



**HAL**  
open science

# La photosynthèse et la photoprotection chez *Tisochrysis lutea*, de la synthèse à l'extraction de fucoxanthine

Anne Pajot

► **To cite this version:**

Anne Pajot. La photosynthèse et la photoprotection chez *Tisochrysis lutea*, de la synthèse à l'extraction de fucoxanthine. Biologie végétale. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU4086 . tel-04102761

**HAL Id: tel-04102761**

**<https://theses.hal.science/tel-04102761>**

Submitted on 22 May 2023

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 602  
Sciences pour l'Ingénieur  
Spécialité : Génie des procédés et bioprocédés

Par

**Anne PAJOT**

**La photosynthèse et la photoprotection chez *Tisochrysis lutea*,  
de la synthèse à l'extraction de fucoxanthine.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 9 décembre 2022  
Unité de recherche : GEPEA, UMR CNRS 6144 ; IFREMER, PHYTOX, laboratoire GENALG  
Thèse N° :

## Rapporteurs avant soutenance :

Leslie Boudesocque-Delaye Professeure, Université de Tours, France  
Claire Remacle Professeure, Université de Liège, Belgique

## Composition du Jury :

Président : Leslie Boudesocque-Delaye Professeure, Université de Tours, France  
Examineurs : Raphaël Grougnet Maître de Conférence, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, France  
Jean-Paul Cadoret Directeur Scientifique, Algama ; Président de l'EABA, France  
Dir. de thèse : Luc Marchal Professeur, Nantes Université, Polytech Nantes, France  
Co-dir. de thèse : Elodie Nicolau Chercheuse, IFREMER Centre Atlantique, France  
Invité Johann Lavaud Chercheur, CNRS Brest, France



# Thèse de doctorat

La photosynthèse et la photoprotection chez *Tisochrysis lutea*,  
de la synthèse à l'extraction de fucoxanthine.

Thèse soutenue par

**Anne Pajot**

Sous la direction de

Luc Marchal et Élodie Nicolau





*Nous devons nous y habituer : aux plus importantes croisées  
des chemins de notre vie, il n'y a pas de signalisation.*

*Ernest Hemingway*

## Remerciements

Je remercie vivement Leslie Boudesocque-Delaye et Claire Remacle d'avoir accepté d'évaluer ces travaux en tant que rapporteurs de cette thèse. Merci également à Jean-Paul Cadoret et Raphaël Grougnet d'avoir accepté d'en être les examinateurs. J'espère sincèrement que vous prendrez plaisir à la lire.

Merci à mon directeur de thèse, Luc Marchal, de m'avoir encadrée et d'avoir su me guider dans la découverte de la discipline des procédés. Merci de ta confiance, de l'autonomie que tu m'as accordée, et de la pédagogie dont tu as fait preuve pour répondre à mes questions de grande néophyte dans ce domaine. Merci également pour le travail mis en œuvre et l'analyse critique lors des expérimentations et de l'écriture de l'article correspondant.

Merci à ma co-encadrante de thèse, Élodie Nicolau de m'avoir proposé ce sujet quand, enfin, j'ai compris que le doctorat était un chemin privilégié pour assouvir ma passion pour la biologie marine. Merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, d'avoir considéré toutes mes prises d'initiatives et mes idées. Merci de m'avoir sans cesse rappelé la bonne démarche scientifique du chercheur, pour que jamais je ne perde la ligne directrice de cette thèse. Merci d'avoir toujours tout considéré de manière positive sans jamais m'imposer de pression négative. Merci de m'avoir, par ta bienveillance et tes encouragements, élevée autant professionnellement qu'humainement. Je pense sincèrement que nos deux personnalités se sont complétées durant ces trois années, et j'en ressors grandie. Pour tout cela et bien d'autres choses, merci « Maître ».

Merci aux membres de mon Comité de Suivi Individuel, Johann Lavaud et Laurent Picot, de vous être réellement investis scientifiquement dans cette thèse, merci de votre rigueur, et merci de l'intérêt que vous avez porté à ces travaux que j'ai le bonheur de partager avec vous sur quelques articles. Johann, merci de ta très grande disponibilité et merci pour tous nos échanges. Merci de m'avoir aidée à y voir plus clair dans le vaste monde de la photoprotection, d'avoir illuminé mon chemin avec toutes ces connaissances, que j'ai utilisées sans jamais les dissiper. Merci d'avoir été si pointilleux et si pertinent dans le choix des mots, dans le choix des résultats à présenter, dans l'écriture des articles. Laurent, merci de ta positivité et de ton enthousiasme à l'égard de mes travaux et de ma personne, j'ai apprécié chaque échange que

## Remerciements

nous avons eu et j'espère qu'ils n'étaient pas les derniers. Maintenant que j'y pense, je n'ai en fait aucun doute que nos chemins continueront de se croiser.

J'espère n'oublier personne dans les remerciements qui vont suivre, mais avis aux lecteurs : sachez que si vous avez croisé ma route durant cette thèse, même quelques instants que vous pensiez futiles, je vous remercie d'avoir contribué au bonheur qui a été le mien d'avoir partagé ce moment avec vous.

Je commence par remercier mon laboratoire d'accueil, PBA à Ifremer, devenu Genalg, Physalg, et Metalg, ainsi que le GEPEA pour les expériences de purification. Merci Gaël, « chef chef » de m'avoir accueillie avec enthousiasme pour cette seconde fois au laboratoire, merci pour toutes nos discussions. Merci d'avoir enfilé ta blouse pour m'aider à mettre en place les turbidostats, ce qui ne fut pas chose facile mais qui fut chose faite et bien faite, même très bien faite. Merci d'avoir passé des heures et des heures dans l'ancre des photobioréacteurs, d'avoir risqué l'angine sous la climatisation pour mener cette expérience jusqu'au bout. Isabelle, notre vraie cheffe à tous, notre Présidente, notre Pilier, notre Étoile polaire, merci de t'occuper si bien de nous, de moi. Merci de m'avoir si bien accueillie encore une fois, ce laboratoire est devenu ma deuxième maison durant ces trois années et ce sentiment de familiarité, c'est à toi que je le dois. Merci pour toutes nos discussions formelles, mais surtout pour celles informelles. Ta p'tite Miette te remercie pour tout. Y compris ce surnom qui, en plus d'être mignon, qualifie mon amour pour la nourriture, ce qui n'est pas rien. Matthieu, merci sincèrement de ton écoute et de ton intérêt pour mon bien-être tout au long de cette thèse. Merci d'avoir pris la direction de Genalg, et d'avoir instauré l'unité de ce groupe, j'ai grandement apprécié t'avoir en deuxième « chef ». Un grand merci également dans l'aide que tu m'as apportée en biologie moléculaire. À défaut que ces connaissances soient gravées dans mon ADN, j'espère qu'elles resteront gravées dans ma mémoire.

Virginie, quel bonheur mais quel bonheur d'avoir évolué à tes côtés ! Je suis si émue que tu sois devenue maman, je me rappellerai toujours le jour où tu nous l'as annoncé, et également le jour où Camille est tombée dans mes bras pour un câlin, c'était si mignon que j'ai failli verser une larme. Merci d'avoir suivi l'aventure de Maturin, qui fut bien chargée en émotions. Je crois que de ma vie je n'ai jamais rencontré une personne aussi sincèrement gentille et généreuse que toi, tu es un rayon de soleil pour tous les gens que tu croises et je te souhaite vraiment tout le bonheur du monde ainsi qu'à ta petite famille. Merci pour tout. Au fait, j'espère que



## Remerciements

Camille a réussi à faire de bons investissements en bourse, le CAC40 n'attend qu'elle. Aurélie, tout comme ton acolyte de toujours tu irradies tant de gentillesse qu'il est impossible de ne pas sourire, de ne pas être de bonne humeur pendant nos échanges. Pour le moral, cela fait parfois toute la différence et permet d'illuminer même les journées les plus troublées. Merci énormément pour tous ces moments. Merci également de ton implication dans le projet TINAQUA, sans quoi l'écriture du Chapitre 4 aurait été plus complexe ! Merci de ta rigueur, et de ton aide sur certains protocoles qui sont devenus beaucoup moins flous tout d'un coup. À toutes les deux, un immense merci du fond du cœur.

Bruno, merci pour tes codes Disney+, à la prochaine ! Je rigole, évidemment... Merci Bruno pour tous nos échanges et tous nos rires, merci de m'avoir écoutée, conseillée tout au long de cette thèse. Je suis si contente que nous restions en contact à travers mon prochain projet, comme quoi parfois le cordon est difficile à couper, sans même qu'on s'en rende compte ! Merci pour ton soutien dans mon travail et mes choix, merci pour les quelques manip que nous avons partagées, les résultats sont magnifiques et ont permis l'écriture d'un bel article dont je suis très fière. Je te tiens au courant si je repasse vers chez toi en vélo le week-end, mais depuis le Sud de la France il faudrait vraiment que ce soit lors d'un gros entraînement ! Merci pour tout. Sabine, merci pour ton soutien très précieux à mes yeux. Merci de m'avoir dit que c'était une bonne chose de vivre une fin de thèse de façon sereine, je commençais presque à croire qu'il fallait que je stresse pour montrer mon dévouement. Merci de ta bonne humeur et ton intérêt pour ma thèse et mon bien-être. Merci également de t'occuper si bien de Laura, d'après ce que j'ai ouïe dire, vous formez une équipe géniale avec Bruno et je vous souhaite le meilleur du monde pour cette thèse. Et enfin, un grand merci pour systématiquement dire bonjour le matin, et au revoir le soir, ce n'est rien, mais c'est en fait beaucoup.

Clarisse, merci pour tous nos échanges et surtout merci de ton immense soutien dans ma vie professionnelle et sportive. J'espère que tu connaîtras le même épanouissement avec les pompiers que j'ai connu avec le triathlon. Merci d'avoir toujours eu ce petit mot gentil au lendemain d'une course, car comme beaucoup le savent cela a été un réel équilibre dans ma vie ces trois dernières années. JB, merci de ton aide pour la mise en place des cultures en continu, un challenge qui nous aura valu plusieurs opérations à cœur ouvert pour amorcer la pompe très capricieuse. Merci également de ton aide pour la correction du premier article. Et enfin, merci pour les innombrables cafés du matin ! Thomas, merci de m'avoir aidée dans la

## Remerciements

compréhension des mesures de photosynthèse et photoprotection, de m'avoir fait de nombreuses suggestions parmi lesquelles j'ai pu sélectionner les plus pertinentes pour ma thèse. Merci également de m'avoir orientée vers Johann pour mon comité de suivi, il en a résulté une superbe coopération scientifique. Merci également de lutter pour l'usage du vélo en ville, malgré les trop nombreux automobilistes réfractaires ! Francis, merci de ta gentillesse, de ton soutien, et de ton intérêt pour mon sujet de thèse, j'espère que le parc informatique du laboratoire ne sera pas trop capricieux à l'avenir, je croise les doigts. Nathalie, merci pour nos discussions et merci de ton soutien ! Enora, merci de ta bonne humeur, de ton soutien, et ton investissement scientifique dans les projets que je trouve très inspirant ! Rossana, Damien, merci pour nos discussions en fin de thèse, qui m'ont aidée à mieux appréhender cette fin d'aventure. Merci à tous les collègues des labos PHYC et PBA (devenus PHYTOX), merci pour toutes les discussions que nous avons eues au détour des couloirs, j'ai réellement évolué dans un environnement génial pendant ces trois ans et c'est grâce à vous. Merci aussi à Sébastien qui aura égayé mon arrivée à l'Ifremer le matin, ou mon retour le soir ! Merci pour nos discussions et pour ta bonne humeur.

Sébastien, merci de ton accueil au GEPEA, merci de m'avoir initiée à la CPC et à tous les termes relatifs à cette technique, désormais un peu moins flous. Merci d'avoir répondu à mes questions jusqu'à la dernière minute. Merci d'avoir monté ces expériences et de les avoir réalisées avec moi, ainsi qu'Emile que je remercie aussi.

Liêt, merci de ta sagesse. Merci de ton intérêt continu pour ce sujet de thèse et des nombreuses suggestions que tu as proposées au début du projet, qui ont beaucoup apporté dans la construction de la ligne directrice de ces travaux. Raymond, merci mille fois de ton aide dans la construction des capteurs, merci d'avoir revu les plans de conception, de m'avoir aidée à comprendre l'utilité de chaque élément, leur agencement, de m'avoir expliqué les soudures, et de m'avoir fait confiance. Si on m'avait dit que je ferais ça en thèse, je pense que j'aurais ri, et aujourd'hui j'en suis juste très fière, alors merci.

Élise, par où commencer... merci pour tout, depuis plus de trois ans. Merci d'être devenue cette si chère amie que je porte très haut dans mon cœur. Je n'arriverai évidemment pas à mettre par écrit tout ce que j'ai envie de dire, d'ailleurs ça fait de longues minutes que j'essaie d'écrire ces lignes, j'ai dû aller faire une pause-café pour mettre en ordre mes idées (oui, toute excuse est bonne à prendre pour le café). Merci pour tous nos moments, tous nos partages, tous nos

## Remerciements

rires, tous nos entraînements de course, tous ces lundis soir qui vont tant me manquer. Je ne sais pas bien comment je vais tenir le coup quand je serai loin dans l'hémisphère sud de la France, me connaissant je serai extrêmement nostalgique, donc pauvre Théodore, je le plains d'avance. Je m'arrête ici au risque d'écrire autant de remerciements que de résultats de thèse.

À ma partenaire de bureau, ma partenaire d'escalade, ma partenaire d'échecs (jouer à la parlante, il n'y a vraiment que ça de vrai pour progresser), ma partenaire de tablettes de chocolat (je ne parle pas des muscles abdominaux), Agathe, merci pour tout. Comme tu as bien fait de venir en post-doc à Nantes, car que serais-je devenue, si je n'avais pas connu le mot « infu » ? Sûrement pas quelqu'un de bien. Merci pour tout le bonheur que tu m'as apporté, merci de m'avoir supportée les lundis matin, mais également les lundis après-midi, mardi matin, mardi après-midi, etc. Grâce à toi je vais quitter tristement la région nantaise mais rejoindre joyeusement la région PACA. Pour tant de choses encore, merci, mais surtout, merci d'être devenue mon amie.

Juliette, dire que tu es une des personnes qui a le plus compté dans ces travaux de thèse est peu dire. Non seulement par ton dévouement au projet, et toutes les cultures, analyses effectuées, mais également par ta motivation débordante pour ma thèse en général. Je n'aurais pas pu rêver d'une meilleure collègue de travail durant ces six mois, ni d'une meilleure compagne de route pour tout le reste. Je n'ai qu'un seul regret dans cette thèse, c'est de ne pas avoir été à Planète Sauvage (à prononcer comme tu le sais). Merci d'avoir égayé tous ces trajets à Bouin, on retiendra quand même qu'il faut faire attention à ce que la voiture électrique soit bien chargée avant de partir. Tu feras un gros câlin à Pandora (je tairais ici son vrai nom), même si elle me grifferait probablement les yeux en aspirant mon âme au passage. Je pourrais écrire encore des dizaines de lignes, alors je vais simplement terminer en disant que tu n'imagines pas à quel point je suis contente de te rejoindre, toi aussi, dans l'hémisphère sud de la France. Taureau thèse.

Laura, tu m'as dit qu'une simple ligne serait suffisante pour te remercier, mais rien que par esprit de contradiction, c'est non. Fervente membre et co-fondatrice du club des S.A.C., merci d'avoir enchanté cette dernière année de thèse par ta présence, j'ai tant ri que j'ai encore des courbatures aux zygomatiques. Je te souhaite que ta thèse soit aussi heureuse que celle que j'ai vécue, mais comme tu l'as constaté, tu sais maintenant que c'est possible, il faut juste s'entourer des bonnes personnes. Alors c'est ce que je te souhaite, de t'entourer de ceux qui

## Remerciements

t'apportent le plus de bonheur. Et de houmous. J'espère que vous perpétuerez la tradition du lundi soir, car ce sont des petits moments comme ceux-là qui, je crois, mettent le plus de joie dans nos cœurs. En attendant, n'oublie pas que Gabriel est toujours à la recherche de l'effet Doppler avant que son âme ne se jette à l'eau, donc reviens lui à temps.

Antoine, merci pour le nombre incalculable de fou-rires. J'ai d'ailleurs prévu une petite surprise pour ton anniversaire l'année prochaine, j'ai hâte que tu la découvres ! Tu vas voir, c'est vraiment très drôle. Merci pour la dégustation d'algues, j'espère qu'un jour les légumes de la mer feront réellement partie de notre quotidien et que tout le monde viendra te demander des conseils, prépare-toi c'est bientôt l'heure de gloire. En parlant d'heure de gloire, ne lâche rien pour la salsa, je sens que tu es bien parti, la maîtrise du pas de base est proche. Trêve de plaisanterie, sache que si ma fin de thèse était aussi agréable, c'était en partie grâce à toi. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré et j'espère de tout cœur qu'on gardera contact, j'en doute peu mais je préfère anticiper. Ah, et prend bien soin de Brunou et Namazu.

Fanny, merci de ta bonne humeur et de ton soutien durant ces derniers mois, qui m'a touchée. Heureusement que tes connaissances en biologie moléculaire surpassent tes connaissances en animaux domestiques, cela évite qu'on ne se retrouve avec des hybrides épagneuls-oiseaux. Blague à part, j'espère que tu conserveras longtemps, voire pour toujours, ton amour de la science et des choses bien faites. Je te souhaite le meilleur et d'aller aussi loin que possible dans les ambitions que tu te fixes. Et si jamais cela ne fonctionne pas, tu pourras toujours faire les doublages du Palmashow, live your dreams !

