305	0	0	0	-3.47	-4.11	-3.87	-2.48	-4.31
			139431	0	0	0	-3.74	-3.48	-2.91	0	-3.78
			154642	0	0	0	-1.93	-3	-3.44	-1.92	-4.87
			154638	0	0	2.023	0	-2.32	-2.76	0	-4.83
	DAG cholinephosphotransferase	9	147839	0	0	0	-2.65	0	-2.16	0	-2.32
			157499	0	0	0	0	0	0	0	-2.74
			141457	0	0	0	-3.67	-5.11	-4.5	-4.17	-6.2
	DGTA synthase	10	225753	0	0	0	-2.18	-2.39	-2.94	0	-3.75
	Ethanolamine kinase	11	180508	0	0	0	0	0	-4.01	0	0
			140173	0	0	0	0	-3.13	-5.01	-4.01	0

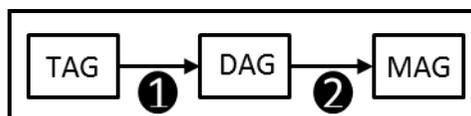


Figure S3. 10. Schematic representation of lipolysis. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 10. DAG: diacylglycerol; MAG: monoacylglycerol; TAG: triacylglycerol.

Table S3. 10. Differential expression analysis of genes encoding proteins of the lipolysis. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 10. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Lypolysis	TAG/DAG lipase	1	178296	2.43	0	0	0	-4.31	-2.25	0	-4.02
			278608	0	0	0	0	0	0	0	
			165718	0	0	0	0	-2.67	-2.42	0	-3.99
			182179	0	0	0	-2.32	-3.37	-2.06	0	-2.32
			192423	2.058	0	0	-2.24	-3.24	-2	0	-2.5
	MAG lipase	2	188744	0	0	0	-2.27	-1.61	-2.73	-1.54	-2.69
			151319	0	0	0	-2.28	-1.69	-2.75	0	-2.67

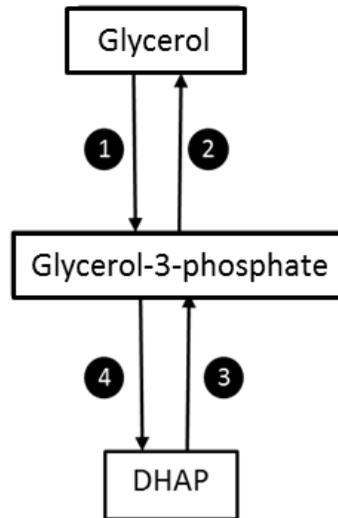


Figure S3. 11. Schematic representation of steps linking glycerolipid and carbohydrate metabolisms *via* glycerol-3-phosphate. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 11. DHAP: dihydroxyacetone phosphate.

Table S3. 11. Differential expression analysis of genes encoding proteins allowing the reverse conversion of glycerol to dihydroxyacetone phosphate *via* glycerol-3-phosphate. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 11. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87	
	Enzyme	#	JGI id	L2FC								
Glycerol links glycerolipids and sugar metabolisms	Glycerol kinase	1	209415	0	0	0	-2.55	-2.53	-3.19	0	-4.51	
			277902	2.765	0	0	0	0	-4.05	-3.07	-2.95	
			186201	2.94	0	0	0	0	-2.17	-2.44	-3.74	
			198579	3.083	0	0	0	0	0	0	-2.59	
			231809	0	0	0	-3.9	-4.18	-3.43	-3.05	-5.63	
			248812	0	0	0	-3.03	-3.15	-2.88	-2.07	-4.88	
	Glycerol-3-phosphatase	2	189181	0	0	0	-2.26	0	-2.53	0	0	
			190540	0	0	0	-2.97	0	-3.47	-2.46	0	
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasmic	3	207939	0	0	2.328	0	-2.63	-2.15	0	-4.23
				278877	0	0	2.733	0	-2.84	-2.53	-1.97	-4.98
		Chloroplastic	3	180647	0	-3.82	-3.12	-5.57	-5.5	-6.2	-5.09	-6.24
		Mitochondrial	4	276098	0	0	0	-4.6	-3.84	-6.25	-5.07	-5.25

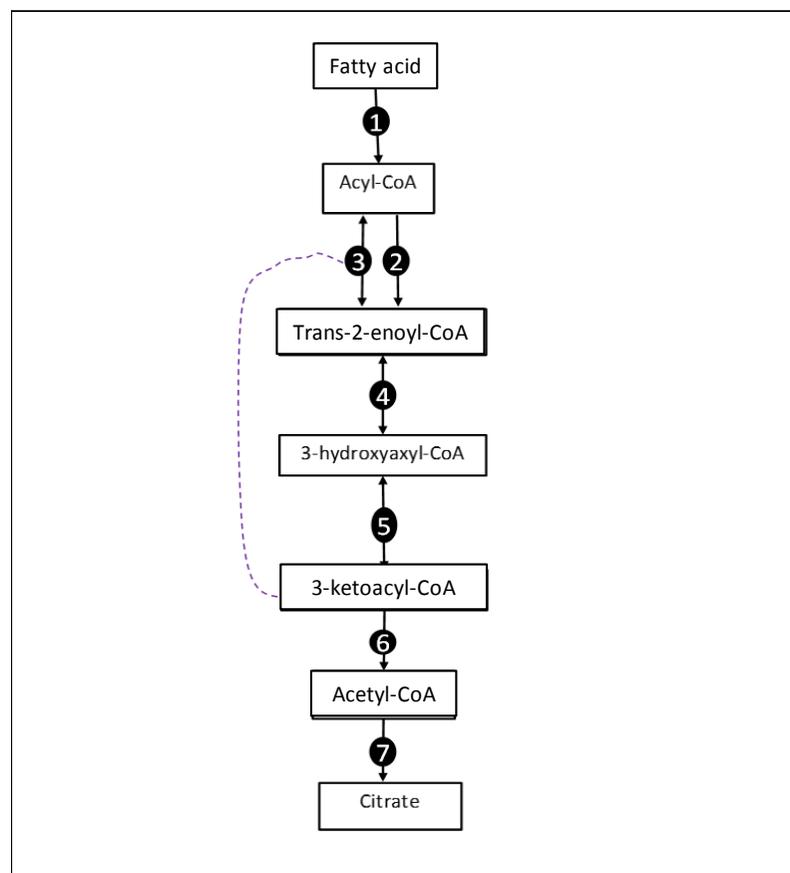


Figure S3. 12. Schematic representation of the β -oxidation. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 12.

Table S3. 12. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in β -oxidation. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 12. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
β -oxidation	Acyl-CoA synthase	1	208444	0	0	0	0	0	0	0	-2.41
			213791	0	0	0	0	0	0	0	-2.28
			259065	2	0	0	0	-3.72	-2.93	-2.53	-6.31
			262994	0	0	0	0	0	-2.03	0	-3.56
			265444	0	0	0	0	0	-2.25	0	0
	Acyl-CoA oxydase (peroxisome)	2	210789	0	0	2.223	0	-2.19	-2.5	0	-3.92
			265443	0	0	0	0	-2.55	-2.23	0	-3.39
	Acyl-CoA dehydrogenase (mitochondria)	3	212170	3	0	0	-4.28	-5.65	-4.78	0	-3.44
			214967	2	0	1.863	-4.05	-5.57	-4.82	-1.67	-3.55
			209571	0	0	2.266	-2.44	-4.36	-3.35	0	-3.4
			223695	0	0	0	0	-2.37	-3.23	-2.79	-4.9
			230976	0	0	0	0	0	-2.37	-2.47	-1.95
	Enoyl-CoA hydratase	4	183437	2	0	2.508	-3.1	-5.67	-5.15	-2.16	-4.39
			227122	2	0	0	-3.64	-5.75	-4.2	-1.89	-4.28
			202663	2.59	0	0	0	-2.62	-2.43	0	-4.55
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	5	207194	0	0	2.648	0	0	0	0	0
			210327	0	0	0	0	0	0	0	-2.04
			270026	4	3.04	2.516	0	0	0	1.887	0
			271968	5	3.64	2.754	0	0	0	2.106	0
	3-ketoacyl-CoA thiolase	6	207731	0	0	0	-4	-6.34	-6.29	-4.36	-7.66

			213989	0	0	0	-3.55	-6	-5.75	-4.05	-6.87
			268162	0	0	0	-3.27	-5.35	-5.59	-3.84	-7.48
			274265	3	0	0	0	0	1.766	2.368	0
			207546	0	0	0	-2.36	-2.54	-2.74	0	-4.05
	Citrate synthase	7	224559	0	0	0	0	-2.84	-4.15	-3.95	-6.24

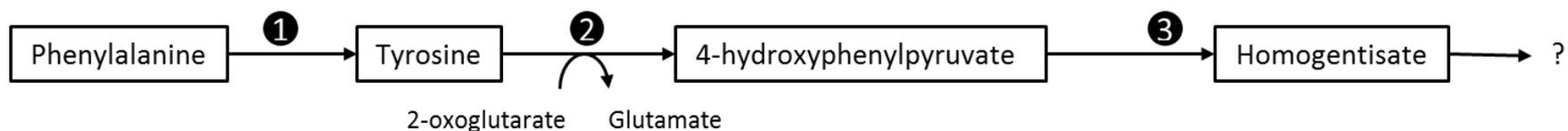


Figure S3. 13. Schematic representation of the known steps of phenylalanine and tyrosine catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 13.

Table S3. 13. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in phenylalanine and tyrosine catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 13. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Phenylalanine and tyrosine	Phenylalanine-4-hydroxylase	1	188526	5.58	5.07	5.31	3.94	2.48	3.26	4.21	0
			227336	5	5.41	5.99	4.85	3.68	4.41	5.24	0
	Dihydropteridine reductase	1	230345	0	0	3.45	0	0	0	0	0
			225343	4.8	4.35	6.09	2.97	3.71	2.56	4.42	0
	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	1	212618	2.79	2.26	0	0	0	0	0	-1.8
			254851	3.11	2.51	2.21	0	0	0	2.05	0
Tyrosine aminotransferase	2	197223	3.44	2.08	2.51	0	0	0	2.52	0	
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3	185578	0	0	0	-4.2	0	-3.3	0	0	



Figure S3. 14. Schematic representation of histidine catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 14.

Table S3. 14. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in histidine catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 14. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Hisitidine	Histidinol phosphate transaminase	1	178139	0	0	0	-3.3	-2.9	-4.7	-3.5	-4
			278740	0	0	0	-3.3	-3.1	-4.3	-3.3	-3.4

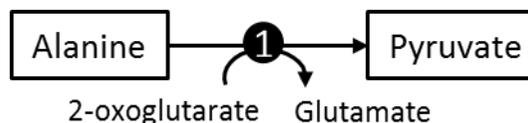


Figure S3. 15. Schematic representation of alanine catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 15.

Table S3. 15. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in alanine catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 15. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Alalnine	Alanine transaminase	1	179924	0	0	-2.7	-2.5	0	-2	0	-2.2
			223701	0	0	0	-4.1	-5.4	-6.6	-5.6	-3.8
			202094	0	0	0	-4.4	-5.6	-7.3	-5.4	-3.3
			226038	2.58	0	0	0	-2.1	0	0	-3.1
			201122	2.57	0	0	0	-2.2	0	0	-3.5

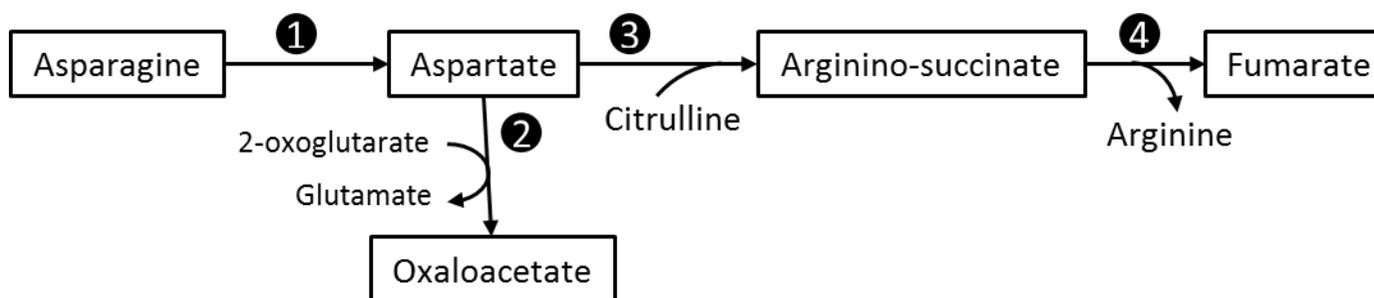


Figure S3. 16. Schematic representation of asparagine and aspartate catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 16.

Table S3. 16. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in asparagine and aspartate catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 16. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Asparagine, aspartate	Asparaginase	1	187917	0	0	0	0	-2	0	0	-3.6
	Aspartate aminotransferase	2	170472	0	-2.8	0	-6.7	-5.9	-6.8	-6.2	-5.2
			202007	0	-3.4	0	-8.1	-7.2	-8.8	-7.2	-5.9
			209612	0	0	0	-2.3	-2.1	-2.6	0	-3.2
			266538	3.03	0	0	0	0	0	0	-2.2
	Arginino succinate synthase	3	207847	0	0	5.52	-4.7	0	-5.7	-4.2	-2.8
			213508	0	0	3.52	-5	0	-5.1	-3.7	-2.8
	Argininosuccinate lyase	4	262171	0	0	0	-4.3	-3.4	-4.3	-2.5	-4.5
			215156	0	0	0	-5	-2.8	-4.2	-3.1	-3.9