Louise, ma première acolyte de bureau, merci de m'avoir si bien accueillie, merci pour tous nos échanges, et merci d'être cette si belle personne que j'ai eu le bonheur de rencontrer. J'ai l'impression que cela date de Matusalem car le début de thèse est si loin maintenant, mais je te rassure, cela n'affecte en rien toute la sympathie que j'ai encore pour toi. D'autant plus que nous allons, comme tu me l'avais écrit en partant, nous retrouver dans le Sud ! J'ai bien pris soin de Bernie qui trône fièrement sur le bureau, et qui me protège très efficacement des mauvaises ondes et mauvais esprits. Sa ressemblance avec un rôti en a déstabilisé plus d'un, mais c'est là toute sa force. Je termine en te disant merci pour tout, je pense très sincèrement que tu as fait de moi quelqu'un de meilleur, de par ton humilité et ta gentillesse.

## Remerciements

Gaël « deux », « petit » Gaël, mon partenaire de premier jour d'embauche, je souris en écrivant ces lignes car je me remémore tant de bons moments passés à rire, à jouer autour d'une grande table, à faire nos séances de fractionné le long de l'Erdre. Merci d'être toi, merci de ton soutien et de tous tes encouragements pour ma thèse, c'est quelque chose qui m'a beaucoup touchée et beaucoup motivée tout du long, vraiment. Je te souhaite le meilleur pour la suite, et j'espère te revoir très vite.

Anne-Cécile, ma très très chère Anne-Cécile, j'ai tant aimé évoluer à tes côtés depuis tant de temps. Je te remercie de notre amitié, que je sais sincère car même loin des yeux, nous ne sommes jamais très loin du cœur. Merci pour ta bonne humeur et surtout pour la confiance que tu m'as toujours accordée et que, j'espère, tu t'accordes à toi même. Du club Piou Piou jusque dans nos activités professionnelles plus sérieuses et en passant par Gwen Stefani, j'ai aimé tous les moments partagés et en garde de mémorables souvenirs. Tu as illuminé ma première année de thèse et je t'en remercie mille fois. Au risque de paraître poétique, je te remercie d'avoir cette si belle âme qui invite à la confiance et au bonheur de l'instant. Je pourrais écrire tant de lignes encore, merci de soutien absolu qui m'a fait tant de bien et qui m'en fait toujours.

Charlotte, quand j'écris ces lignes tu viens tout juste de quitter le bureau, coïncidence ? Peut-être... Merci de m'avoir tant inspirée au début de ma thèse, j'étais très impressionnée et le suis d'ailleurs toujours. J'espère, comme tu l'as probablement fait inconsciemment avec moi, que tu continueras toujours à transmettre ton amour de la science et des choses bien faites autour de toi. Merci de ton aide précieuse dans la rédaction de ce manuscrit et pour toutes les remarques pertinentes que tu m'as faites. Merci également de lutter, par tes moyens, pour une meilleure représentation des femmes dans la recherche et dans le monde. N'en déplaise aux râleurs et râleuses, non ce n'est pas une simple mode, non ce n'est pas une simple lubie. C'est simplement que cela prend du temps, beaucoup de temps, beaucoup beaucoup de temps pour déconstruire et reconstruire sur de nouvelles bases. Mais je suis positive, je pense qu'en s'entourant des bonnes personnes on peut grandement améliorer sa propre condition et irradier ce modèle d'équilibre autour de soi. Merci pour tous nos échanges, merci pour tout.

Théo, merci de ton soutien durant ces quelques mois où nous avons évolué ensemble au labo, et merci évidemment pour nos nombreuses discussions autour du vélo, sport fantastique (n'est-ce pas) qui nous a permis de découvrir les jolies routes autour de Nantes. Je te souhaite

## Remerciements

de pouvoir continuer à grimper des montagnes, notamment le Ventoux mais à deux jambes cette fois. Victor, merci pour tous ces échanges, merci de t'impliquer comme tu le fais dans ton travail, je trouve que c'est très motivant. Merci d'avoir partagé ces vingt kilomètres à Tours, enfin ces dix-sept, avant que tu ne t'envoles vers d'autres cieux pour signer une superbe performance !

Simon, ou plutôt « le Maître de l'humour », merci d'avoir accepté de me supporter en partageant le même bureau. Bon, tu n'avais pas vraiment le choix, mais merci tout de même. Merci de ton aide dans cette étrange discipline qu'est la bioinformatique et spécifiquement la transcriptomique. Tu es tombé à pic dans cette période de thèse où tes compétences m'ont franchement permis d'avancer plus vite. Merci pour toutes nos discussions et tous ces rires, je te souhaite que ta thèse soit aussi belle que la mienne l'a été.

Océane, ma chère compatriote, merci de ton soutien inébranlable et de ta bonne humeur même si tu as connu des jours plus sombres que d'autres. Il nous faut sincèrement plus de personnes comme toi dans ce monde, souriantes et qui profitent de chaque instant de vie. Merci pour tous les compliments que tu m'as adressés, qui m'ont tous fait chaud au cœur. Je te souhaite que ta dernière année de thèse se passe au mieux, fais toi confiance pour aller au bout car je n'ai aucun doute que tout finira bien.

Clémence, merci de ton soutien dans cette dernière année de thèse, et de cet apéritif pour fêter la publication de mon premier article ! Profite bien des deux années suivantes pour continuer à t'éclater dans ce que tu fais, de ton voyage au Danemark et de tout le reste. Julie, j'espère que si tu lis ces lignes ce sera depuis une plage à Tahiti, je te souhaite tout le bonheur du monde là-bas, de profiter au maximum. Merci de ton soutien ! Lena, merci pour ces quelques semaines en ta compagnie et pour ton soutien, je te souhaite le meilleur dans ce super laboratoire dans lequel tu t'es déjà très bien intégrée. Sarah, ces brèves dernières semaines auront été encore plus joyeuses grâce à ta présence, merci d'avoir tant ri ! Je laisse entre tes mains la lourde tâche d'apprendre le pas de base en salsa à Antoine, bon courage. Anaïs, qui aurait pensé que nos années à l'UTC nous auraient menées vers une thèse ? Je te remercie de ton soutien infaillible durant cette période, et pour toutes nos discussions, pour tout.

## Remerciements

Enfin, un immense merci à ma famille, mes parents, mes beaux-parents, mon frère, Éric, Laure, Léopold, Chloé, pour leur soutien dans cette belle aventure qu'a été cette thèse. Merci d'avoir suivi de près ou de loin toutes les étapes, de m'avoir écoutée raconter mes expériences, de m'avoir écoutée râler aussi. Sachez qu'en plus d'être des piliers dans ma vie personnelle, vous l'êtes également dans ma vie professionnelle. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir inspirée pour que jamais je ne me repose sur mes acquis, pour que j'aie toujours de l'avant. Merci de ce conseil que m'a un jour donné mon père et qui m'a toujours suivie : « donne-toi, les moyens, tous les moyens de faire ce que tu aimes dans la vie, car c'est de cette façon qu'on devient heureux ». Aujourd'hui, je suis profondément heureuse et très fière de l'être. Je remercie également mes grands-parents, ceux du présent, et ceux du passé, pour leur soutien et leur amour.

Je ne pouvais pas terminer sans remercier mon compagnon de vie, Théodore, pour tout. Merci d'avoir lu mes articles, de t'être intéressé à chaque étape de la thèse, et de m'avoir tant soutenue dans l'écriture de ce manuscrit. J'ai adoré vivre cette expérience professionnelle à tes côtés, et je vais adorer vivre la suite. Pour le reste, tu sais déjà tout.

Durant cette thèse, qui représente sous bien des angles les trois meilleures années de ma vie, j'ai l'impression d'avoir vécu mille fois. Elle fut écrite avec le cœur, comme on peint un tableau avec de plus en plus de contrastes et orné de détails qui, lorsqu'on s'approche, revêtent tous d'une importance particulière donnant corps à l'ensemble. J'espère qu'elle vous plaira autant que j'ai aimé la mener et l'écrire, je vous souhaite une très bonne lecture.

# Table des matières

Remerciements.....	6
Table des figures.....	17
Table des tableaux et tables .....	25
Table des annexes .....	27
Liste des principales abréviations.....	29
<b>Chapitre 1 – Introduction et état de l’art.....</b>	<b>33</b>
1. Les microalgues.....	33
2. La photosynthèse et les pigments.....	44
3. La fucoxanthine .....	59
4. Objectifs de la thèse .....	88
<b>Chapitre 2 – La photosynthèse chez <i>Tisochrysis lutea</i>.....</b>	<b>93</b>
1. Contexte et objectifs.....	93
2. Matériel et méthodes.....	94
3. Résultats et discussion.....	97
4. Conclusion.....	99
5. Article : The Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein in <i>Tisochrysis lutea</i> : influence of nitrogen and light on FCP gene expression and fucoxanthin synthesis.....	100
<b>Chapitre 3 – Les stratégies de photoprotection chez <i>Tisochrysis lutea</i> .....</b>	<b>131</b>
1. Contexte et objectifs.....	131
2. Matériel et Méthodes.....	132
3. Résultats et Discussion .....	137
4. Conclusion.....	145
5. Article : Light-response in two clonal strains of the haptophyte <i>Tisochrysis lutea</i> : evidence for different photoprotection strategies.....	147
<b>Chapitre 4 – La production de fucoxanthine par <i>Tisochrysis lutea</i> .....</b>	<b>175</b>
1. Contexte et objectifs.....	175
2. Matériel et méthodes.....	178
3. Résultats et Discussion .....	185
4. Conclusion.....	203
<b>Chapitre 5 – Optimisation d’un procédé d’extraction et de purification de la fucoxanthine .....</b>	<b>207</b>
1. Contexte et objectifs.....	207
2. Matériel et méthodes.....	208
3. Résultats et discussion.....	209
4. Conclusion.....	211



5. Article : Improving the extraction and the purification of fucoxanthin from <i>Tisochrysis lutea</i> using centrifugal partition chromatography.....	213
<b>Chapitre 6 – Discussion générale, conclusions et perspectives.....</b>	<b>238</b>
1. La caractérisation de la FCP chez <i>Tisochrysis lutea</i> .....	238
2. L'identification de gènes candidats de la voie de biosynthèse des caroténoïdes .....	242
3. La présence d'échinénone chez <i>Tisochrysis lutea</i> .....	243
4. La régulation de la photoprotection chez <i>Tisochrysis lutea</i> .....	244
5. La montée en échelle de la production de fucoxanthine : l'importance de la disponibilité de la lumière .....	246
6. La Chromatographie de Partage Centrifuge : une méthode innovante pour la purification de fucoxanthine.....	247
7. Conclusion générale de la thèse.....	248
<b>Valorisation scientifique .....</b>	<b>254</b>
1. Publications dans des journaux à comité de lecture.....	254
2. Article soumis et autres.....	254
3. Présentations dans des conférences internationales .....	254
4. Présentations dans des conférences nationales .....	255
5. Autres communications.....	255
<b>Références .....</b>	<b>260</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>298</b>

## Table des figures

<b>Figure 1.</b> Diagramme issu de Roy <i>et al.</i> (2011) [8] montrant l'évolution hypothétique de la diversité des plastes algaux via l'endosymbiose en série, basé sur Delwiche (1999) [9], modifié pour montrer une origine commune à partir d'une algue rouge des plastes des apicomplexes, de la péridinine chez les dinoflagellés et les hétérokontes [6,7]. Les relations évolutives entre cryptophytes, haptophytes, hétérokontes et alvéolates sont encore controversées [6], ainsi que le nombre d'endosymbioses tertiaires [10].	34
<b>Figure 2.</b> Exemples de systèmes de culture de microalgues. (A) Raceways de l'entreprise Earthrise, Californie, USA. (B) PBRs en serpentins de la société Algatech, Israël. (C) PBRs plans de l'entreprise Fotosintetica & Microbiologica, Italie [65]. (D) PBRs tubulaires utilisés durant cette thèse (Chapitre 3).	41
<b>Figure 3.</b> Cellules de <i>Tisochrysis lutea</i> au microscope à fluorescence. Les chloroplastes fluorescent en rouge et les flagelles et noyau en vert (visibles sur les cellules de droite). Crédit photos : Marie Derrien, Ifremer.	43
<b>Figure 4.</b> Schéma simplifié des réactions claires et des réactions sombres de la photosynthèse.	45
<b>Figure 5.</b> Schéma simplifié des voies de biosynthèse des pigments des cyanobactéries et des microalgues, issu de Mulders (2014) [2]. Les flèches pleines représentent des étapes de conversion simples, les flèches en pointillés représentent des réactions groupées (basées sur Falkowski et Raven (2007) [86] et Kanehisa Laboratories (2011) [87]), et les flèches en pointillés représentent des voies hypothétiques (selon Beale (1999) [88], Lohr et Wilhelm (1999, 2001) [89,90] et Wang et Chen (2008) [91]). Les flèches contenant un point d'interrogation représentent des voies non résolues (en 2014). Les couleurs des pigments sont indiquées comme décrit par Jeffrey et al. (1997) [92] et Lee (2008) [93]. Il est à noter que le cycle de la violaxanthine est également appelé cycle de la xanthophylle.	47
<b>Figure 6.</b> Schéma en Z, issu de Masojídek et al. [81], et adapté de Hill et Bendall [99].	49
<b>Figure 7.</b> Schéma de l'antenne collectrice de lumière chez les algues Chromistes dont <i>T. lutea</i> , composée des pigments chlorophylles <i>a</i> et <i>c</i> (Chl <i>a</i> , Chl <i>c</i> ), fucoxanthine (Fx), diadinoxanthine (Ddx), diatoxanthine (Dtx), violaxanthine (Vx) et zéaxanthine (Zx) fixés à la Fucoxanthin Chl <i>a</i> , <i>c</i> binding Protein (FCP).	51
<b>Figure 8.</b> Molécule d'isopentenyl diphosphate	54

<b>Figure 9.</b> Molécule de phytoène, premier caroténoïde .....	54
<b>Figure 10.</b> Molécule de lycopène.....	54
<b>Figure 11.</b> Molécule d' $\alpha$ -carotène (A) et de $\beta$ -carotène (B).....	55
<b>Figure 12.</b> Exemple d'une molécule de zéaxanthine, de la famille des xanthophylles.....	55
<b>Figure 13.</b> Formule générale d'un époxyde .....	56
<b>Figure 14.</b> Schéma des deux cycles des xanthophylles Ddx-Dtx et Vx-Zx : la diadinoxanthine se dé-époxyde en diatoxanthine et la violaxanthine se dé-époxyde en zéaxanthine avec le pigment intermédiaire anthéroxanthine.....	57
<b>Figure 15.</b> Schéma décrivant le passage des états excités à l'état fondamental de la Chl <i>a</i> [169] .....	59
<b>Figure 16.</b> Structure chimique de la molécule de fucoxanthine. ....	60
<b>Figure 17.</b> Quatre isomères de la fucoxanthine, <i>all-trans</i> fucoxanthin, <i>9'-cis</i> fucoxanthin, <i>13-cis</i> fucoxanthin, <i>13'-cis</i> fucoxanthin. ....	61
<b>Figure 18.</b> Voie de biosynthèse hypothétique de la fucoxanthine. Orange : gènes impliqués dans la biosynthèse. ....	67
<b>Figure 19.</b> Proposition de la voie de biosynthèse de la fucoxanthine chez les algues. Les enzymes spécifiques des algues contenant de la diadinoxanthine sont indiquées en marron, tandis que les enzymes spécifiques des algues contenant de la violaxanthine sont indiquées en kaki. « ? » indique les étapes pour lesquelles aucune enzyme n'a été identifiée jusqu'ici. Les intermédiaires écrits en vert s'accumulent dans les mutants de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> dépourvus de l'enzyme VDL2 ou ZEP1. Les flèches rouges en pointillés indiquent une activité enzymatique catalysée par la lumière tandis que les flèches bleues en pointillés indiquent les réactions inverses catalysées en faible lumière. [174] .....	68
<b>Figure 20.</b> Schéma d'un photobioréacteur tubulaire et des principaux paramètres de culture à prendre en compte.....	74
<b>Figure 21.</b> Exemple d'un procédé de purification de la fucoxanthine à partir d'un extrait de <i>T. lutea</i> en utilisant la chromatographie de partage centrifuge.....	84
<b>Figure 22.</b> Applications et marché actuel de la fucoxanthine dans les domaines de l'alimentation, des cosmétiques et de la pharmaceutique. ....	87
<b>Figure 23.</b> Schéma de présentation du travail de thèse.....	90
<b>Figure 24.</b> Schéma simplifié des processus de transcription et de traduction dans une cellule de <i>T. lutea</i> . ARNm = ARN messenger. ....	95

<b>Figure 25.</b> Analyse en cours d'un séquençage NGS. Chaque point représente l'ajout d'un nucléotide sur un fragment. La couleur du point indique la nature du nucléotide en cours d'ajout. Crédit image : Shendure et al., Science, 2005 [404].	96
<b>Figure 26.</b> Cladogram of the 52 Lhcf sequences of <i>Tisochrysis lutea</i> . Orange: Lhcx. Blue: Lhcr. Green: Lhcf.	109
<b>Figure 27.</b> Cladogram of the 134 Lhcf sequences of eight species, <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Fragilariopsis cylindrus</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Chaetoceros gracilis</i> , <i>Saccharina japonica</i> , <i>Saccharina latissima</i> , <i>Emiliana huxleyi</i> , and <i>Tisochrysis lutea</i> . Light green: haptophyte Lhcf. Dark green: diatom Lhcf. Dark red: seaweed Lhcf.	110
<b>Figure 28.</b> Example of a part of the alignment of three Lhcf sequences of <i>P. tricornutum</i> and three Lhcf sequences of <i>T. lutea</i> with binding sites of three Chl <i>a</i> (a404, a405, and a406) and one fucoxanthin (Fx303).	112
<b>Figure 29.</b> Constant light (CL) experiment. Dashed curve corresponds to the first 5 days of culture under N limitation conditions. (A) Evolution of cell biomass expressed as total intracellular C and of qN expressed as intracellular N:C ratio of three culture replicates. (B) Evolution of the Fx:C ratio of three culture replicates. (C) Evolution of the photoprotective pigment ratios: (Ddx + Dtx):C, Ddx:C, and Dtx:C of the three culture replicates. Vertical black dashed lines mark the transition between limitation and repletion, and repletion and depletion in N.	116
<b>Figure 30.</b> CL experiment. Normalized transcript counts of (A) <i>lhcf</i> (green), (B) <i>lhcr</i> (blue), (C) <i>lhcx</i> (orange) genes according to N status (limitation, repletion, and depletion). Analysis of variance (ANOVA) test: *p-value < 0.05, **p-value < 0.01.	117
<b>Figure 31.</b> Dynamic light (DL) experiment. The green curve represents photosynthetically active radiation (PAR) during the day:night cycle. (A) Evolution of the cell biomass expressed as total intracellular C and of the qN expressed as intracellular N:C ratio of the two culture replicates. (B) Evolution of the Fx:C ratio of the two culture replicates. (C) Evolution of the photoprotective pigment ratios: (Ddx + Dtx):C, Ddx:C, and Dtx:C of the two culture replicates. Vertical black dashed line marks the transition between the repletion and depletion phases in N.	119
<b>Figure 32.</b> DL experiment. Normalized transcript counts of (A) <i>lhcf</i> (green), (B) <i>lhcr</i> (blue), (C) <i>lhcx</i> (orange) genes and (D) <i>lhcx2</i> (red) gene according to N status (repletion and depletion) and day:night cycles. ANOVA test: *p-value < 0.05, **p-value < 0.01. The experiment was realized in duplicate and represented by solid (replicate 1) and dotted lines (replicate 2).	