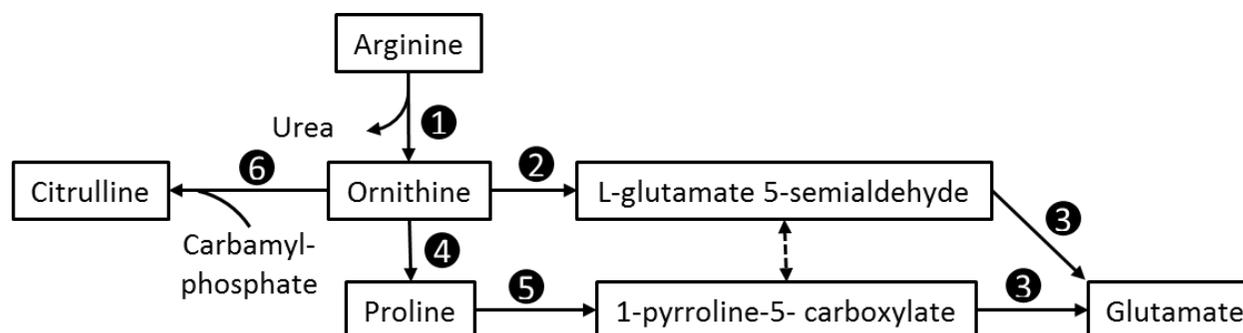


Figure S3. 17. Schematic representation of arginine and proline catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 17.

Table S3. 17. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in arginine and proline catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 17. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Arginine, proline	Arginase	1	182884	0	2.98	4.46	0	-2.4	-2.5	0	-4.2
			189941	2.1	3.41	4.43	0	0	-2.3	0	-3.8
	Ornithine aminotransferase	2	269005	0	0	0	-4.2	-4.2	-4.3	-3.7	-5.3
			273536	0	0	0	-4.1	-3.8	-3.8	-3.3	-4.7
	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	3	208511	0	0	0	-4.8	-4.6	-4.5	-3.1	-4.6
			215251	0	0	0	-6.1	-7.2	-6.3	-4.1	-4.5
	Ornithine cyclodeaminase	4	224163	3.75	2.82	0	0	0	0	0	-2.8
	Proline dehydrogenase	5	268766	0	0	2.99	-1.9	-8.2	-7.5	-6.2	-7.8
Pyrroline-5-carboxylate reductase	5	191403	0	0	0	-3.3	-3.1	-3.1	0	-4.5	

			203522	0	0	0	-2.8	-2.6	-2.9	0	-4.2
	Ornithine carbamoyltransferase	6	268473	0	0	0	0	0	-3.3	-3.1	-5.1
			270168	0	0	0	0	0	0	0	0

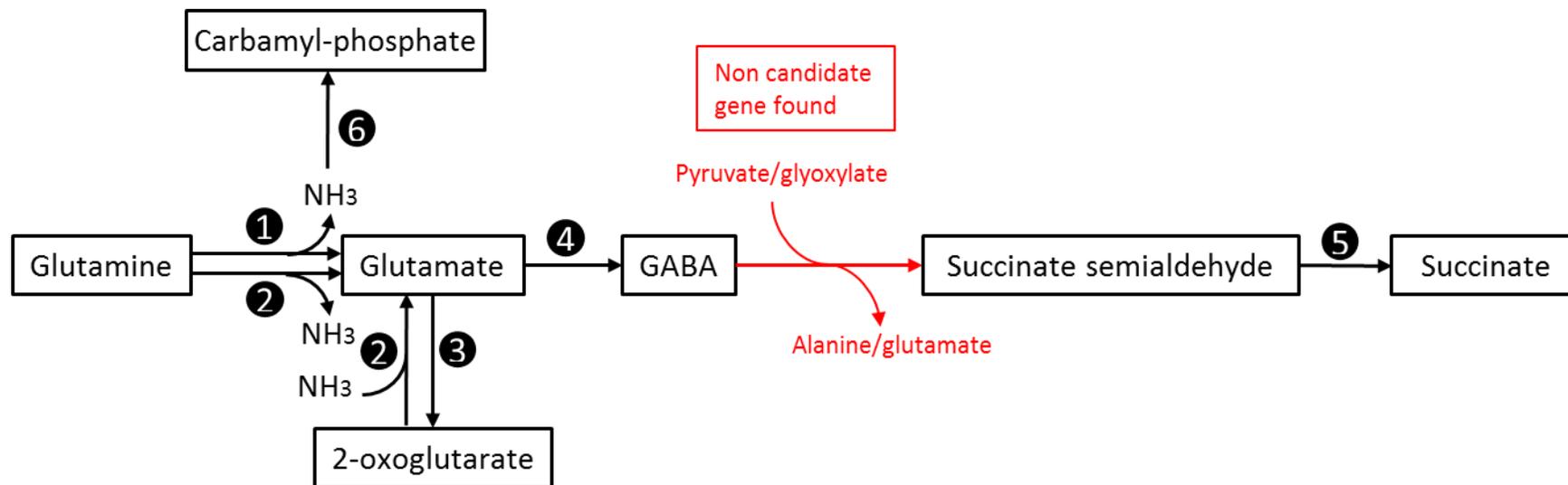


Figure S3. 18. Schematic representation of glutamine and glutamate catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 18.

Table S3. 18. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in glutamine and glutamate catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 18. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Glutaminase	1	182097	2.33	0	0	0	-2.1	-2.1	-2.1	-2.7

		192421	3.1	2.31	0	0	-2.3	-1.9	-2.4	-3.1
GOGAT	2	167114	0	0	0	-3.1	-2.5	-2.8	-2.6	-5.2
		225787	0	0	0	-4.7	-2.6	-3	-2.4	-4.2
		199438	0	0	0	-4.3	-2.5	-2.8	-2.2	-3.7
		207456	0	0	0	0	0	0	0	0
		260715	0	0	0	0	0	0	0	0
Glutamate dehydrogenase	3	192073	3.17	2.57	2.48	0	0	-4.6	-4.7	-4
		192780	3	0	0	0	-2.9	-4	-3.7	-3.9
		209458	3.1	0	0	0	0	-2.7	-2.5	-5.3
		213665	3.32	0	0	0	0	-2.8	-2.6	-4.9
Glutamate decarboxylase	4	157950	6.4	6.66	4	0	0	0	0	
Succinate-semialdehyde dehydrogenase	5	275063	2.97	0	0	0	-2.4	-2.3	-2.2	-4.6
		272648	3.11	0	0	0	-2.2	-2.3	-2.1	-4.7
Carbamoyl phosphate synthetase	6	169332	0	0	0	-6.7	-6.1	-7.5	-6.9	-4
		174742	0	0	0	-6	-5.8	-7	-6.4	-4.2
		264682	0	-3.1	0	-3.8	-3.1	-4.3	-4.1	-2.8
		265069	0	0	0	-3.1	-2.6	-3.7	-2.6	0