Vertical black dashed line marks the transition between the repletion and depletion phases in N.....	121
<b>Figure 33.</b> Photo du triplicat de culture d'une souche de <i>T. lutea</i> en turbidostat. ....	133
<b>Figure 34.</b> Schéma détaillé de la mise en place d'une culture continue en turbidostat.....	134
<b>Figure 35.</b> Capteur de densité optique entier.....	135
<b>Figure 36.</b> Partie émettrice (A) et partie réceptrice (B) du capteur de densité optique.....	135
<b>Figure 37.</b> Positionnement du capteur de densité optique autour d'une colonne du photobioréacteur.....	136
<b>Figure 38.</b> Evolution du contenu en pigments photoprotecteurs chez deux souches de <i>T. lutea</i> en fonction de l'irradiance. ....	138
<b>Figure 39.</b> Évolution du nombre de transcrits normalisés des facteurs de transcription lhca (moyenne $\pm$ intervalle de confiance) en fonction de l'irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01. ....	144
<b>Figure 40.</b> Evolution of the Chl <i>a</i> content (average $\pm$ the confidence interval, $\text{pg cell}^{-1}$ ) (A), of the Fx content normalized by Chl <i>a</i> (average $\pm$ the confidence interval, $\text{mol}(100 \text{ mol Chl } a)^{-1}$ ) (B), of the maximum PSII quantum yield $F_v/F_m$ (average $\pm$ the confidence interval) (C),relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). *: pvalue < 0.05, **: pvalue<0.01. *: pvalue < 0.05, **: pvalue<0.01.....	155
<b>Figure 41.</b> Evolution of the Ddx+Dtx pool (A) and of the Dtx (B) normalized by Chl <i>a</i> (average $\pm$ the confidence interval, $\text{mol}(100 \text{ mol Chl } a)^{-1}$ ), of the de-epoxidation state (DES) from Ddx into Dtx (C) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). (D) presents the $F_v/F_m$ relatively to Dtx content and the significant difference between the two slopes. *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01.....	156
<b>Figure 42.</b> Evolution of the Vx+Zx pool (A) and of the Zx (B) normalized by Chl <i>a</i> (average $\pm$ the confidence interval, $\text{mol}(100 \text{ mol Chl } a)^{-1}$ ), of the de-epoxidation state from Vx into Zx (C) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). (D) presents the $F_v/F_m$ relatively to Zx content and the significant difference between the two slopes. *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01.....	157
<b>Figure 43.</b> Evolution of the echinenone normalized by Chl <i>a</i> (average $\pm$ the confidence interval, $\text{mol}(100 \text{ mol Chl } a)^{-1}$ ) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). **: pvalue < 0.01. ....	158

<b>Figure 44.</b> Evolution of $F_v/F_m$ (A), of Dtx content (B) and of Ddx content (C) normalized by Chl <i>a</i> (average $\pm$ the confidence interval, mol(100 mol Chl <i>a</i> ) <sup>-1</sup> ) relatively to the time in darkness. ....	159
<b>Figure 45.</b> Heatmap of the <i>hcx</i> transcripts counts. *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01. Thick borders correspond to the highly upregulated <i>hcx</i> genes at 150 PPF in T-4cl3.....	160
<b>Figure 46.</b> Evolution of normalized transcript counts of DDE_L (average $\pm$ the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01.....	162
<b>Figure 47.</b> Evolution of TISO_01606 (VDE_L1) and TISO_02731 (VDE_L2) normalized transcripts counts (average $\pm$ the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01. ....	162
<b>Figure 48.</b> Evolution of TISO_33049 (ZE_L) normalized transcripts counts (average $\pm$ the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux = $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). *: pvalue < 0.05, **: pvalue < 0.01.....	163
<b>Figure 49.</b> Graphique issu des résultats du projet DynAlgue représentant la concentration en fucoxanthine (en $\text{mg.g}^{-1}$ de C) chez les 100 souches clonales de <i>Tisochrysis lutea</i> en fonction de leur taux de croissance ( $\mu$ ).....	176
<b>Figure 50.</b> Montée en échelle de cultures de <i>T. lutea</i> .....	178
<b>Figure 51.</b> Photo du banc de phénotypage des cultures de T-4cl3, T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14 dans des PBRs de 350 mL après 7 jours de culture en duplicats.....	179
<b>Figure 52.</b> Photo des duplicats de culture de T-4cl3 dans des bouteilles de 1 L après 7 jours de culture. Le même système a été mis en place pour les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14.....	181
<b>Figure 53.</b> Photo des duplicats de culture de T-4cl3 dans des ballons de 6 L après 7 jours de culture. Le même système a été mis en place pour les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14.....	182
<b>Figure 54.</b> Photo des triplicats de culture de T-4cl3 dans des scobalites de 300 L après 3 jours (à gauche) et 7 jours (à droite) de culture. Le même système a été mis en place pour les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14.....	183
<b>Figure 55.</b> Centrifugeuse à assiette (à gauche) et pompe péristaltique (à droite) permettant d'acheminer la culture. ....	184

**Figure 56.** Suivi de la densité optique (DO) à 680 nm en fonction du temps des cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées aux ratios N/P 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage..... 187

**Figure 57.** Évolution sur cinq jours de la quantité d'azote (N) dans le milieu de culture de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées aux ratios N/P 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage..... 188

**Figure 58.** Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées aux ratios N/P 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage..... 190

**Figure 59.** Concentration de fucoxanthine par C intracellulaire (mg.g<sup>-1</sup> de C) dans les cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées au ratio N/P 140 sur le banc de phénotypage..... 191

**Figure 60.** Photo des cultures en bouteilles de 1 L des souches T-4cl3 (photos supérieures) et T-5cl6 (photos inférieures) entre le jour 0 et le jour 7..... 192

**Figure 61.** Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 250 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et CCAP 927/14 (jaune : intensité de 250 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>; orange : intensité de 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en bouteilles de 1 L. .... 193

**Figure 62.** Concentration de fucoxanthine (mg.L<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 250 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en bouteilles de 1 L..... 195

**Figure 63.** Photo des triplicats de culture en ballons de 6 L de T-4cl3 (A, intensité de 250 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et de T-5cl6 (B, intensité de 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), après 7 jours de culture. Photo d'un ballon de 6 L de T-4cl3 vidé en fin de culture, et contenant un épais mucus visqueux probablement composé d'EPS (C)..... 196

**Figure 64.** Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 250 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et CCAP 927/14 (jaune : intensité de 350 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) après 7 jours de culture. Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en ballons de 6 L. .... 197

**Figure 65.** Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 250 µmol de

photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) après 7 jours de culture. Les deux souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en ballons de 6 L..... 199

**Figure 66.** Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 200 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 320 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et CCAP 927/14 (jaune : intensité de 320 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) après 7 jours de culture. Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en scobalites de 300 L. 200

**Figure 67.** Concentration d'échinénone par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) au jour 8. A : cultures de 350 mL aux ratios N/P de 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage, à une intensité de 350 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. B : cultures en bouteilles de 1 L au ratio N/P de 4.5, avec T-4cl3 cultivée à 250 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, T-5cl6 cultivée à 500 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, CCAP 927/14 cultivée aux deux intensités. C : cultures en ballons de 6 L au ratio N/P de 4.5 aux mêmes intensités que les bouteilles (sauf la souche CCAP 927/14, cultivée à 300 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). D : cultures en scobalites de 300 L au ratio N/P de 4.5 avec T-4cl3 cultivée à 200 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, T-5cl6 et CCAP 927/14 cultivées à 320 µmol de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>..... 203

**Figure 68.** Characterization of the fractions collected from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract1), using the cyclohexane:MeOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment A). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup>DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin..... 221

**Figure 69.** Characterization of the fractions collected from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment B). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup> DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin..... 224

**Figure 70.** Characterization of the fractions collected from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment C). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup> DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin..... 227

**Figure 71.** Characterization of the fractions collected from an ethanolic extract of *T. lutea* (EtOH-extract), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions



(experiment D). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction ( $\text{mg g}^{-1}$  DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin. .... 230

**Figure 72.** (A) Combined chromatograms of fractions n°10 to n°18, showing peak area (in mAU = milli arbitrary unit) relative to elution time (min). First peak at 2 min is an analysis artefact present in all chromatograms. Second peak at 16.4 min is *trans*-fucoxanthin, third peak at 19.8 min is *cis*-fucoxanthin, zoomed in (B)..... 232

**Figure 73.** (A) Spectrum of a fucoxanthin-enriched fraction in experiment D. (B) Spectrum of a fucoxanthin standard. .... 233

**Figure 74.** Exemple de graphique obtenu en qRT-PCR. Soit A, B et C représentant l'amplification d'un même gène obtenu dans des cellules cultivées dans trois conditions différentes respectivement. CT (en rouge) représente de cycle de température choisi pour comparer l'expression d'un gène dans les trois conditions différentes A, B et C..... 241

## Table des tableaux et tables

<b>Tableau 1.</b> Activités biologiques de la fucoxanthine - études de 2020-2021. La notation "p" signifie que la fucoxanthine a été achetée et non directement purifiée à partir de biomasse d'algues. ....	64
<b>Tableau 2.</b> Contenu et productivité en Fx par différentes espèces de microalgues à partir d'échantillons secs ou frais - études de 2020-2022. La notation "-" signifie que les données n'étaient pas disponibles. ....	70
<b>Tableau 3.</b> Exemple de l'utilisation de liquides ioniques pour l'extraction de caroténoïdes. ...	81
<b>Table 4.</b> Proposal for a new classification of Lhcf. ....	111
<b>Table 5.</b> Binding sites of Chl <i>a</i> and <i>c</i> amino-acid (in capital letters) in <i>T. lutea</i> according to those identified in <i>P. tricornutum</i> [105]. Percentages represent the presence of the amino acid binding sites among all Lhcf sequences of each species. The central ligand of Chl <i>a</i> and <i>c</i> is or is not conserved (shifted or new amino-acid position) compared to Chl <i>a</i> and <i>b</i> binding sites of the LHCII of plants. ....	112
<b>Table 6.</b> Binding sites of Fx amino-acid (in capital letters) in <i>T. lutea</i> according to those identified in <i>P. tricornutum</i> [105]. Percentages represent the presence of the binding sites among all Lhcf sequences of each species. ....	113
<b>Table 7.</b> percentages of lhcf, lhcr or lhcx genes up-regulated at 8:00 h and 12:00 h in DL experiment. ....	122
<b>Tableau 8.</b> Facteurs de transcription des gènes <i>lhc</i> chez <i>T. lutea</i> . ....	142
<b>Tableau 9.</b> Fonction supposée des facteurs de transcription des gènes <i>lhc</i> . ....	145
<b>Table 10.</b> Summary of the pigment content, $F_v/F_m$ , lhcx and lhcr gene expression in T-5cl6 and T-4cl3 cells under the four growth irradiances. Legend for levels: +++ (highest), ++ (high), + (moderately high), - (moderately low), -- (low), 0 (absence). ....	171
<b>Tableau 11.</b> Ratio N/P et concentration en N et en P pour les cultures de 350 mL. ....	179
<b>Tableau 12.</b> Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 aux ratios N/P de 4.5, 9, 90 et 140 au jour 6 de culture. Fraction volumique ( $\text{mm}^3$ de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ ) = $4/3 * \pi * (\text{diamètre}_{/2})^3 * \text{Concentration cellulaire}$ . ....	187
<b>Tableau 13.</b> Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3 et T-5cl6 au ratio N/P de 4.5 dans des bouteilles de 1 L aux jours 6, 7 et 8. Fraction volumique ( $\text{mm}^3$ de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ ) = $4/3 * \pi * (\text{diamètre}_{/2})^3 * \text{Concentration cellulaire}$ . ....	194

<b>Tableau 14.</b> Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 dans les ballons de 6 L au jour 7 de culture. Fraction volumique ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) = $4/3 \cdot \pi \cdot (\text{diamètre}_{/2})^3 \cdot \text{Concentration cellulaire}$ .....	198
<b>Tableau 15.</b> Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 dans les scobalites de 300 L au jour 7 de culture. Fraction volumique ( $\text{mm}^3$ de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ ) = $4/3 \cdot \pi \cdot (\text{diamètre}_{/2})^3 \cdot \text{Concentration cellulaire}$ .....	201
<b>Table 16.</b> Type of extract and volume proportions of the three solvent systems used for CPC .....	216
<b>Table 17.</b> Concentration of chlorophyll <i>c1</i> + <i>c2</i> (Chl <i>c</i> ), Fucoxanthinol (FxOH), fucoxanthin (Fx), violaxanthine (Vx), diadinoxanthine (Ddx), diatoxanthine (Dtx), monohexosyllidiacylglycerol Chl <i>c</i> (Chl <i>c</i> MGDG), chlorophyll <i>a</i> (Chl <i>a</i> ) and $\beta$ -carotene ( $\beta\text{car}$ ) in ( $\text{mg.g}^{-1}$ DW) in the three extracts used for the separation experiments. ....	219
<b>Table 18.</b> Concentration of pigments in the ten fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$ DW), from an acetone extract of <i>T. lutea</i> (Ac-extract1), using the cyclohexane:MeOH:H <sub>2</sub> O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment A). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.....	222
<b>Table 19.</b> Concentration of pigments in the nine fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$ DW), from an acetone extract of <i>T. lutea</i> (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H <sub>2</sub> O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment B). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.....	225
<b>Table 20.</b> Concentration of pigments in the ten fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$ DW), from an acetone extract of <i>T. lutea</i> (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H <sub>2</sub> O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment C). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.....	228
<b>Table 21.</b> Concentration of pigments in the ten fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$ DW), from an ethanolic extract of <i>T. lutea</i> (EtOH-extract), using the cyclohexane:EtOH:H <sub>2</sub> O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment D). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.....	231
<b>Table 22.</b> Pigment extraction with five different amount of absolute EtOH, quantity of EtOH-extract obtained ( $\text{mg.g}^{-1}$ DW) and Fx concentration obtained ( $\text{mg.g}^{-1}$ DW). ....	234

## Table des annexes

### Annexe I. Capteurs de densité optique

- **Annexe I.1.** Schéma général d'un capteur de densité optique et de ses principaux composants. ....297
- **Annexe I.2.** Détail des cartes émettrice et réceptrice des demi-cercles du capteur de densité optique. ....297
- **Annexe I.3.** Détail de la carte électronique du boîtier de connexion reliant les cartes émettrices et réceptrices (câbles gris) à l'embase (double câble noir). ....298
- **Annexe I.4.** Détail de l'embase et des fils soudés reliant le capteur au système d'acquisition du photobioréacteur. ....298

### Annexe II. Supplementary Material de l'article "Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: evidence for different photoprotection strategies"

- **Annexe II.1.** Figure S1, Evolution of *lhcx* normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). Note that the Y axis is different from one gene to another. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01. ....299
- **Annexe II.2.** Figure S2, Evolution of *lhcr* normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). Note that the Y axis is different from one gene to another. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01. ....300
- **Annexe II.3.** Figure S3, Evolution of *lhcf* normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). Note that the Y axis is different from one gene to another. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01. ....301
- **Annexe II.4.** Figure S4, Evolution of growth rate (curves,  $\text{d}^{-1}$ ) and cell concentration (histograms, average  $\pm$  the confidence interval,  $\text{cells mL}^{-1}$ ) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). Growth rates were calculated during the last 24 hours before sampling and are displayed for each replicate. ....303