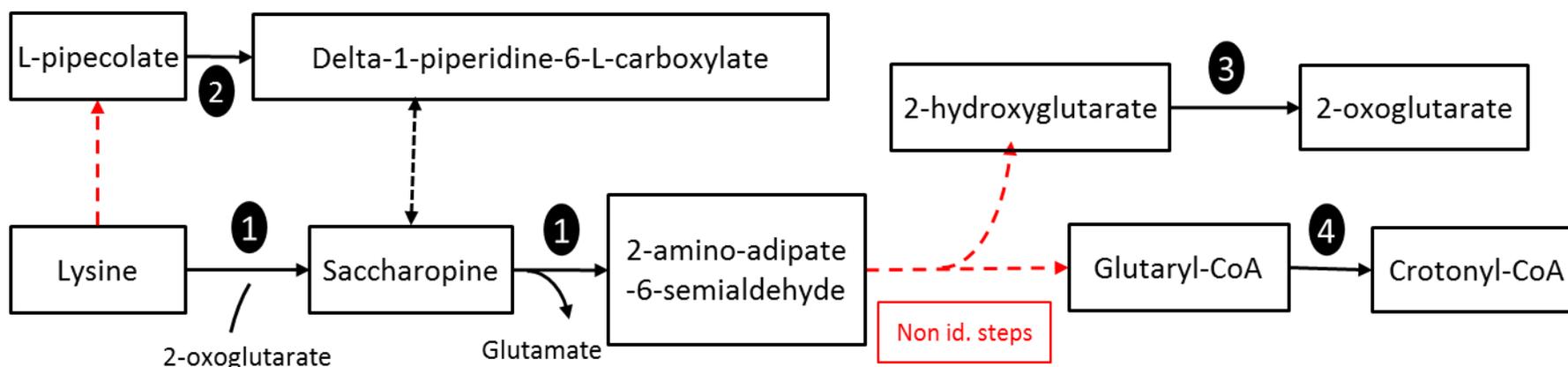


Figure S3. 19. Schematic representation of the hypothetical lysine catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 19.

Table S3. 19. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in lysine catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 19. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)		0.3	1	3	6	16	31	63	87	
	Enzyme	#	L2FC								
Lysine	Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine DHG	1	264866	0	0	0	0	0	0	0	
	Sarcosine oxidase	2	183226	0	0	0	-5.1	-3.6	-4.7	-4.9	-3.3
			171734	0	0	0	-2.3	0	-3.7	-2.6	-3.9
	DH2DH	3	200319	3	0	0	0	0	-2.4	0	0
			207550	3	0	0	0	0	0	0	-3
	Glutaryl-CoA deshydrogenase	4	278838	0	0	0	0	0	0	0	0
271673			2	2.41	4.02	0	-2.7	0	0	0	

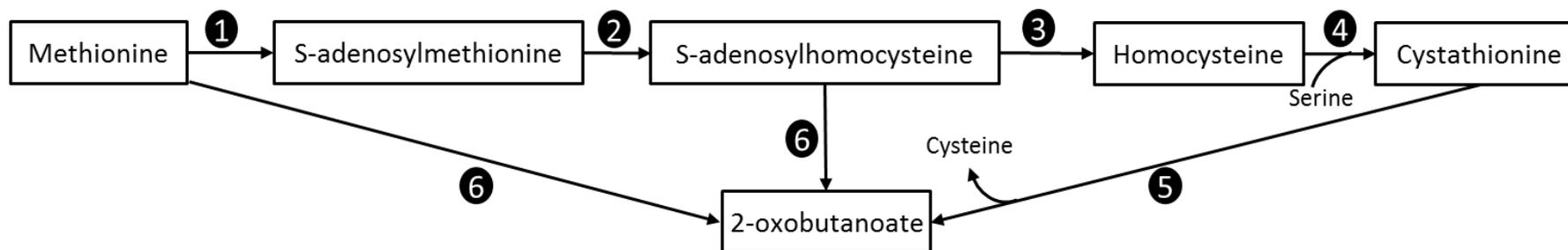


Figure S3. 20. Schematic representation of the methionine catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 20.

Table S3. 20. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in methionine catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 20. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Methionine	S-adenosylmethionine synthase	1	206912	0	0	0	-5.7	-4.8	-6.3	-4.2	-4.8
			201716	0	0	0	-5.8	-5	-5.8	-4.9	-3.3
			271944	-4	-5.5	-5.8	-8.6	-7.5	-10	-9.2	-6.6
	S-adenosyl-L-methionine-dependant methyltransferase	2	250079	0	0	0	0	0	0	0	0
			251844	0	0	0	-3.2	-2.5	-2.6	0	0
	Adenosylhomocysteinase	3	276042	0	0	-2.6	-5.4	-4.4	-6.1	-4.3	-4.6
	Cystathionine beta-synthase	1	168185	0	0	0	-5.1	-5.4	-6	-4.1	-6.8
			270051	0	0	0	-5.4	-5.5	-6	-4.3	-7.1
			229494	0	0	0	-2.9	-4.6	-5.7	-5.3	-7
	Cystathionine gamma-lyase	5	192916	4.17	3.07	0	0	0	0	0	-1.8
192026			2.48	0	0	-2.1	0	-2.9	-2.8	-3.3	

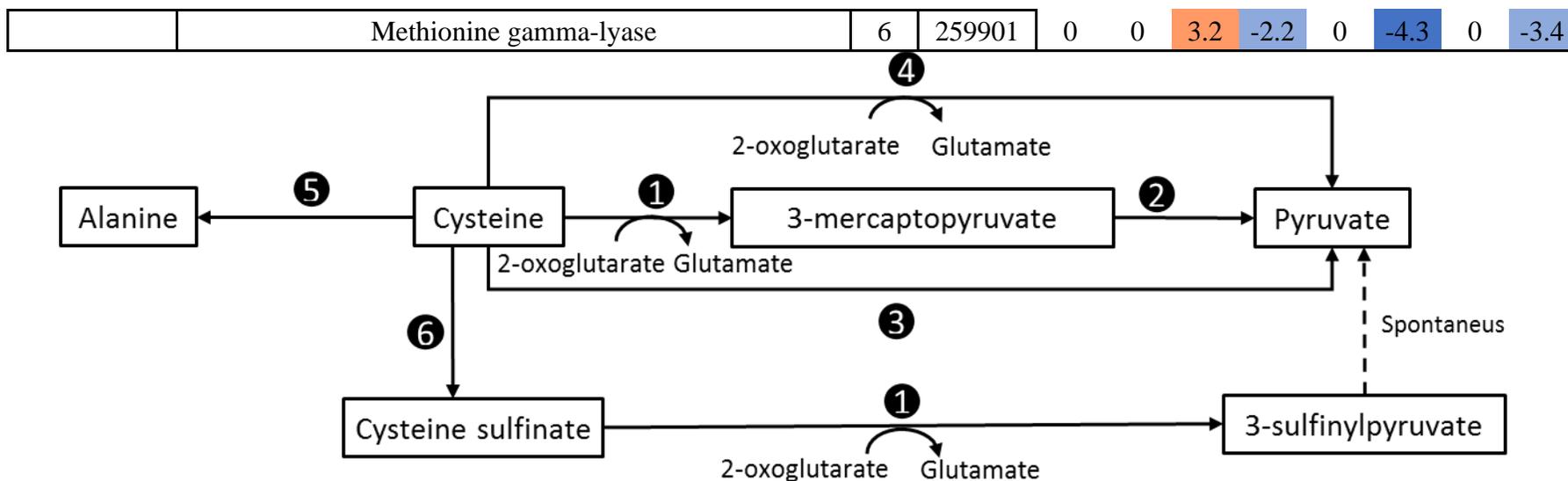


Figure S3. 21. Schematic representation of cysteine catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 21.