Table des annexes

- **Annexe II.5.** Figure S5, Evolution of Chl a content (pg cell<sup>-1</sup>) in T-4cl3 during the whole experiment for the three replicates. ....303
- **Annexe II.6.** Figure S6, Evolution of Chl a content (pg cell<sup>-1</sup>) in T-5cl6 during the whole experiment for the three replicates. ....303
- **Annexe II.7.** Table S1, VDE-DDE diatoms. ....304
- **Annexe II.8.** Table S2, VDE haptophytes. ....307
- **Annexe II.9.** Table S3, ZE diatoms. ....308
- **Annexe II.10.** Table S4, ZE haptophytes. ....310
- **Annexe II.11.** Table S5, Interproscan. ....313

## Liste des principales abréviations

- $^1\text{Chla}^*$  : état excité singulet de la chlorophylle *a*
- $^3\text{Chla}^*$  : état excité triplet de la chlorophylle *a*
- ADN, ARN : acide désoxyribonucléique / ribonucléique
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- Chl *a* : chlorophylle *a*
- Chl *c* MGDG : chlorophyll *c* monogalactosyldiacylglycerol
- Chl *c*, *c1* ou *c2* : chlorophylle *c*, *c1* ou *c2*
- CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge
- DDE : diadinoxanthine dé-époxydase
- DDEL ou DDE\_L : diadinoxanthine dé-époxydase *like*
- Ddx : diadinoxanthine
- DES-DD : *de-epoxidation state* de la diadinoxanthine à la diatoxanthine
- DES-VZ : *de-epoxidation state* de la violaxanthine à la zéaxanthine
- DO : densité optique
- Dtx : diatoxanthine
- DW : *dry weight* ou masse sèche
- EPS : exopolysaccharides
- FCP : *Fucoxanthin Chlorophyll a,c binding Protein*
- Fv/Fm : rapport de la fluorescence variable sur la fluorescence maximale, rendement quantique maximal de la photosynthèse
- Fx : fucoxanthine
- FxOH : fucoxanthinol
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- LHC : *light-harvesting complex*
- N : azote
- NPQ : *non-photochemical quenching*
- NPQ qE : *energy-dependant NPQ*
- OCP : *Orange Carotenoid Protein*
- P : phosphore
- PBR : photobioréacteur

## Liste des principales abréviations

- PPF : *photosynthetic photon flux*,  $\mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$
- PSII et PSI : photosystèmes II et I
- RNAseq : analyse transcriptomique
- ROS (ou  $^1\text{O}_2^*$ ) : *reactive oxygen species* ou espèces réactives oxygénées
- T-4cl3 : *Tisochrysis lutea* souche 4 clone 3 (souche RCC1344)
- T-5cl6 : *Tisochrysis lutea* souche 5 clone 6 (souche Ifremer-Argenton)
- VDE : violaxanthine dé-époxydase
- VDEL ou VDE\_L : violaxanthine dé-époxydase *like*
- Vx : violaxanthine
- ZE : zéaxanthine époxydase
- ZEL ou ZE\_L : zéaxanthine époxydase *like*
- Zx : zéaxanthine

---

# CHAPITRE 1

---

Introduction et état de l'art





## Chapitre 1 – Introduction et état de l'art

### 1. Les microalgues

#### 1.1. Origine, diversité et rôle écologique

Les microalgues sont des cellules eucaryotes photosynthétiques. La théorie endosymbiotique suggère que les eucaryotes photosynthétiques ont évolué grâce à l'endosymbiose [1–3], *i.e.* une association symbiotique où l'un des organismes, appelé endosymbionte, est présent à l'intérieur d'une cellule hôte. L'endosymbiose aurait ainsi eu lieu entre des cellules hôtes eucaryotes non photosynthétiques et des endosymbiontes photosynthétiques comme les cyanobactéries ou d'autres microalgues. Les endosymbiontes photosynthétiques, se propageant dans le cytoplasme des cellules hôtes ont évolué et se sont *in fine* transformés en chloroplastes [1]. Ces chloroplastes ont tous de la chlorophylle *a* et de l'alpha- ou bêta-carotène. La première endosymbiose a généré les grandes lignées de microalgues, les algues rouges, vertes et les glaucophytes [4,5]. Cette endosymbiose est à l'origine des plantes terrestres, algues vertes et des macroalgues rouges. Les chloroplastes associés à ces lignées ont des compositions en chlorophylles, caroténoïdes et/ou phycobilliprotéines différentes (Figure 1, encadré A, détaillé dans la section 2.1.2. de ce chapitre). La lignée d'algues vertes a généré les chlorophytes, les prasinophytes, les trébuxiophytes, les mesotigmatophytes puis les chlorarachnophytes, des euglènes et des dinoflagellées avec un plaste de prasinophyte lors de la troisième endosymbiose. Une endosymbiose secondaire n'a laissé que peu de trace à l'exception des apicomplexas, qui sont des issus des lignées d'algue rouge et à l'origine des dinoflagellés et des hétérokontes [6,7], elle est marquée par la présence de trois enveloppes sur le chloroplaste (Figure 1, encadré B). L'endosymbiose tertiaire (Figure 1, encadré C) est à l'origine de la diversité biologique décrite à ce jour. Les cryptophytes, haptophytes, dinoflagellées et hétérokontes ont des plastes issus des lignées d'algues rouge. Les hétérokontes sont à l'origine de la diversité d'algues brunes comme les diatomées, les haptophytes, les kelps, les chrysophytes, etc.

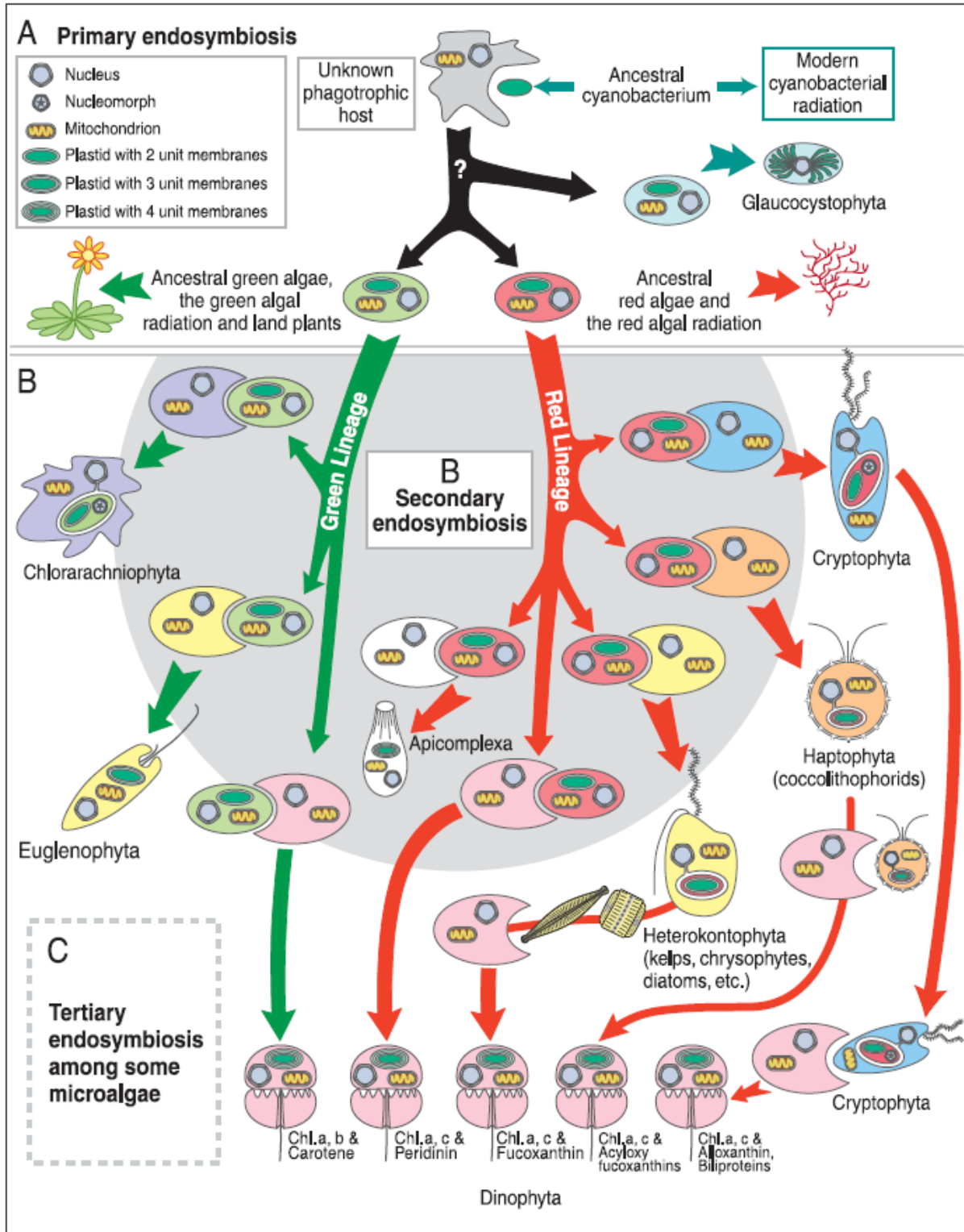


Figure 1. Diagramme issu de Roy et al. (2011) [8] montrant l'évolution hypothétique de la diversité des plastes algaux via l'endosymbiose en série, basé sur Delwiche (1999) [9], modifié pour montrer une origine commune à partir d'une algue rouge des plastes des apicomplexes, de la péridinine chez les dinoflagellés et les hétérokontes [6,7]. Les relations évolutives entre cryptophytes, haptophytes, hétérokontes et alvéolates sont encore controversées [6], ainsi que le nombre d'endosymbioses tertiaires [10].

Bien que parmi les organismes photosynthétiques peuplant notre planète le phytoplancton (cyanobactéries et microalgues) n'en représente qu'un pourcent [11–13], son rôle écologique dans les océans est primordial à l'échelle du globe car il est responsable de 40 à 50 % de la production primaire totale. La production primaire consiste en la conversion du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) en matière organique, processus réalisé grâce à la photosynthèse, qui convertie l'énergie lumineuse en énergie chimique. La fixation du carbone par le phytoplancton est par ailleurs estimée entre 45 et 50 GT [12,13]. En tant que ressource organique primaire, le phytoplancton est situé à la base du réseau trophique. Son importance écologique réside donc également dans le fait que les organismes des niveaux trophiques supérieurs en dépendent, directement ou indirectement [14]. Le zooplancton consomme le phytoplancton, il est ensuite consommé par les poissons, eux-mêmes consommés par les mammifères et oiseaux marins. Cet exemple de réseau trophique n'est pas exhaustif. Par ailleurs, certaines espèces de phytoplancton peuvent, lorsqu'elles atteignent une concentration très élevées, former des efflorescences, appelés des « blooms » et pouvant être visibles à l'œil nu [15]. Les blooms peuvent être néfastes lorsque les espèces synthétisent des toxines qui peuvent s'accumuler dans les réseaux trophiques et générer des intoxications, ils sont alors nommés « *Harmful Algal Blooms* » [15].

En plus des océans, les microalgues en particulier ont colonisé de nombreux milieux comme les eaux douces, saumâtres, les zones nivales, les sources chaudes [16]. Actuellement, bien qu'environ 5000 espèces soient décrites, le nombre réel d'espèces de microalgues est estimé entre 70 000 et 150 000 voire 1 million pour les estimations les plus élevées [17]. En consommant des nutriments inorganiques en produisant des composés organiques, les microalgues contribuent grandement à la régulation des cycles biogéochimiques. Par exemple, grâce à la circulation océanique des masses d'eau et au mélange vertical, elles utilisent le  $\text{CO}_2$  sous forme dissoute dans le milieu environnant à travers la photosynthèse oxygénique. Le  $\text{CO}_2$  est alors transformé en matière organique qui est ensuite elle-même reminéralisée ou respirée, voire séquestrée dans les fonds océaniques [16]. Cette pompe biologique du carbone régule ainsi de manière importante la concentration du  $\text{CO}_2$  atmosphérique [12].

### 1.2. Utilisation des microalgues

En tant que principaux producteurs primaires, les microalgues sont étudiées afin de comprendre leur physiologie en fonction des conditions climatiques, de comprendre leur

comportement dans la chaîne alimentaire, d'anticiper les blooms d'algues toxiques et/ou nuisibles, etc. Au-delà de leur rôle primordial dans les niches écologiques des différents écosystèmes ainsi que dans la biosphère, elles présentent un intérêt grandissant pour de multiples applications. Cette section présente les principaux domaines de valorisation des microalgues.

La valeur nutritionnelle des microalgues est très recherchée car elles contiennent des proportions importantes de protéines, d'acides aminés, d'acides gras essentiels (Oméga 3, Oméga 6, Oméga 7) et de vitamines [18]. De plus, certaines espèces riches en caroténoïdes possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes, entre autres. Historiquement, les microalgues ont ainsi d'abord été utilisées en alimentation animale, et notamment en aquaculture pour les naissains larvaires, les juvéniles de poisson, les mollusques bivalves. Dans les productions aquacoles, il est courant de retrouver les espèces *Isochrysis sp.*, *Tisochrysis lutea*, *Chaetoceros sp.*, *Skeletonema sp.*, *Tetraselmis sp.* [19–22]. Certaines espèces sont par ailleurs étudiées spécifiquement pour la recherche de molécules antimicrobiennes et antifongiques pour lutter contre le développement de pathogènes dans les cultures conchylicoles et aquacoles [23,24].

En alimentation humaine, neuf espèces de microalgues sont pour le moment autorisées par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en France (Saisine n° 2017-SA-0070) [25] : *Auxenochlorella protothecoides*, *Auxenochlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Parachlorella kessleri*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Odontella aurita*, *Parachlorella kessleri* et *Scenedesmus vacuolatus*. En Europe, sont également autorisées les microalgues *Euglena gracilis* sous forme lyophilisée [26] et *Schizochytrium sp.* sous forme d'huile [27], en tant que *novel food*. Il convient de citer également la cyanobactérie du genre *Arthrospira* ou spiruline, qui domine actuellement le marché avec les chlorelles. Majoritairement, ces microalgues sont commercialisées sous forme de poudre ou de produits dérivés comme des capsules et des gélules. On peut les retrouver dans plusieurs préparations du quotidien comme le pain, les gâteaux, les pâtes, etc.

Plus particulièrement, les pigments des microalgues, et notamment les caroténoïdes comme l'astaxanthine, la lutéine, la fucoxanthine, la canthaxanthine, la zéaxanthine, possèdent de très nombreuses propriétés, parmi lesquelles anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, antimicrobiennes, antivirales, etc [28,29]. Nous reviendrons plus particulièrement

sur la fucoxanthine, un des objets d'étude de cette thèse. Ainsi, en plus du potentiel nutraceutique, les microalgues ont un très fort potentiel dans l'industrie pharmaceutique et sont ainsi à l'étude en pharmacologie.

Absorbant principalement de l'azote (N) et du phosphore (P) minéral pour leur croissance, les microalgues sont également à l'étude pour des procédés de décontamination des eaux usées (effluents d'élevage par exemple), et des milieux pollués [30].

Le carburant à base d'algues est un autre procédé de valorisation possible des microalgues, et notamment celles accumulant beaucoup de lipides [31–33]. Bien que ce carburant serait théoriquement propre, renouvelable, et accessible de par la facilité de culture des microalgues, les procédés ne sont pour le moment pas viables économiquement comparés à l'utilisation du pétrole [34]. Les algues sont également des candidates pour la dépollution d'effluents par la fixation de nitrates, de phosphates, de CO<sub>2</sub> [35].

### **1.3. Culture de microalgues**

Que ce soit à des fins d'étude, de recherche, ou industrielles, il existe différents modes de culture des microalgues, selon l'espèce, selon la quantité de biomasse voulue, et essentiellement selon les métabolites d'intérêt. Les microalgues présentent en effet une biochimie variée inter-espèce mais également intra-espèce en fonction des conditions de culture. Pour répondre aux enjeux agroalimentaires [36–38], pharmacologiques, cosmétiques [39,40], et énergétiques [35,41], les microalgues doivent donc bénéficier de systèmes de culture adéquats et ciblés. En aquaculture par exemple, l'intérêt des microalgues en aquaculture réside dans leur teneur en lipides et protéines, les productions en gros volumes et peu coûteuses sont favorisées, comme les bassins extérieurs ou les scobalites (colonnes de 300 L). En revanche l'industrie alimentaire et cosmétique repose sur des molécules à haute valeur ajoutée qui nécessitent des cultures plus contrôlées comme les photobioréacteurs (PBRs).

#### **1.3.1. Les principaux paramètres de culture**

Les principaux paramètres à prendre en compte pour la culture de microalgues sont la lumière, l'apport en nutriments, le pH, la température, et le design du photobioréacteur. Le flux de photons transféré au milieu de culture doit prendre en compte l'atténuation de la disponibilité de la lumière qui sera absorbée due à la pigmentation des microalgues. C'est d'autant plus le

cas pour une culture fortement concentrée en biomasse qui entraîne le phénomène d'auto-ombrage des cellules entre elles. La quantité de lumière reçue n'entraîne pas une réponse linéaire de l'activité photosynthétique des cellules. Au-delà d'une intensité lumineuse dite de saturation, l'excès de lumière entraîne une augmentation des mécanismes de photoprotection voire de photoinhibition des cellules. L'équilibre entre photosynthèse et photoprotection est détaillé en section 2. Le taux de croissance des algues dépend également de leur apport en nutriments tels que l'azote (N), le phosphore (P), et le carbone (C), dont sont constitués les éléments minéraux tels que les nitrates, les phosphates et le  $\text{CO}_2$  sous forme dissoute dans le milieu de culture. Cet apport varie en fonction des besoins biochimiques et de la composition de la souche cultivée. De plus, certains métabolites d'intérêt peuvent être synthétisés par les cellules dans des conditions spécifiques de limitation en N et/ou en P (le concept de limitation est explicité dans la section 1.3.2 de ce chapitre). Dans ce cas, le milieu d'enrichissement de la culture est réalisé avec moins de nitrates et/ou de phosphates. Dans le cas d'une culture mixotrophe (la mixotrophie est la capacité à utiliser plusieurs sources de carbone à la fois inorganiques et organiques), le milieu d'enrichissement sera supplémenté en carbone organique. Par ailleurs, chaque espèce, voire chaque souche, a un pH optimal de croissance, qui est principalement régulé par un apport en  $\text{CO}_2$  dans la littérature scientifique.

### 1.3.2. La limitation en azote et en phosphore chez les microalgues photoautotrophes

L'azote et le phosphore sont deux macronutriments essentiels au métabolisme cellulaire des microalgues. Avec le carbone, ils sont d'une importance quantitative majeure dans la composition de la biomasse [42]. Les microalgues couvrent leurs besoins en azote en assimilant sous forme minérale dissoute les nitrites ( $\text{NO}_2$ ), les nitrates ( $\text{NO}_3$ ), et l'ammonium ( $\text{NH}_4$ ). Les  $\text{NO}_3$  représentent la principale forme de N s'accumulant dans les microalgues [43]. Les  $\text{NO}_3$  sont réduits en  $\text{NO}_2$  puis en  $\text{NH}_4$ , plus facilement assimilable par les cellules par transamination dans les voies anaboliques [44,45]. Le phosphore minéral est quant à lui apporté sous forme de phosphate ( $\text{PO}_4$ ).

Redfield, en 1934, fut le premier à décrire la composition moyenne du phytoplancton dans les océans. Il établit que les concentrations relatives des trois macronutriments C, N et P du phytoplancton évoluent proportionnellement, quelle que soit la profondeur, selon un rapport de 106:16:1 [46]. Il sera nommé le rapport de Redfield [46]. Ces proportions reflètent la composition élémentaire moyenne du phytoplancton mais ne sont cependant pas immuables.

Dans l'environnement naturel, elles peuvent largement varier entre différentes espèces, ou lorsque les cellules stockent de manière importante un macronutriment par exemple [47].

Dans leur environnement naturel, l'accès aux éléments minéraux N et P sous forme dissoute peut être restreint et ainsi induire un ralentissement de la croissance, voire l'arrêt du développement de la population. Ce phénomène est appelé limitation par l'azote, ou limitation par le phosphore. Il est la conséquence d'un déséquilibre entre la disponibilité d'un élément et la demande biologique des cellules pour leur métabolisme. La *mono-limitation* est la limitation induite par l'élément dont la disponibilité est la plus faible. L'élément limitant est alors considéré comme le seul à régir la croissance de la population, c'est la loi du minimum [42]. Les travaux de Droop en 1973 ont introduit l'idée d'une loi multiplicative, émettant l'hypothèse que plusieurs éléments, et notamment les éléments nutritifs, pouvaient interagir et contrôler la croissance [48]. La vérification de cette hypothèse par Droop [49] ainsi que l'apport d'autres travaux sur le sujet ont montré que la loi du minimum prévalait dans la plupart des cas [47,50,51]. Cependant, ils ne réfutaient pas le concept de *co-limitation*, qui statue que deux éléments pourraient interagir pour contrôler la croissance de la population [52]. La *co-limitation* est, depuis, largement admise au sein de la communauté scientifique et se définit par les limitations simultanées de plusieurs ressources [53]. Dans le cas de l'azote et du phosphore, le phénomène de *co-limitation* se traduit par la synergie de l'apport simultané des deux nutriments [42], comme par exemple la nécessité d'apporter à la fois du N et du P pour stimuler la croissance [54].

De manière générale, la limitation d'un élément dans l'environnement naturel ou dans une culture influe, en plus de la croissance, sur la synthèse de métabolites par le phytoplancton. Des approches biotechnologiques visent par exemple à induire volontairement une limitation afin d'obtenir des molécules d'intérêt dans différentes industries. Une limitation en N peut ainsi favoriser le stockage de lipides [38], influencer sur la synthèse de polyesters biodégradables (PHA) [55] ou encore sur la synthèse de caroténoïdes [56–60]. Dans ce travail de thèse, et notamment le Chapitre 4, nous évaluerons l'effet d'une *mono-limitation* en N ou en P sur la synthèse et l'accumulation d'un caroténoïde d'intérêt nommé fucoxanthine chez la microalgue *Tisochrysis lutea*.



### 1.3.3. Les systèmes de culture

Il existe deux principaux types de système de culture, les systèmes ouverts et les systèmes clos. Les systèmes ouverts, généralement maintenus en extérieur, sont utilisés pour cultiver des espèces qui sont, par principe, robustes à la contamination. La culture y est peu contrôlée car tous les paramètres physico-chimiques ne peuvent être maîtrisés, elle est également dépendante des variations saisonnières. Actuellement, les systèmes ouverts regroupent les bassins de lagunages, les étangs, les raceways [61,62], les cultures en ruissellement sur les systèmes plans [63]. Les systèmes clos sont des systèmes de culture en milieu isolé de l'extérieur appelés photobioréacteurs (PBRs). L'utilisation de PBRs permet de s'affranchir d'un risque élevé de contamination et permet surtout de contrôler un maximum de paramètres physicochimiques comme les nutriments, le pH, la température. Les PBRs peuvent être soumis à la lumière naturelle ou artificielle pour appliquer une couleur, une intensité ou une variation spécifique de la lumière. Il existe différentes géométries de PBRs, desquelles dépend l'accès à la lumière par les cellules. Dans un PBR plan, la surface d'incidence de la lumière est supérieure à celle d'un PBR cylindrique ou tubulaire. Un PBR tubulaire ou cylindrique avec un diamètre élevé favorise par exemple l'auto-ombrage des cellules par rapport à un PBR de faible diamètre. Le PBR de forme torique a quant à lui été développé spécifiquement pour les expériences de laboratoire avec une agitation mécanique par hélice marine permettant de s'affranchir des risques de sédimentation interne [64]. Un grand nombre de PBRs sont actuellement commercialisés, de l'échelle laboratoire en petit volume à l'échelle industrielle en grand volume, dans un panel technologique très diversifié.

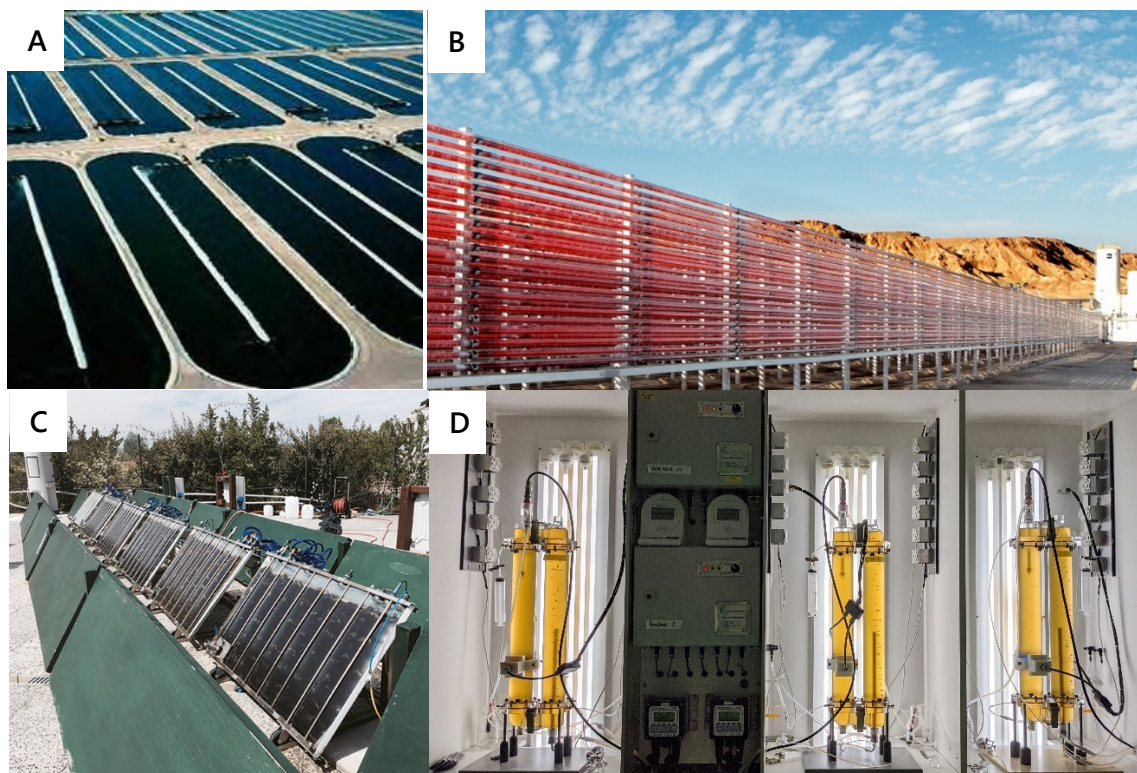


Figure 2. Exemples de systèmes de culture de microalgues. (A) Raceways de l'entreprise Earthrise, Californie, USA. (B) PBRs en serpentins de la société Algatech, Israël. (C) PBRs plans de l'entreprise Fotosintetica & Microbiologica, Italie [65]. (D) PBRs tubulaires utilisés durant cette thèse (Chapitre 3).

#### 1.3.4. Les modes de culture

Indépendamment du système de culture lui-même, différentes méthodes de culture peuvent être mises en places, dépendant des contraintes et objectifs de l'expérience ou de la production [66]. Il y a le mode discontinu (batch), le mode semi-continu (fed-batch), et le mode continu [16].

Le mode discontinu est relativement simple et rapide à mettre en place. Lors de l'ensemencement de la culture, la totalité des nutriments et minéraux nécessaires à la croissance des microalgues est apportée. De ce fait, un ou plusieurs nutriments finissent, une fois consommés par les cellules, par devenir des éléments limitant pour la croissance. Plus exactement, la croissance est limitée par le quota interne des cellules en un élément (principalement le N ou le P) [49]. La culture se développe ainsi en plusieurs phases : la phase de latence (les microalgues s'acclimatent aux conditions écophysiologicals de culture), la phase exponentielle de croissance (le taux de croissance tend vers son maximum, aucun

nutriment n'est limitant), la phase stationnaire (au moins un nutriment est limitant, le taux de croissance est nul) puis la phase de déclin (mortalité cellulaire).

Le mode semi-continu est caractérisé par l'ajout de nutriments au cours de la culture, en plus des nutriments ajoutés au départ. Pour cela, la culture est partiellement récoltée puis diluée avec du milieu nutritif. Ce mode de culture permet d'atteindre une production élevée de biomasse [67].

Enfin, le mode de culture continue est caractérisé par l'ajout de nutriments via du milieu nutritif tout au long de la culture. Ainsi, dans un PBR, la culture est constamment diluée par le milieu nutritif et est évacuée continuellement par une surverse. Le débit est donc le même en entrée et en sortie. En culture continue, les cellules peuvent atteindre un état d'équilibre ce qui n'est pas le cas avec les autres modes. Il existe deux modes de culture continue, le chémostat et le turbidostat. Les cultures en chémostat sont dans un environnement chimique constant maintenu tel grâce à l'application d'un taux constant de dilution de la culture (soit le débit d'ajout du milieu nutritif). Cela permet d'ajouter un nutriment en concentration limitée dont va continuellement dépendre la croissance des microalgues. On dit que les microalgues sont en croissance équilibrée limitée. Les cultures en turbidostat sont des cultures à turbidité constante, c'est à dire à densité cellulaire constante. Le taux de dilution de la culture est automatiquement modifié en mesurant en continu la densité cellulaire par mesures de densité optique (DO). Il n'y a aucun nutriment limitant en turbidostat. Les microalgues sont en croissance équilibrée non limitée.

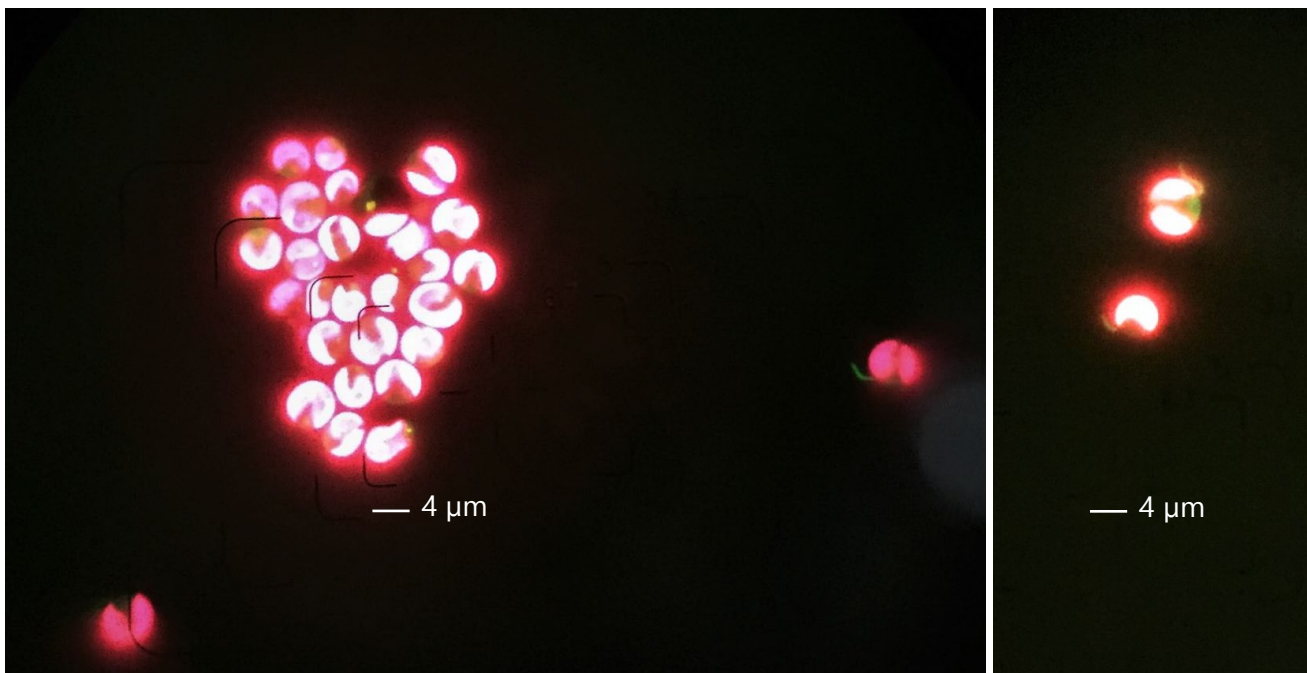
Dans cette thèse, plusieurs modes de cultures ont été utilisés dans différents types de PBRs. Le Chapitre 2 présente des expériences menées en chémostat, le Chapitre 3 présente des expériences menées en turbidostat (dont le fonctionnement est détaillé dans le Matériel et méthodes), le Chapitre 4 présente des expériences menées en discontinu (batch).

#### **1.4. Le modèle d'étude : *Tisochrysis lutea***

*Isochrysis affinis galbana* est une microalgue marine qui fait partie du phylum des haptophytes, de l'ordre des Isochrysidales. Etant très proche de l'espèce *Isochrysis galbana*, elle a été renommée *Tisochrysis lutea* après des analyses moléculaires ayant souligné des différences génétiques considérables entre les deux espèces [68]. Son nom est inspiré du lieu où elle a été isolée pour la première fois, Tahiti. Les cellules de *T. lutea* mesurent entre 4 et 9  $\mu\text{m}$  en moyenne

et possèdent deux flagelles apicaux de taille égale, aussi appelés flagelles moteurs car ils permettent la mobilité des cellules (Figure 3). Comme tous les haptophytes, *T. lutea* est caractérisée par un haptonème. L'haptonème est un appendice filiforme ayant probablement un rôle dans la nutrition cellulaire par phagotrophie [69]. Contrairement à d'autres espèces de l'ordre des Isochrysidales, le genre *Tisochrysis* est dit « nu » car il n'arbore pas de coccolithes, soit des plaques de calcaires sécrétées par la cellule elle-même et l'entourant. À la place, *T. lutea* possède une très fine couche de pseudo-écailles calcaires.

L'importance écologique de *T. lutea* et plus généralement des haptophytes est capitale. Les haptophytes sont un groupe de microalgues ubiquistes [70,71] apparues il y a approximativement 824 millions d'années [72]. Elles sont responsables d'une grande partie de la production primaire dans les océans et jouent un rôle important dans les flux de carbone [73–75]. Certaines espèces ont également été trouvées dans des milieux d'eau douce, en tant que symbionte de radiolaires (zooplancton) ou de foraminifères (protozoaires unicellulaires) [76,77].