Table S3. 21. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in cysteine catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 21. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)		L2FC									
	Enzyme	#	JGI id	0.3	1	3	6	16	31	63	87	
Cysteine	Cysteine/aspartate transaminase	1	170472	0	-2.8	0	-6.7	-5.9	-6.8	-6.2	-5.2	
			202007	0	-3.4	0	-8.1	-7.2	-8.8	-7.2	-5.9	
			209612	0	0	0	-2.3	-2.1	-2.6	0	-3.2	
			266538	3.03	0	0	0	0	0	0	0	-2.2
	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	2	267900	4.05	0	0	0	0	0	-3.6	-3.3	-2.3
			240613	0	0	0	-4.7	-3	-4.8	-4.3	0	
			246520	0	0	0	0	0	0	0	0	

	Cysteine desulfhydrase	3	189029	3.92	3.08	0	0	0	0	0	0
			139422	3.99	3.22	0	0	0	0	0	-2.2
	Kynurenine-oxoglutarate transaminase	4	157973	0	0	0	-4.9	-3	-5.1	-5.1	-3.4
			195837	0	0	0	-2.9	-2.8	-3.5	-2.7	0
			201023	0	0	0	0	0	-2.3	0	0
	Cysteine desulfurase	5	149227	0	0	0	0	0	-2.3	0	-4.5
			180351	0	0	2.53	-2.7	-2.1	-3.3	0	-3.8
			201901	0	0	2.39	-2.8	-2.5	-3.4	0	-3.9
			271242	0	0	0	0	-3.3	-2.9	-1.9	-5.6
	Cysteine dioxygenase	6	162826	0	0	0	-2.2	-5.1	-4.5	-3.3	-7.7
			162827	0	0	0	-2.6	-5.2	-4.6	-3.2	-7.3

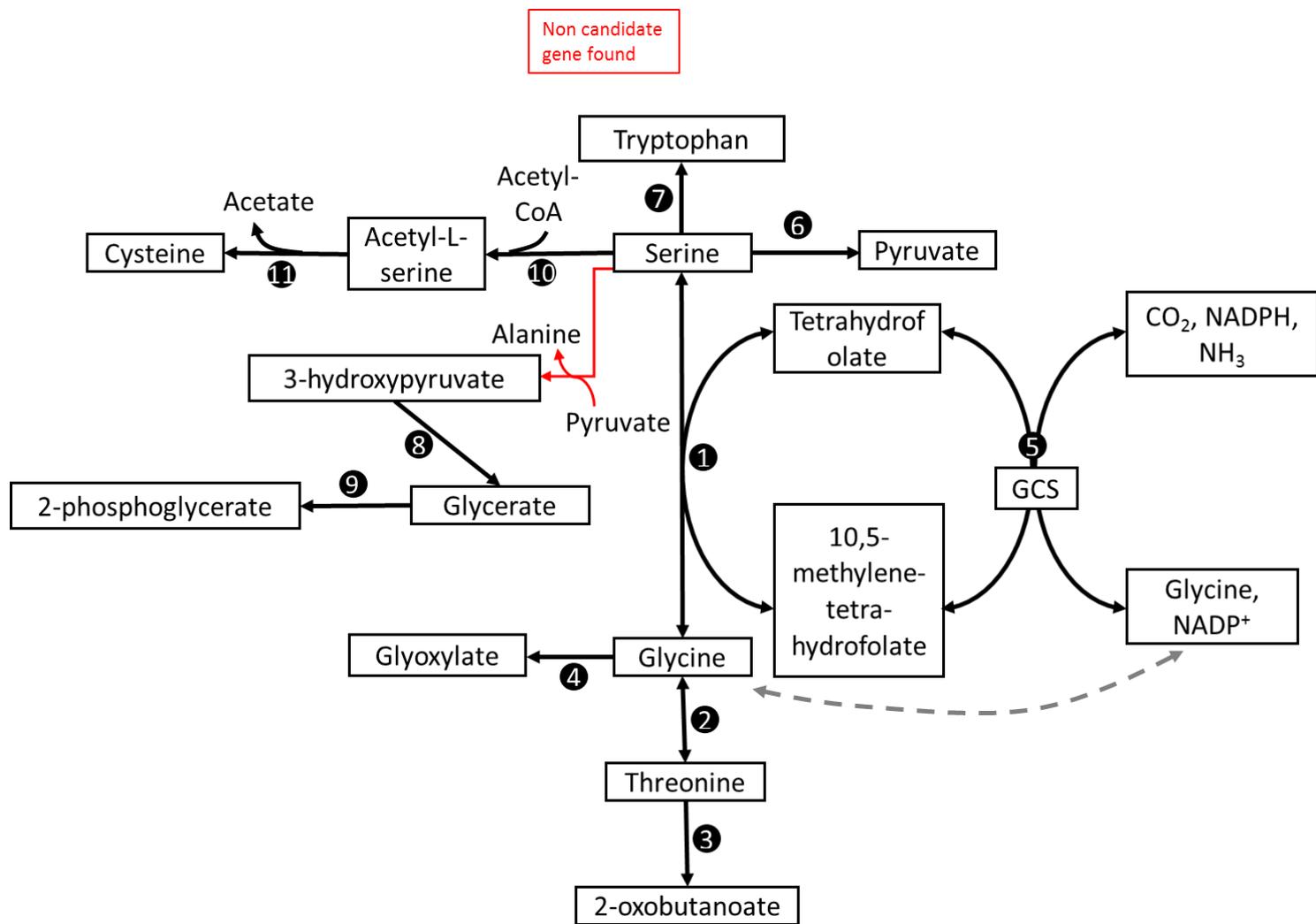


Figure S3. 22. Schematic representation of serine, glycine, and tryptophan catabolism. Reactions have been numbered to correspond to the enzymes located in Table S3. 22.

Table S3. 22. Differential expression analysis of genes encoding proteins involved in serine, glycine, and tryptophan catabolism. For each enzyme of the table, the associated number mentioned in the third column refer to the reaction that the enzyme ensures in the pathway represented on the Figure S3. 22. For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Pathway	Time (days)			0.3	1	3	6	16	31	63	87
	Enzyme	#	JGI id	L2FC							
Threonine, glycine, serine	Serine hydroxymethyltransferase	1	225910	0	0	0	0	-2.5	-3.1	-2.8	-5.2
			198645	0	0	0	0	-2.7	-3.9	-3.3	-5.2
			277738	0	0	0	-7	-4.9	-8.3	-8.2	-5.7
			274846	0	0	0	0	0	0	0	-2.8
			210248	0	0	0	0	0	-2.5	0	-3
	Threonine aldolase	2	236986	0	0	0	-2	-2.9	-3	-2.8	-3.5
			227125	0	0	0	-3.6	-3.2	-3.5	-2.9	-4.1
	Threonine ammonia-lyase	3	183228	0	0	0	-2.2	0	-2.7	0	-2.8
			189917	0	0	0	-4.1	-2.9	-3.3	-2.5	-3.1
	D-amino-acid oxidase	4	206086	0	0	0	-3.5	-4.1	-3.6	-2.5	-4.5
	P protein of GCS	5	276117	0	0	0	-2.4	-2.5	-3.7	-3.8	-3.8
	Aminomethyltransferase - T protein of GCS		224733	0	0	0	0	0	0	0	-3.1
			199793	0	0	0	0	0	-2.8	-2.4	-4.4
	Cleavage protein H of GCS		275698	0	0	0	-2.6	0	-2.9	-2.5	-4.8
			214509	0	0	0	-2.4	0	-3	-2.6	-4.9
	Dihydrolipoyl dehydrogenase - Protein E du GCS	271375	0	0	0	-2.2	-3.2	-3.2	-2.7	-3.9	
		223069	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Serine dehydratase	6	185545	2.41	0	0	0	-2	0	0	0
			192369	0	0	0	-1.9	-3	0	0	-2.2
	Tryptophan synthase	7	169676	0	0	0	-4	-4.3	-6	-6	-6.5

			230141	0	0	0	-4.6	-5.1	-5.7	-5.3	-5	
	Glycerate dehydrogenase	8	169636	3.86	0	0	0	0	0	0	-2.7	
	Glycerate kinase	9	241735	3.9	0	0	-3.6	-4.2	-3.9	-3.6	0	
			257081	2.84	0	0	-4.3	-3.4	-4.3	-3	-2.5	
	Serine O-acetyltransferase	10	140994	3.27	2.43	0	0	0	0	0	-3.5	
			151585	3.61	2.38	0	0	0	0	0	0	-3.9
			168923	0	0	0	0	0	-1.9	0	0	-4
			175518	0	0	0	-2.4	0	-3.4	-3	0	-4.3
			196030	0	0	0	0	0	0	0	0	-2.1
			196505	2.5	0	0	0	0	0	0	0	-2.2
			226718	3.74	2.94	2.15	0	0	0	0	0	0
	231316	3.44	2.49	0	0	0	0	0	0	-1.9		
	Cysteine synthase	11	166658	0	0	0	-2.4	0	-2.8	0	-3.7	
			150265	3.51	0	0	0	-2.8	-2.5	0	0	-4.5
			200001	3.43	0	0	0	-2.8	-2.7	0	0	-4.4
			229494	0	0	0	-2.9	-4.6	-5.7	-5.3	0	-7
			168185	0	0	0	-5.1	-5.4	-6	-4.1	0	-6.8
	270051	0	0	0	-5.4	-5.5	-6	-4.3	0	-7.1		

Table S3. 23. Differential expression analysis of candidate genes encoding proteins of autophagy.

For each gene, JGI ids are mentioned in the fourth column.

Time (days)		0.3	1	3	6	16	31	63	87
Enzyme	JGI id	L2FC							
ATG7	270472	2.98	0	0	0	-2.7	-2	0	-3.2
	273015	2.78	0	0	-2	-3.4	-2.3	0	-2.2
ATG12	145130	2.62	2.69	0	0	0	0	0	-4.4
	145146	2.67	2.74	0	0	0	0	0	-4.3
ATG16	180766	2.79	0	0	0	0	0	0	-3.5
ATG8	267723	0	0	0	0	-2.9	-3.2	0	-5.8
ATG1	188113	0	0	0	0	0	0	0	0
	199101	0	0	0	-2.6	-5.5	-4.2	0	-3.2
ATG9	240846	0	0	0	0	0	0	0	0
	251466	0	0	0	0	0	0	0	-2.5
ATG18d	142111	0	0	0	0	-4.6	-2.9	0	-3.5
	159399	0	0	2.23	0	-5.3	-3.9	-2.1	-4.7
ATG13	237461	0	0	0	0	0	0	0	0
	257200	0	0	0	0	-3.9	-3.3	-2	-5
VPS34	214694	2.87	0	2.18	0	0	0	0	-2.3
	210853	2.88	0	2.32	0	0	0	0	-1.7
ATG6	252930	0	0	0	0	0	0	0	-3
	241258	0	0	0	0	0	0	0	-2.6
VPS15	208793	0	0	0	0	-3.9	-3.7	-2.3	-3.6
	175444	0	0	0	0	-3.3	-3.6	0	-3.5
ATG3	264374	0	0	0	0	-2.4	0	0	-2.1
	271004	0	0	0	0	-2.1	0	0	-2.5
ATG4	260628	0	0	0	0	0	0	0	0
	171703	2.71	0	2.5	0	0	0	0	-2.2
ATG11	277076	2.09	0	2.31	0	-2.5	-1.9	0	-4.1
	279054	2.13	0	2.15	0	-2.8	-1.8	0	-4.2
ATG101	215145	3.41	0	0	0	0	0	1.79	0
	275992	4.08	2.6	0	1.82	0	1.76	3.36	0

Annexe C – Chapitre 4

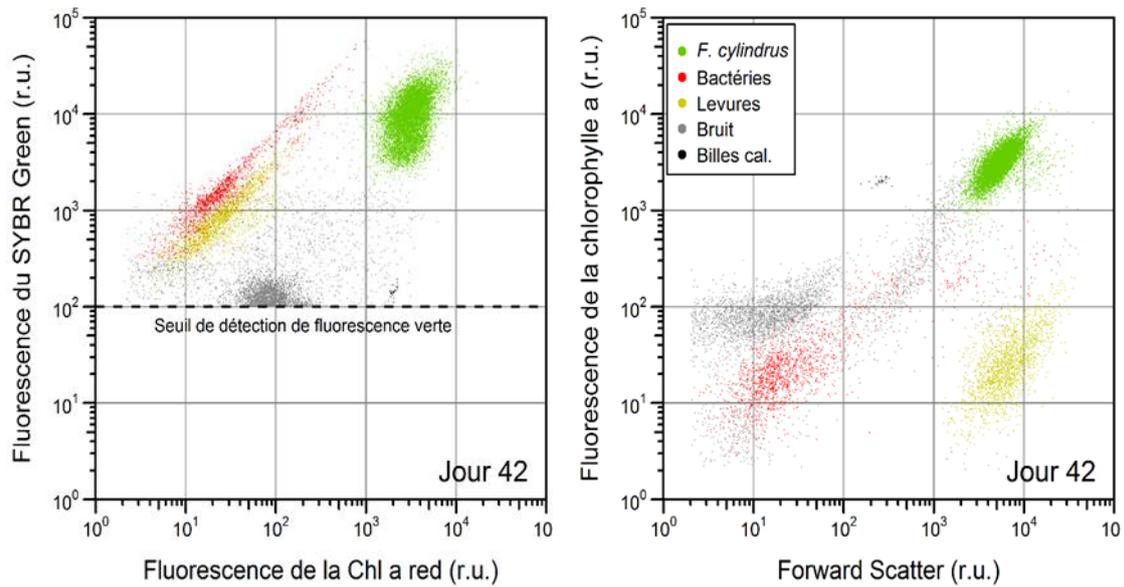


Figure S4. 1. Exemple de cytogrammes présentant les bactéries et les levures d'un échantillon marqué au SYBR Green (culture n°3 au jour 42). La fluorescence rouge des bactéries et levures sur le cytogramme de gauche est due au marquage au SYBR Green (Unités relatives : r.u.).