**Figure 3. Cellules de *Tisochrysis lutea* au microscope à fluorescence. Les chloroplastes fluorescent en rouge et les flagelles et noyau en vert (visibles sur les cellules de droite). Crédit photos : Marie Derrien, Ifremer.**

*T. lutea* plus particulièrement est une microalgue haptophyte d'intérêt dans de nombreux domaines comme l'aquaculture, la nutrition humaine, la pharmacologie, la cosmétique, voire

les carburants verts. Elle synthétise, entre autres, un oméga 3 appelé l'acide docosahexaénoïque (DHA), ainsi qu'un de ses précurseur l'acide stéaridonique (SDA), qu'elle peut accumuler dans ses cellules jusqu'à 30% de sa masse sèche [78]. Cette proportion peut varier selon les conditions écophysiologiques de culture. Une étude par Garnier et al. a également caractérisé une souche mutante de *T. lutea* capable d'accumuler encore plus de lipides [38]. De plus, elle possède de nombreux pigments caroténoïdes comme la fucoxanthine et le  $\beta$ -carotène par exemple, aux propriétés anti-oxydantes, anti-cancéreuses, anti-obésité, anti-inflammatoires, etc. [79,80].

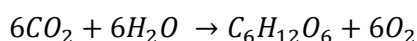
## 2. La photosynthèse et les pigments

### 2.1. Le processus photosynthétique

#### 2.1.1. La conversion d'énergie

La photosynthèse est un processus énergétique né il y a 3,5 milliards d'années. Il en existe deux formes. La photosynthèse anoxygénique fut la première à apparaître chez une bactérie photoautotrophe et concerne aujourd'hui majoritairement les bactéries dites pourpres sulfureuses (bactéries photoautotrophes sulfo-oxydantes). La seconde forme est la photosynthèse oxygénique, qui concerne les végétaux supérieurs, les cyanobactéries, et les algues eucaryotes (les macroalgues et les microalgues) [81].

La photosynthèse oxygénique est une réaction d'oxydo-réduction, convertissant l'eau et le dioxyde de carbone en dioxygène et en glucides via la formule suivante :



On y distingue deux groupes réactionnels comprenant les réactions dites « claires » et celles dites « sombres ». Les réactions claires transforment l' $H_2O$  en  $O_2$ , et consistent à capter les photons intrants via le flux de lumière, à transférer les électrons via les photosystèmes, et à déplacer les protons afin de produire des molécules de  $NADPH_2$  et d'ATP. Ces molécules permettent d'assimiler le carbone inorganique ( $CO_2$ ) et de le transformer en carbone organique sous forme de glucides qui seront utilisés pour le métabolisme cellulaire des algues, *i.e.* pour la croissance. L'assimilation du carbone et la synthèse de glucides sont les réactions sombres, elles ont lieu dans le stroma du chloroplaste. Ces réactions sont représentées et explicitées à l'aide du schéma ci-dessous (Figure 4), inspiré des travaux de Hall et Rao et ceux de Masojídek

et al. [81,82]. Le détail des réactions claires et la description des cinq complexes du thylakoïde sont expliqués dans la section 2.2 de ce chapitre.

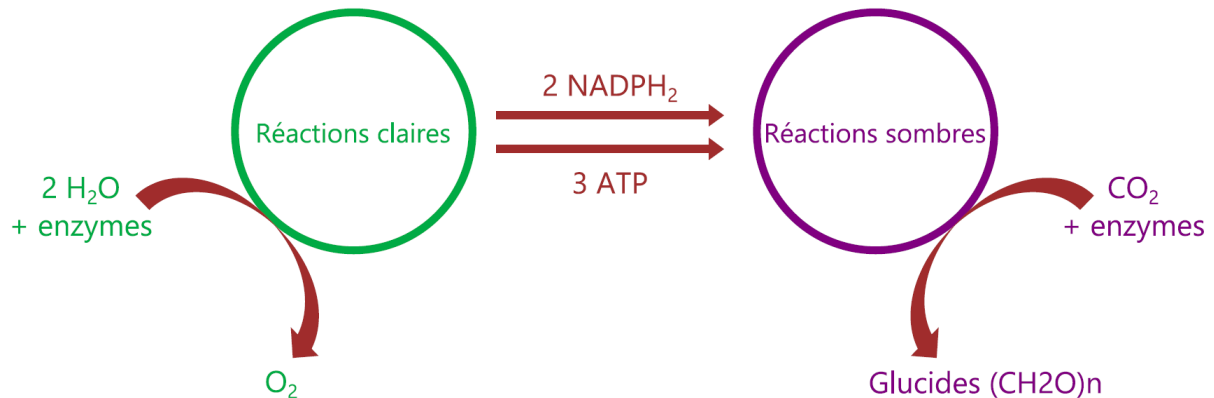


Figure 4. Schéma simplifié des réactions claires et des réactions sombres de la photosynthèse.

#### 2.1.2. Le rôle des pigments

Les pigments ont deux fonctions principales chez la cellule végétale, la photosynthèse et la photoprotection, on retrouve ainsi les pigments photosynthétiques et les pigments photoprotecteurs. Ils font partie de l'antenne collectrice du photosystème et permettent de capturer les photons afin de déclencher la chaîne de transfert d'électrons. Ainsi, la nature et l'intensité de la lumière dans l'environnement des photoorganismes conditionnent la régulation de ces pigments. Par exemple, en lumière bleue-verte, soit les longueurs d'onde d'absorption des pigments photosynthétiques, il y aura plus de caroténoïdes qu'en lumière blanche [83].

L'antenne collectrice comprend plusieurs familles de pigments comme les chlorophylles, les caroténoïdes, les phycobiliprotéines, certains pigments étant spécifiques d'un taxon [84]. Ces familles de pigments sont complémentaires non seulement dans la fonction photosynthétique ou photoprotective, mais également dans la capacité à capter des photons à différentes longueurs d'onde [85]. En fonction des lignées d'algues, les compositions pigmentaires sont différentes et sont présentées ci-dessous [8].

On distingue ainsi trois grands groupes d'algues contenant des pigments discriminants :

- Les Plantae (microalgues vertes)

Les pigments caractéristiques sont la chlorophylle *b*, la lutéine, la violaxanthine, la zéaxanthine, l'astaxanthine et la néoxanthine.

- Les Eubacteria et Glaucophytes (cyanobactéries, algues bleu-vert)

Les pigments caractéristiques sont les myxoxanthophylles et les phycobiliprotéines. Les Glaucophytes sont caractérisées par la zéaxanthine et la phycocyanine, qui leur donne une couleur bleu-vert.

- Les Chromista (microalgues brun-doré et microalgues rouges)

Les microalgues rouges ont gardé leur phycobilisome « primitif » avec les phycobiliprotéines. Les pigments caractéristiques des hétérokontes, et des haptophytes sont la chlorophylle *c*, la fucoxanthine, la diadinoxanthine et la diatoxanthine. Certaines chromistes possèdent de la chlorophylle *c* mais pas de fucoxanthine, c'est le cas des cryptophytes. Ces microalgues sont rouges et leurs pigments caractéristiques sont l'alloxanthine, la monadoxanthine, la crocoxanthine et l' $\alpha$ -carotène.

La Figure 5 identifie les pigments majeurs des cyanobactéries et des microalgues ainsi que leur voie de biosynthèse connue ou supposée.

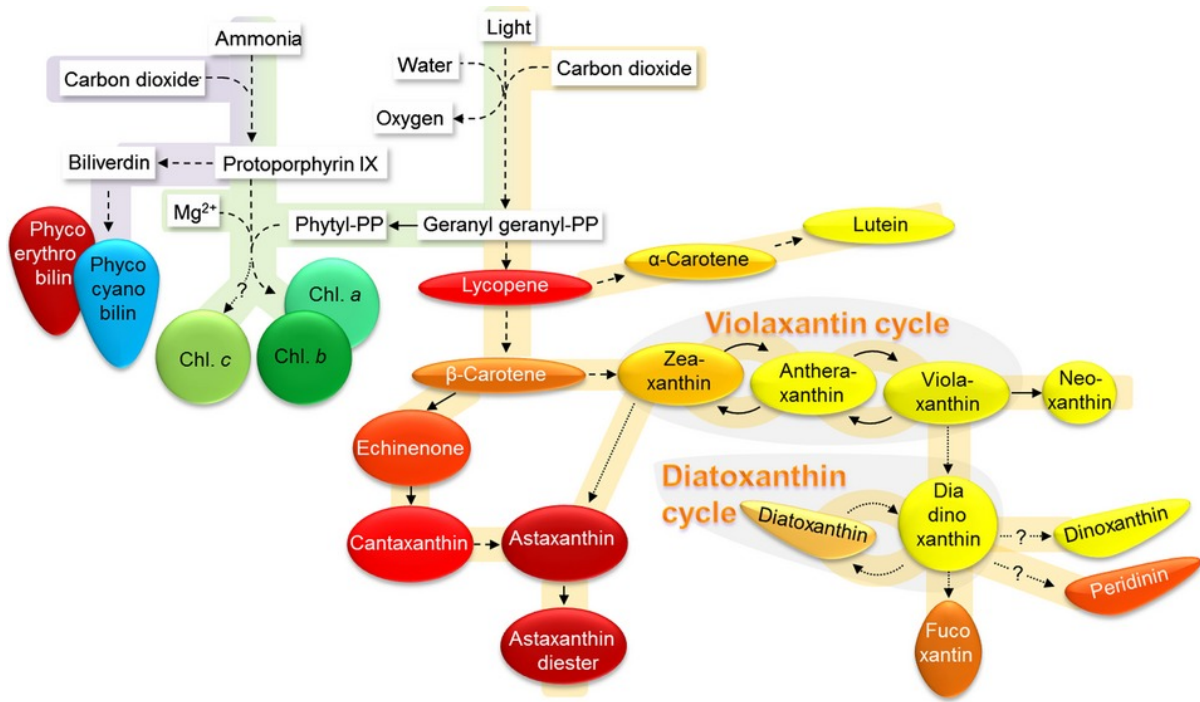


Figure 5. Schéma simplifié des voies de biosynthèse des pigments des cyanobactéries et des microalgues, issu de Mulders (2014) [2]. Les flèches pleines représentent des étapes de conversion simples, les flèches en pointillés représentent des réactions groupées (basées sur Falkowski et Raven (2007) [86] et Kanehisa Laboratories (2011) [87]), et les flèches en pointillés représentent des voies hypothétiques (selon Beale (1999) [88], Lohr et Wilhelm (1999, 2001) [89,90] et Wang et Chen (2008) [91]). Les flèches contenant un point d'interrogation représentent des voies non résolues (en 2014). Les couleurs des pigments sont indiquées comme décrit par Jeffrey et al. (1997) [92] et Lee (2008) [93]. Il est à noter que le cycle de la violaxanthine est également appelé cycle de la xanthophylle.

On s'intéresse particulièrement au rôle des pigments des algues brunes et brunes-dorées, dont fait partie *T. lutea*.

### Rôle des chlorophylles

Les algues rouges, brunes et dorées, dont les diatomées (bacilliarophytes) et les haptophytes, possèdent deux types de chlorophylles, la chlorophylle *a* (Chl *a*) et la chlorophylle *c* (Chl *c*) [94]. À titre de comparaison, les végétaux supérieurs possèdent la Chl *a* et la chlorophylle *b* (Chl *b*). La Chl *a* a pour rôle de convertir l'énergie photochimique. La Chl *c* est une chlorophylle dite secondaire, généralement en proportion inférieure. La littérature reste cependant peu fournie quant au rôle spécifique de la Chl *c*. Une hypothèse émise en 2001 fait état d'un rôle de consolidateur du photosystème pour les chlorophylles secondaires [95]. Le magnésium central des Chl *c* aurait tendance à former des liaisons de coordination plus fortes avec la protéine de fixation des pigments correspondante dans l'antenne collectrice (cette protéine est nommée



Chl *a,c* binding protein). Cette meilleure coordination permettrait d'améliorer la formation du complexe de capture de lumière et son importation vers le chloroplaste. Les Chl *c* ont également la capacité d'absorption de photons à des longueurs d'onde légèrement décalées de celles de la Chl *a*.

### **Rôle des caroténoïdes**

Chez les microalgues, on retrouve un grand nombre de caroténoïdes différents, dont les 47 plus importants sont référencés par Jeffrey et al. [96]. Ils complètent le rôle des chlorophylles en capturant les photons et assurent la photoprotection des cellules lorsqu'elles sont soumises à une intensité lumineuse élevée. Les caroténoïdes composent en effet, avec les chlorophylles, l'antenne collectrice de lumière des cellules. Ils ont un double rôle fondamental pour les photoorganismes, ce sont les premiers récepteurs de lumière au niveau de la membrane du thylakoïde. Les caroténoïdes transfèrent l'énergie lumineuse aux chlorophylles afin d'enclencher la chaîne de transport d'électrons et produire de l'énergie chimique. Certains sont donc des pigments dits photosynthétiques. D'autres caroténoïdes quant à eux permettent de dissiper l'énergie en surplus sous forme de chaleur lorsque l'irradiation est trop importante [97,98]. Certains caroténoïdes sont donc qualifiés de pigments photoprotecteurs. Chez les algues Chromistes comme les diatomées et les haptophytes, le pigment caroténoïde majoritaire est la fucoxanthine. Sa fonction biologique chez les algues et chez les mammifères ainsi que sa biosynthèse, sa biodisponibilité et tout ce qui a trait à sa production et son extraction sont détaillés dans la section 3. « La fucoxanthine » de ce chapitre.

## **2.2. Le thylakoïde et les réactions claires**

Les réactions claires de la photosynthèse ont lieu dans la membrane du thylakoïde, où l'énergie lumineuse est captée puis transformée. Le thylakoïde est formé de quatre complexes majeurs :

- **L'antenne collectrice de lumière**
- Les centres réactionnels :
  - o **Le photosystème II (PSII)**
  - o **Le photosystème I (PSI)**
- Les centres de transport d'électrons et de photophosphorylation
  - o **Le cytochrome  $b_6/f$**
  - o **L'ATP synthase**

Les deux centres réactionnels des réactions claires, le PSII et le PSI, permettent de créer une chaîne de transport d'électrons nécessaires aux réactions redox et à la formation des deux molécules énergétiques  $\text{NADPH}_2$  et ATP. Cette chaîne est souvent illustrée sous forme de « schéma en Z » grâce aux travaux de Hill et Bendall de 1960 [99] (Figure 6).

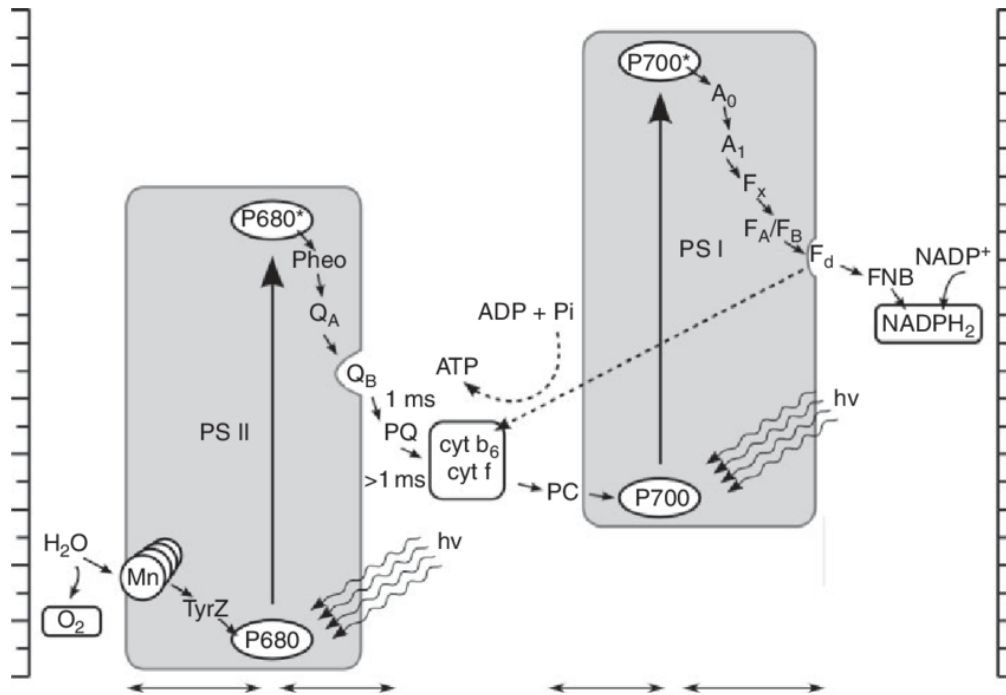


Figure 6. Schéma en Z, issu de Masojídek et al. [81], et adapté de Hill et Bendall [99].

### 2.2.1. L'antenne collectrice de lumière et la FCP

L'antenne collectrice de lumière, ou light-harvesting complex (LHC) dans la littérature, est la première étape du processus de photosynthèse. Sa fonction est de capturer des photons lumineux et de transférer l'énergie lumineuse aux centres réactionnels PSII et PSI. Ainsi, l'antenne collectrice initie la chaîne de transport d'électrons. Elle est composée des pigments photosynthétiques, des pigments photoprotecteurs, et d'un complexe protéique sur lequel les pigments se fixent. Il existe trois sortes d'antenne collectrice selon les groupes de photoorganismes oxygéniques. Le LHCI et le LHCII sont spécifiques des algues vertes et des plantes supérieures. Le phycobilisome, comprenant les phycobiliprotéines (pigments) et l'Orange Carotenoid Protein (OCP), est spécifique des cyanobactéries. Enfin, l'antenne collectrice spécifique des algues brunes et brunes-dorées (dont *T. lutea*) est caractérisée par la

Fx et la Fucoxanthin Chl *a,c* binding Protein (FCP, Figure 7). Pour cette thèse, nous nous focalisons sur la description et l'analyse de la FCP et des pigments associés.