Tableau S4. 1. Pourcentage de contamination bactérienne et par les levures dans les trois cultures

Temps (jours)	Culture n°1		Culture n°2		Culture n°3	
	Bactéries	Levures	Bactéries	Levures	Bactéries	Levures
0	0	0	30	0	19	0
0,02	0	0	30	0	19	0
0,25	0	0	30	0	22	0
0,5	0	0	26,5	0	18	0
1	0	0	27	0	21	0
3	0	0	24,2	0	18	0
5	0	0	22	0	18,3	0
7	0	0	27	0	19	0
11	0	0	22	0	20	0
14	0	0	29	0	14	0
18	0	0	28,5	0	6,5	0
22	0	0	28,5	0	6,4	0
27	0	0	27,5	0	30	0
29	0	0	30	0	31	0
35	0	0	26	0	11,5	0
40	0	0	19	0	13,5	16,3
42	0	0	13	0	7,8	20
46	0	1	1,7	0	NA	NA
49	0	2,2	1,2	0	NA	NA
53	0	23,3	2	3,6	NA	NA
54	0	20,5	2	1,9	NA	NA

Les concentrations de *F. cylindrus* et des levures ont été estimées grâce aux échantillons de CMF non marqués. Les bactéries, n'étant pas auto-fluorescentes et ne pouvant être distinguées du bruit à cause de leur petite taille, ont été comptées grâce aux échantillons de CMF marqués au SYBR Green. Les pourcentages de contamination ont été calculés selon l'équation mentionnées dans « Contamination des cultures » de la section Résultats du Chapitre 4. Chaque nombre correspond à la moyenne des trois répliques techniques. Aucune donnée n'est disponible pour la culture n°3 après le jour 42 en raison de son élimination après qu'elle a été contaminée par des levures.

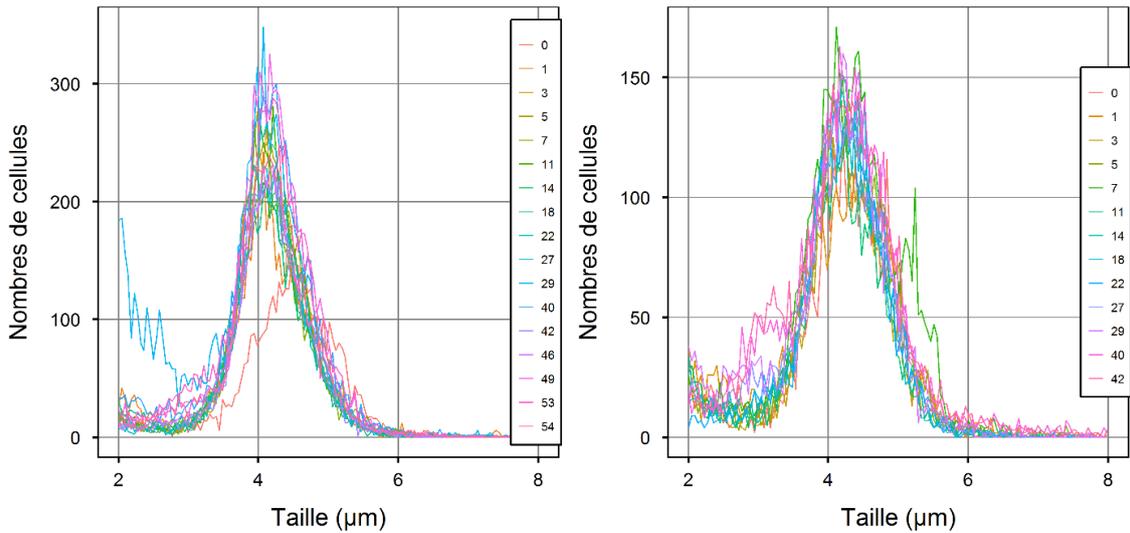


Figure S.4. 2. Distribution de taille des particules dans les cylindres n°2 (à gauche) et n°3 (à droite) estimées avec le Multisizer 4. Pour chacune des cultures, n'ont été représentés que les comptages d'un seul réplica technique par jour d'échantillonnage. Le nombre de cellules dans 12.5 µl est donné pour chaque intervalles de taille (0,16 µm) entre 2 et 8 µm. On remarque que le seul échantillon dans lequel a été détecté un nombre important de particules de petites tailles (i.e., proche de 2 µm) pouvant correspondre à des bactéries provient de la culture n°2 au jour 17.

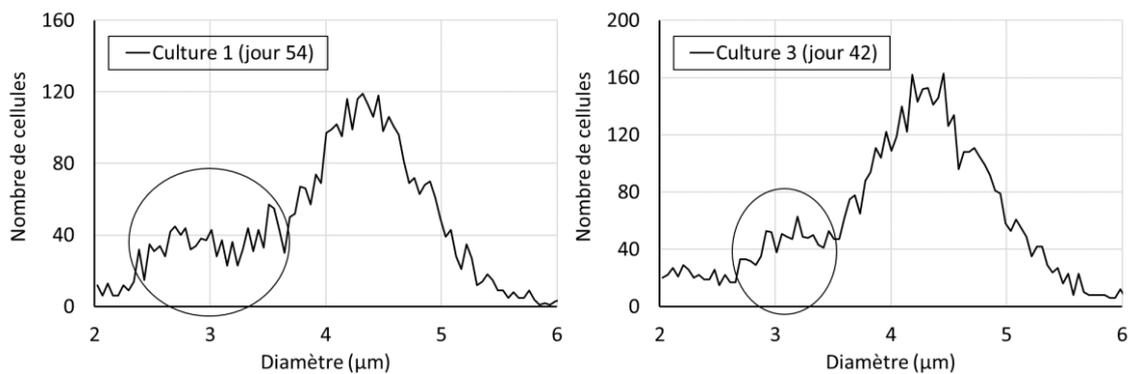


Figure S.4. 3. Courbes de distribution de tailles obtenues avec le Multisizer 4. Chacune des deux courbes représente les données obtenues pour un réplica technique des cultures n°1 (gauche) et n°3 (droite) aux jours 54 et 42 respectivement. Les levures atteignaient à ces dates leur plus haut taux de contamination et leur concentration (estimée par CMF) atteignait environ 20 % de la concentration de *F. cylindrus* dans la culture n°1, et 28 % dans la culture n°3. Le nombre de cellules dans 12.5 µl est donné pour chaque intervalles de taille (0,16 µm) entre 2 et 6 µm. Les cercles noirs indiquent la présence de populations de particules absentes des échantillons non contaminés par des levures.