Une des premières études sur la FCP remonte à 1977, dans laquelle J.T.O. Kirk déclarait « Nous avons désormais montré qu'il est possible d'extraire un complexe de fucoxanthine à partir de chloroplastes d'algues brunes sous une forme dans laquelle l'association moléculaire (éventuellement un lien spécifique caroténoïde-protéine) responsable de l'augmentation de l'absorption entre 500 et 560 nm *in vivo* est toujours intacte. Il est maintenant possible d'investiguer la nature de cette liaison » [100].

Chez les algues Chromistes, les FCP appartiennent à la superfamille des protéines LHC transmembranaires, et sont actuellement bien décrites chez les diatomées dans la littérature [101]. Les FCP fixent les pigments photosynthétiques tels que la Fx, les Chl *a* et *c* et la diadinoxanthine, pouvant être dé-époxydée en diatoxanthine pour la photoprotection [94,102,103] (Figure 7). Ces pigments sont présentés de manière détaillée dans la section 2.3 de ce chapitre. La conformation des FCP et des pigments associés confère aux Chromistes une très forte capacité d'absorption dans le spectre bleu-vert de la lumière visible, qui sont les rayonnements les plus disponibles dans la colonne d'eau [104,105]. Les études sur les séquences protéiques composant les FCP ont caractérisé trois familles principales (Lhcf, Lhcr et Lhcx) [106–108]. Chez les diatomées, il existe également deux autres familles dont la fonction est inconnue à ce jour, les Lhcz et Lhcq, les Lhcq étant couramment retrouvés dans le PSI des algues rouges [109,110]. Les Lhcf sont les protéines dominantes des FCPs, elles sont proches du PSII PSII [111,112], tandis que les Lhcr sont proches du PSI [109,113]. Les Lhcf et Lhcr fixent principalement les pigments photosynthétiques tels que la Fx et les Chl *a* et *c*. Enfin, les protéines Lhcx jouent un rôle dans la photoprotection [114–117]. On suppose que les protéines Lhcx fixent la Ddx et par conséquent la Dtx chez les diatomées (Beer *et al.*, 2006; Zhu & Green, 2010; Lepetit *et al.*, 2013). Les gènes de la FCP codant pour les trois familles de protéines sont appelés respectivement *lhcf*, *lhcr* et *lhcx* (c'est à dire les gènes *lh*).

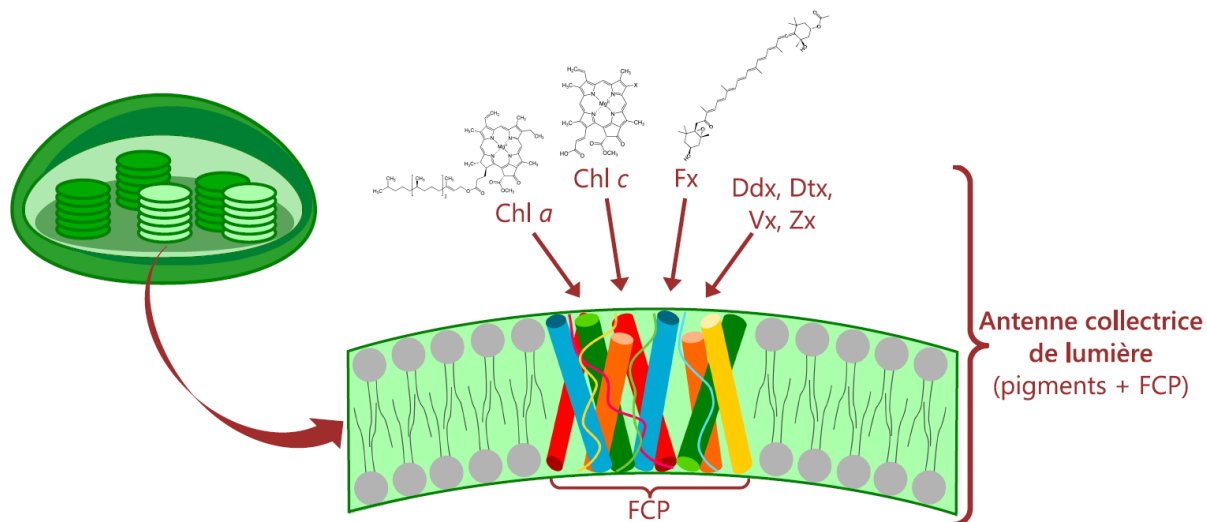


Figure 7. Schéma de l'antenne collectrice de lumière chez les algues Chromistes dont *T. lutea*, composée des pigments chlorophylliens a et c (Chl a, Chl c), fucoxanthine (Fx), diadinoxanthine (Ddx), diatoxanthine (Dtx), violaxanthine (Vx) et zéaxanthine (Zx) fixés à la Fucoxanthin Chl a, c binding Protein (FCP).

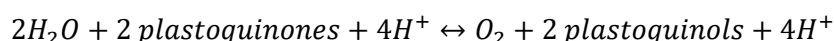
Les études sur la structure des FCPs et les gènes *lhc* ont été principalement menées sur des diatomées, dont les mécanismes photosynthétiques et photoprotecteurs sont désormais bien décrits [121,122]. Chez la diatomée centrique (à symétrie radiale) *Chaetoceros gracilis*, deux supercomplexes FCP ont été caractérisés : le PSII-FCPII et le PSI-FCPI. Par des analyses de cryo-microscopie électronique (cryo-EM), il a été constaté que les pigments ne se fixaient pas de la même façon sur le PSI-FCPI [109,113] et sur le PSII-FCPII [111,112]. Chez une autre diatomée centrique, *Cyclotella meneghiniana*, deux supercomplexes ont également été caractérisés, le FCPa et le FCPb. Le complexe FCPa, supposé associé au PSII, est un trimère, contenant les protéines Lhcf et Lhcx, il est donc à la fois impliqué dans la photosynthèse et dans la photoprotection. Le complexe FCPb, supposé faiblement associé au PSI, est un oligomère de plus de trois monomères, et contient uniquement des Lhcf, il est donc uniquement impliqué dans la photosynthèse [118,123]. Chez l'espèce modèle *Phaeodactylum tricorutum*, une diatomée pennée (à symétrie bilatérale), le complexe FCP est composé de 17 protéines Lhcf, 14 protéines Lhcr et 4 protéines Lhcx [101]. Dans une description approfondie de l'antenne collectrice de *P. tricorutum* à l'aide d'une analyse cristallographique, 9 sites de liaison des Chl a et c ont été identifiés ainsi que 7 sites de liaison de la Fx, parmi les 17 séquences Lhcf [105]. Il a été démontré que les molécules de Chl a et de Fx étaient étroitement liées (c'est-à-dire que chaque molécule Fx était proche d'une molécule de Chl a) [105]. Cette

proximité spatiale permet un transfert et une dissipation efficaces de l'énergie entre les deux pigments [124–127].

Contrairement aux diatomées, les FCP des haptophytes ont été peu décrites, à l'exception d'*Emiliana huxleyi*, l'espèce modèle de ce phylum. Les FCP d'*E. huxleyi* sont composées de 66 protéines (codées par 75 gènes) subdivisées en cinq groupes, Lhcf group1, Lhcf group2, Lhcf(red), Lhcz-like, LI818-like [128,129]. Ces groupes ont été déterminés d'après la classification de la superfamille LHC de Koziol et al. en 2007 [130] et n'a pas été mis à jour depuis. Dans Koziol et al., 2007 et de manière générale, le groupe LI818/LI818-like est lié à la photoprotection, le groupe Lhcr/Lhcc correspond au LHC des algues rouges et des cryptomonades, le groupe Lhcf correspond aux FCP, et le groupe Lhcz n'a pas de fonction spécifique connue [130]. Parce que les haptophytes sont des descendants directs de la lignée des cryptomonades [131,132], le groupe Lhcf(red) d'*E. huxleyi* a été nommé d'après le groupe Lhcr/Lhcc.

### 2.2.2. Le photosystème II (PSII)

Durant le processus de photosynthèse, le PSII intervient en seconde position après la capture des photons par les pigments de l'antenne collectrice. Il est également situé dans la membrane des thylakoïdes des organismes photosynthétiques oxygéniques. C'est le premier centre réactionnel par lequel circule les électrons induisant les réactions d'oxydo-réduction. C'est un complexe dit multimérique car il comprend également un complexe d'oxydation de l'eau aboutissant à la formation d'O<sub>2</sub> [133] durant la réaction suivante :



Les plastoquinones sont des médiateurs transmembranaires de réactions redox [133,134]. Les électrons transitent à travers les plastoquinones pour accéder aux différents centres réactionnels du PSII (comme le centre chlorophyllien P<sub>680</sub> par exemple). Les composants du PSII peuvent être classés en deux groupes, selon s'ils sont accepteurs ou donateurs d'électrons. Des explications exhaustives de la chaîne de transfert d'électrons dans le PSII sont données par J. McEvoy et G. Brudvig [133]. Chez les diatomées, il a été démontré très tôt que des mécanismes encore inconnus à cette époque (1986) permettaient d'adapter le transfert de l'énergie d'excitation de la lumière incidente au PSII selon les conditions d'intensité lumineuse [135]. Cette observation a permis de mieux comprendre la répartition écologique des diatomées dans

des environnements dont la luminosité est très différente [136,137]. Par la suite, il sera démontré que l'antenne collectrice joue également un rôle fondamental en régulant la synthèse de pigments.

### 2.2.3. Le cytochrome b<sub>6</sub>/f

Le cytochrome b<sub>6</sub>/f assure le transfert des électrons entre le PSII et le PSI [138]. A l'aide d'une plastoquinone, les électrons évoluent du PSII au cytochrome b<sub>6</sub>/f [134], puis du cytochrome au PSI. Pendant les réactions claires, il génère également un gradient électrochimique transmembranaire de protons conduisant à la synthèse d'ATP [139].

### 2.2.4. Le photosystème I (PSI)

Le photosystème I est, comme le PSII, un système multimérique intermembranaire. Il est le cœur des réactions photochimiques qui induisent un potentiel redox et la synthèse des molécules de NADPH<sub>2</sub>. Ces dernières, combinées à l'ATP généré par le gradient du cytochrome, permettra de produire des glucides au cours des réactions sombres dans le stroma des chloroplastes. Plus précisément, le PSI est chargé de transférer les électrons depuis le cytochrome b<sub>6</sub>/f (côté lumen du thylakoïde) jusqu'à la ferredoxine (côté stroma du chloroplaste) [140].

## 2.3. Les pigments caroténoïdes

### 2.3.1. La biosynthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes regroupent la famille des carotènes et la famille des xanthophylles [141]. Leur biosynthèse, bien qu'elle ne soit pas encore totalement élucidée pour certains pigments, se compose de cinq étapes principales connues [8] :

#### 1- **La génération d'isoprène actif.**

L'isoprène actif est en réalité le nom donné à l'isopentenyl diphosphate (ID, Figure 8) et à son isomère, le diméthylallyl diphosphate (DD) [8], précurseurs chimiques de nombreuses réactions menant à la production de caroténoïdes mais également de stérols et terpénoïdes. Une unité d'isoprène actif peut être synthétisée chez les plantes et les algues par deux voies différentes. La voie du mévalonate, à partir de l'acide mévalonique, est une voie cytosolique [142], tandis que la voie alternative du méthylérythritol phosphate se déroule dans le plaste des cellules [143].

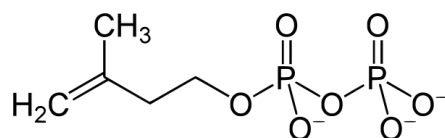


Figure 8. Molécule d'isopentenyl diphosphate

## 2- La formation du premier caroténoïde, le phytoène

Le phytoène se forme par condensation de huit unités d'isoprène actif. Dans un premier temps, une molécule de DD et trois molécules d'ID se condensent pour former une molécule de géranylgeranyl diphosphate (GGPP) [144]. Puis, deux molécules de GGPP se condensent pour former le phytoène (Figure 9).

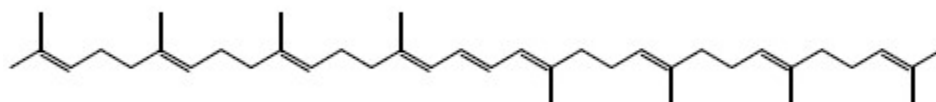


Figure 9. Molécule de phytoène, premier caroténoïde

## 3- La formation du lycopène

Le lycopène est un carotène que l'on retrouve chez certains légumes et certains fruits de couleur rose à rouge. Il est considéré comme un anti-oxydant puissant [145]. Il est formé par plusieurs réactions séquentielles de désaturation et d'isomérisation à partir du phytoène (Figure 10) [8].

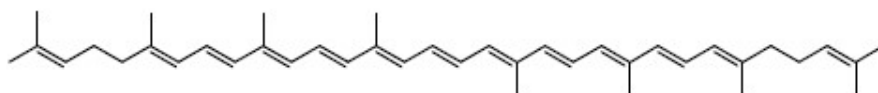


Figure 10. Molécule de lycopène

## 4- La cyclisation des extrémités du lycopène

Cette étape permet de scinder les carotènes en deux branches, les  $\alpha$ -carotènes et les  $\beta$ -carotènes, suivant la position des doubles liaisons formées par la cyclisation (Figure 11) [8].

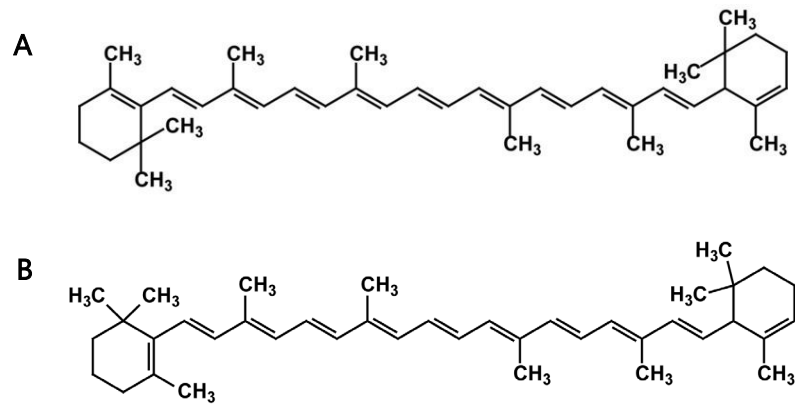


Figure 11. Molécule d' $\alpha$ -carotène (A) et de  $\beta$ -carotène (B)

### 5- Formation de la famille des xanthophylles

Les xanthophylles sont des dérivés des carotènes, formés par introduction d'une molécule d'oxygène sur les carotènes. Les extrémités cyclisées se parent alors d'un groupement hydroxyde (Figure 12).

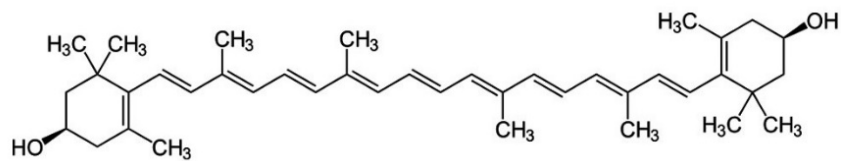


Figure 12. Exemple d'une molécule de zéaxanthine, de la famille des xanthophylles

Chez les Chromistes (dont *T. lutea*), les xanthophylles sont : la fucoxanthine (Fx), la diadinoxanthine (Ddx), la diatoxanthine (Dtx), la violaxanthine (Vx), l'anthéroxanthine (Ax), la zéaxanthine (Zx). Chez d'autres phylums, on retrouve, à la place ou également, l'astaxanthine, la siphonoxanthine, la lutéine, etc.

La biosynthèse précise de certains xanthophylles comme la Ddx et surtout la Fx, reste actuellement partiellement inconnue chez les diatomées et les haptophytes [138]. Les connaissances actuelles sur la biosynthèse de la Fx sont décrites dans la section 3 de ce chapitre.

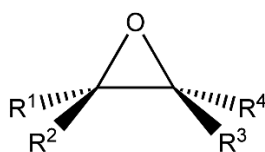


### 2.3.2. Les cycles des xanthophylles

Dans la littérature, les « cycles des xanthophylles » se réfèrent à deux cycles de pigments considérés comme photoprotecteurs chez la plupart des algues eucaryotes et des plantes supérieures [8,146] :

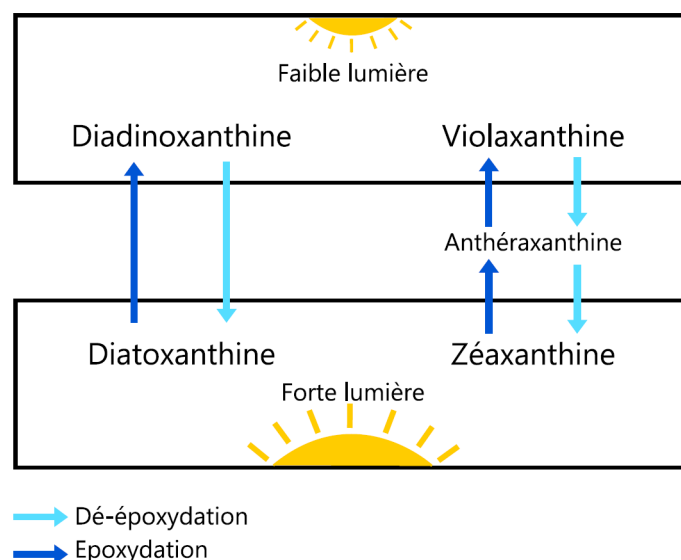
- Le cycle Ddx-Dtx est spécifique des microalgues diatomées et haptophytes [94].
- Le cycle Vx-Zx avec le pigment intermédiaire Ax, est spécifique des plantes supérieures et peut également être retrouvé chez les diatomées et haptophytes.