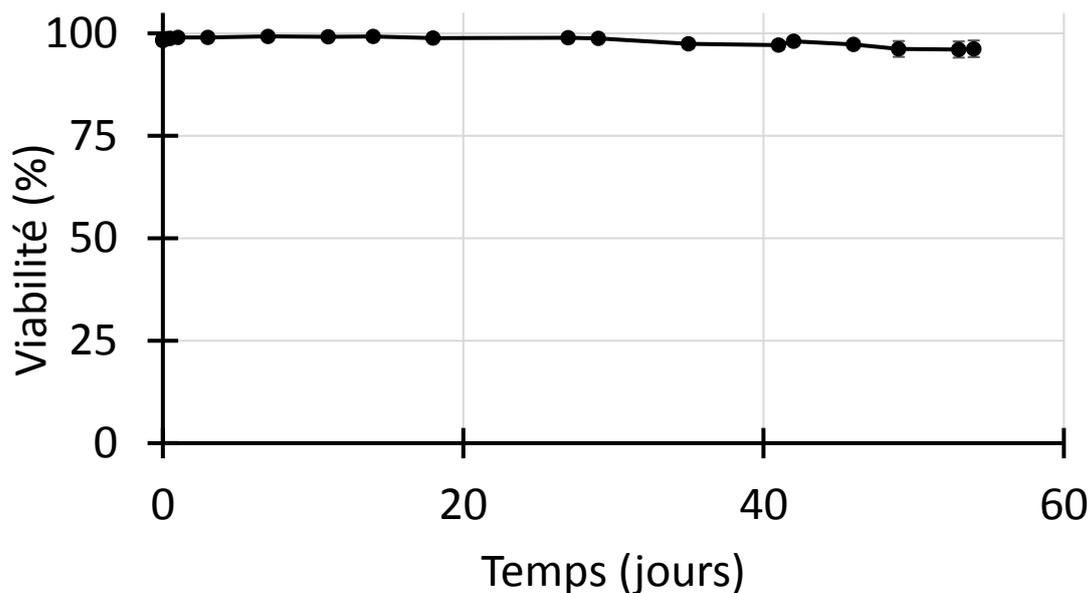


Figure S4. 4. Viabilité moyenne des cultures estimée par cytométrie en flux après marquage au SYTOX Green (n = 9). Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.

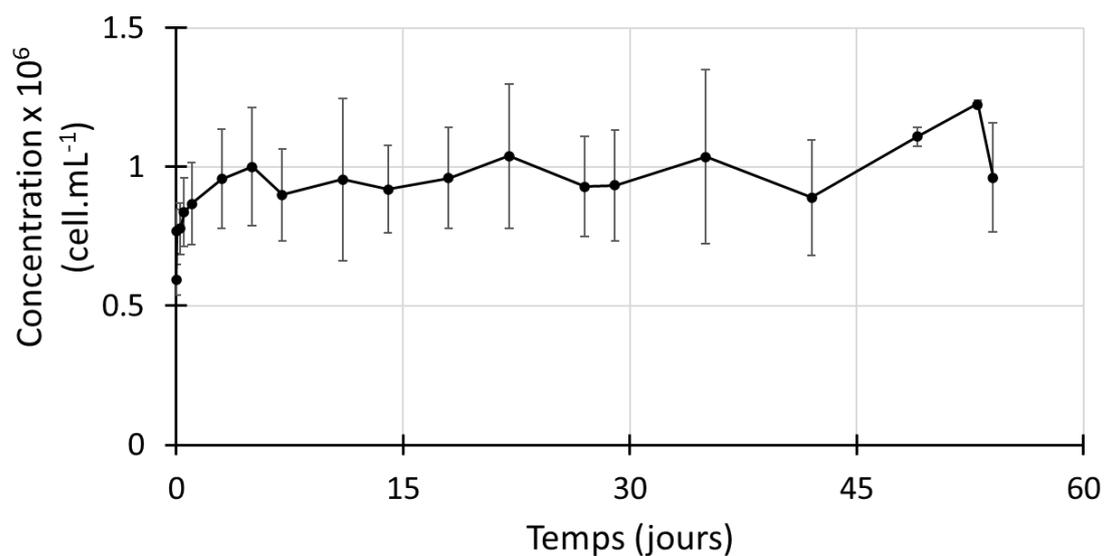


Figure S4. 5. Concentrations cellulaires moyenne obtenues par CMF (n = 9). L'augmentation de la concentration au-delà du jour 42 est due au retrait de la culture n°3 contaminée par les levures et dont la concentration cellulaire était, tout au long de l'expérience, inférieure à celles des deux autres cultures. La dernière division de certaines cellules est, comme dans les expériences précédentes, bien visible lors des trois premiers jours d'obscurité, et s'est traduit par un accroissement de la concentration de 23.95 ± 13.57 % en moyenne. Les barres d'erreur représentent l'écart-type standard.

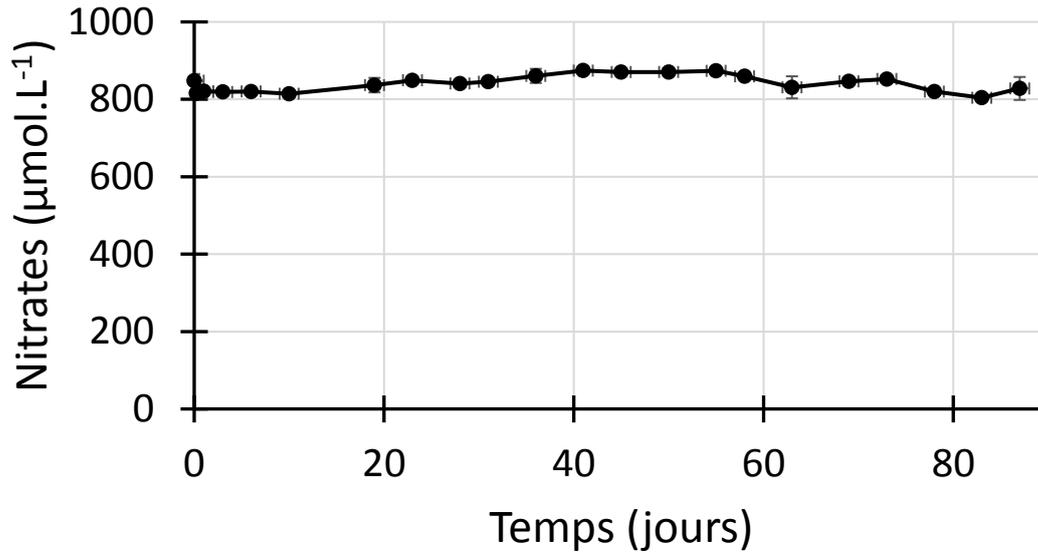


Figure S4. 6. Concentration en nitrates dans le milieu de culture pendant l’acclimatation au noir de trois mois. Pour chaque échantillonnage, un aliquot de 10 mL de chaque culture a été filtré dans des tubes Falcon™ de 15 mL à l’aide d’une seringue et d’un filtre Whatman GF/F en fibre de verre de 25 mm. Les échantillons ont été conservés à -20 °C et analysés avec un Auto-Analyseur 3. Chaque point représente la moyenne des trois répliques biologiques (n = 3). Les barres d’erreur représentent l’écart-type standard.