Ces pigments dérivés des carotènes ont deux rôles essentiels dans le photosystème. En tant que pigments photosynthétiques secondaires, la Vx et la Ddx peuvent capturer la lumière en transférant aux chlorophylles l'énergie lumineuse qu'ils absorbent. En revanche, lorsque la lumière est en excès, la Zx et la Dtx assurent à l'inverse un rôle photoprotecteur en dissipant l'excitation excessive des chlorophylles [147,148]. C'est un des mécanismes du *non-photochemical quenching* (NPQ) décrit plus précisément dans la section suivante (2.4). Afin d'assurer l'équilibre entre la photosynthèse et la photoprotection, les pigments des cycles xanthophylles sont soumis à des réactions réversibles d'époxydation et de dé-époxydation. Ces réactions ont été découvertes en 1962 par Yamamoto et al. [149] et sont effectuées par des enzymes époxydases et dé-époxydases. Une époxydation est une oxydation introduisant un oxygène sur une liaison simple carbone-carbone (Figure 13). Une dé-époxydation rétablit la liaison simple carbone-carbone en retirant l'oxygène.



**Figure 13. Formule générale d'un époxyde**

Dans le cycle Vx-Zx, la Vx est un pigment photosynthétique secondaire qui va capturer la lumière. En cas d'excès de lumière, la Vx se dé-époxyde en Zx (Figure 14). L'Ax est un pigment intermédiaire et temporaire entre la Vx et la Zx, il est difficile de le quantifier car les réactions sont rapides. Dans le cycle Ddx-Dtx, la Ddx est le pigment photosynthétique secondaire et peut se dé-époxyder en Dtx qui est le pigment photoprotecteur (Figure 14) [150]. Les espèces de microalgues présentent généralement un des deux cycles mais certaines espèces possèdent les deux, avec un cycle majoritaire [89].



**Figure 14. Schéma des deux cycles des xanthophylles Ddx-Dtx et Vx-Zx : la diadinoxanthine se dé-époxyde en diatoxanthine et la violaxanthine se dé-époxyde en zéaxanthine avec le pigment intermédiaire anthéroxanthine.**

Les deux cycles xanthophylles sont dépendants des variations de pH dans le lumen du thylakoïde. Quand le pH diminue, la dé-époxydation de la Vx en Zx et/ou de la Ddx en Dtx est activée. Dans la littérature scientifique, ces réactions sont largement étudiées chez les plantes supérieures [151]. Elles le sont cependant moins chez les algues. On retrouve une étude détaillée des cycles xanthophylles chez une algue verte [152], et de nombreuses études chez les diatomées, qui peuvent parfois être considérées comme les microalgues représentant le mieux le cycle des xanthophylles et la stratégie du NPQ [153]. La similarité entre le cycle chez les plantes et celui chez les algues est d'ores-et-déjà prouvé [89,154–156].

#### 2.4. Le Non Photochemical Quenching (NPQ)

La croissance du phytoplancton dans la zone photique dépend à la fois de facteurs chimiques et de facteurs physiques [138,151]. Selon les conditions de luminosité et de courants de masses d'eau, le phytoplancton doit donc être capable de rapidement s'adapter aux changements d'irradiance [157,158].

En tant que producteur majeur de biomasse dans l'écosystème marin [159], le rôle écologique du phytoplancton est essentiel. Dans l'environnement, il existe des risques de photoinhibition dynamique ou chronique notamment par les UV-B [160,161], pouvant entraîner la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS), soit les radicaux libres d'oxygène [162]. Pour y faire face, les photoorganismes mettent en place des stratégies physiologiques consistant à trouver un

équilibre permanent entre la capture de la lumière et la protection contre l'excès de lumière [163]. Il existe les mécanismes de résistance comme la migration verticale dans la zone photique pour échapper aux radiations UV-B, la réparation de l'ADN endommagé, la réduction de la taille de l'antenne collectrice de photons [164]. Puis, il existe les mécanismes de dissipation de l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur et par l'extinction de la fluorescence des chlorophylles. Ces mécanismes seront particulièrement étudiés au cours de cette thèse et sont décrits dans cette section.

Lorsque les pigments photosynthétiques comme la Fx et les chlorophylles reçoivent un photon lumineux, ils passent d'un état dit fondamental à un état dit excité. Ces états d'excitations, instables, sont la première étape de la chaîne de transfert d'électrons. En cherchant à redevenir stable, c'est-à-dire à revenir à leur état fondamental, les pigments vont transférer les électrons issus de leur état d'excitation : on dit qu'ils transfèrent leur énergie d'activation. Chez les Chromistes, la Fx étant le premier pigment collecteur de photons [165], elle transfère son énergie d'activation à sa chlorophylle adjacente, une Chl *a*. Il n'a pas encore été montré que le transfert d'énergie de la fucoxanthine pouvait se faire vers la Chl *c* [127]. Soit il n'y a pas de transfert d'énergie vers la Chl *c*, soit ce transfert est trop rapide pour être détectable.

La Chl *a* passe à un état excité singulet ( $^1\text{Chl}a^*$ ), fluoresce, et cherche à revenir à son état fondamental de deux manières possibles (Figure 15). Soit cette énergie d'excitation est utilisée pour faire de la photochimie, c'est à dire pour la photosynthèse et la croissance, c'est le *photochemical quenching*, soit elle est dissipée sous forme de chaleur, c'est le *non photochemical quenching* (NPQ) [166]. Lorsque l'énergie absorbée par la cellule dépasse sa capacité à l'utiliser (photosynthèse ou croissance saturée) [167], elle est alors dissipée par les mécanismes du NPQ. Lorsque la photochimie et le NPQ sont saturés, l'état d'excitation singulet de la chlorophylle ( $^1\text{Chl}a^*$ ) passe alors à un état d'excitation triplet ( $^3\text{Chl}a^*$ ), qui va transférer cette énergie à une molécule basale de dioxygène ( $\text{O}_2$ ) et former un radical libre de dioxygène ( $^1\text{O}_2^*$ ), un ROS, dans les centres réactionnels PSI et PSII [168]. Ce radical est très réactif et donc dangereux pour la cellule.

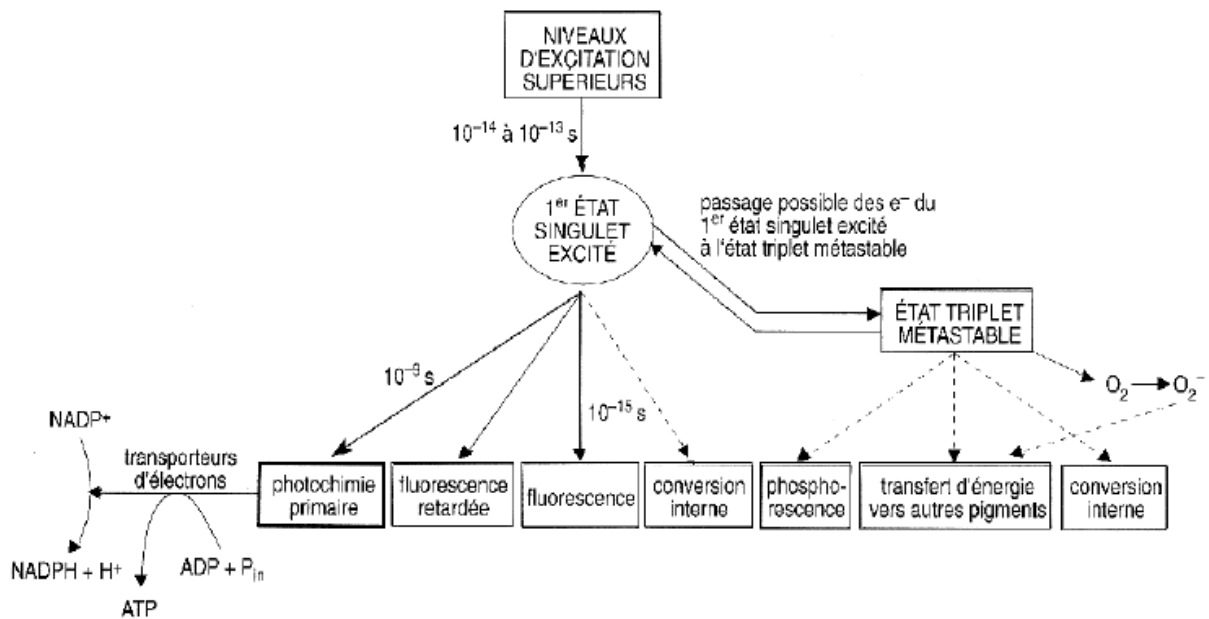


Figure 15. Schéma décrivant le passage des états excités à l'état fondamental de la Chl a [169]

Bien que ce ne soit pas le cas de tous les mécanismes du NPQ [166], le NPQ est souvent caractérisé par la dissipation de l'énergie lumineuse en excès sous forme de chaleur dans la littérature. Le mécanisme principal du NPQ est appelé qE pour *energy-dependent quenching*, et caractérise les changements conformationnels de l'antenne collectrice de lumière permettant d'ajouter la fonction de dissipation à la fonction d'absorption de l'énergie lumineuse. Chez les diatomées, le qE est contrôlé par (i) la mise en place d'un gradient de protons au niveau de la membrane des thylakoïdes ; (ii) le cycle des xanthophylles avec la conversion de la Ddx en Dtx, dépendant du gradient de protons ; (iii) les protéines Lhcx spécifiques à la FCP au sein de l'antenne collectrice de lumière [114,170–172].

### 3. La fucoxanthine

Cette section a été valorisée dans l'article « *Fucoxanthin from Algae to Human, an Extraordinary Bioresource: Insights and Advances in up and Downstream Processes.* », publié dans le journal *Marine Drugs* en mars 2022 [173]. La sous-section « 3.3 Biosynthèse chez les algues » a été complétée, après publication de l'article, par l'étude de Bai et al. parue en septembre 2022 [174].

### 3.1. Présentation de la molécule

La Fx est le caroténoïde majeur des écosystèmes marins, représentant 10 % de la production totale de caroténoïdes [175,176]. Ce pigment jaune-orangé produit par les algues Chromistes masque la couleur des chlorophylles et leur donne leur couleur brune caractéristique. Il a été démontré que la Fx est responsable de la capacité des diatomées à absorber les photons dans une large gamme spectrale le long de la colonne d'eau, notamment en profondeur où seule la lumière bleue est disponible [105]. La lumière rouge, absorbée par les chlorophylles, n'est en effet disponible que jusqu'à maximum 10 m mètres sous la surface. Par conséquent, parallèlement à l'absorption de lumière par les chlorophylles, la Fx augmente l'efficacité de l'utilisation de différentes longueurs d'onde lumineuses pour la fixation du carbone.

Sa structure moléculaire, entièrement décrite en 1990 [177] (Figure 16), contient une liaison allénique (un atome de carbone est relié à deux autres atomes de carbone par deux doubles liaisons). Cette particularité est probablement à l'origine de ses nombreuses propriétés anti-cancéreuses, anti-diabétiques, anti-obésité, des propriétés anti-inflammatoires, anti-angiogéniques, antipaludiques et de plusieurs effets protecteurs [178–183]. La Fx est donc hautement valorisable pour l'industrie alimentaire où elle est considérée comme un nutraceutique, et l'industrie de la santé. La demande mondiale en Fx a par ailleurs considérablement augmenté ces dernières années.

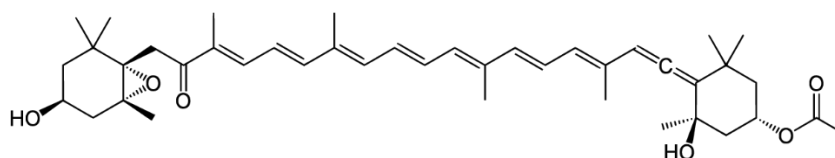


Figure 16. Structure chimique de la molécule de fucoxanthine.

Comme les autres caroténoïdes, la Fx est hautement insaturée, sa structure moléculaire est donc instable et très réactive. La molécule de Fx est sensible à l'oxydation, provoquée soit par l'oxygène, soit par d'autres molécules pro-oxydantes voisines. Parfois, le phénomène d'oxydation est renforcé par l'isomérisation de la molécule [184], par l'élévation de la température ou de l'intensité de la lumière [185–187]. La Fx possède quatre isomères, la Fx *all-trans*, qui est l'isomère majeur dans l'environnement naturel, la Fx *9'-cis*, la Fx *13-cis* et la Fx

13'-*cis* (Figure 17). Comme cela a été prouvé pour le  $\beta$ -carotène [188], les propriétés anti-oxydantes des isomères *cis* et *trans* de la Fx sont différentes. En augmentant la température, la Fx *all-trans* se transforme en isomère *cis* et perd 21 % de son potentiel anti-oxydant (mesuré avec le test DDPH) [189]. Ce résultat a été contrebalancé par une étude ultérieure montrant que la différence entre le potentiel anti-oxydant des quatre isomères de la Fx n'était pas significative [190]. Au contraire, il a été démontré que les formes *cis* de Fx chez la macroalgue *Undaria pinnatifida* avaient de meilleurs effets anti-prolifératifs contre les cellules cancéreuses HL-60, contre les cellules leucémiques et les cellules Caco-2 (cancer du côlon) [191]. Cependant, les formes *cis* étant plus encombrées stériquement, leur biodisponibilité dans le corps humain est plus faible que les formes *trans*.

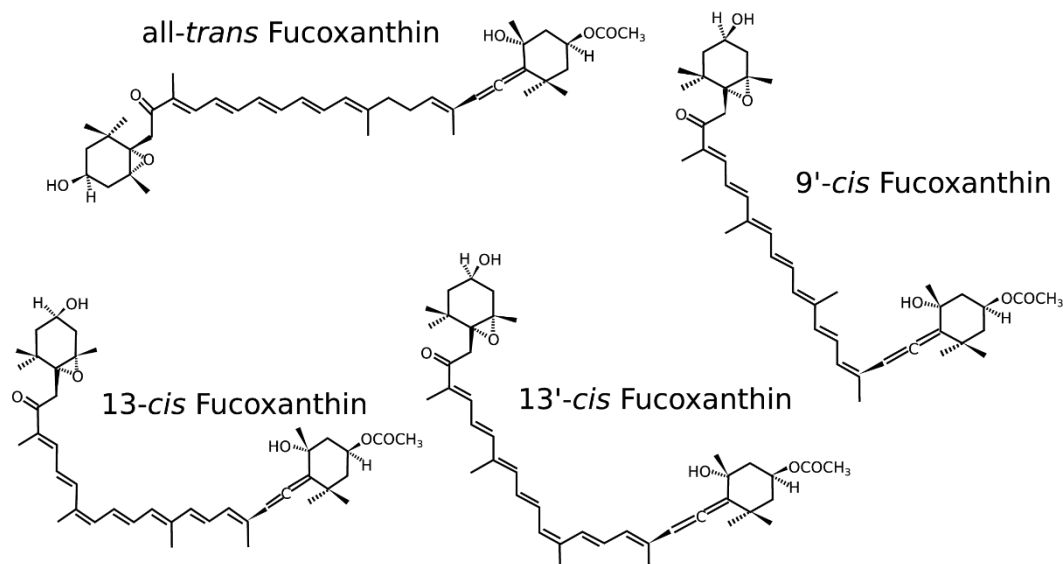


Figure 17. Quatre isomères de la fucoxanthine, all-trans fucoxanthin, 9'-cis fucoxanthin, 13-cis fucoxanthin, 13'-cis fucoxanthin.

## 3.2. Fonction biologique

### 3.2.1. Chez les algues

Comme expliqué précédemment, La Fx se situe dans l'antenne collectrice de lumière du thylakoïde [165], se fixe à la FCP [192,193], et absorbe la lumière bleue-verte entre 390 et 580nm [165]. C'est un pigment photosynthétique qui, avec les chlorophylles, capture les photons incidents [192,194].

Les molécules de Fx ont été classées pour la première fois en 2009 en trois catégories, selon leurs capacités d'absorption de photons, avec l'étude de la diatomée *Cyclotella meneghiniana*, [165]. Les « Fx-bleues » sont des molécules de Fx absorbant les photons dits à haute énergie, soit strictement dans la gamme bleue du spectre de la lumière visible ( $\lambda_{\max} = 463$  nm). Les « Fx-vertes » sont des molécules de Fx absorbant des photons dits à énergie intermédiaire, soit dans une gamme plus large de la lumière bleu-verte ( $\lambda_{\max} = 492$  nm). Enfin, les « Fx-rouges » sont des molécules de Fx absorbant des photons dits à faible énergie soit dans une gamme de lumière bleu-verte encore plus large et décalée vers le rouge ( $\lambda_{\max} = 500-550$  nm). Ce décalage particulier de l'absorption de la lumière, conditionné par les conditions de croissance des algues, explique la capacité de la Fx à capturer des photons sur un large spectre lumineux [105]. Bien que ces trois types de molécules de Fx aient exactement la même structure moléculaire (il n'y a qu'une seule molécule de Fx), leur niveau énergétique et leur capacité d'absorption sont intrinsèquement liés à leur site de liaison sur la FCP. Cela a été démontré par cristallographie chez la diatomée *P. tricornutum*, qui possède sept molécules de Fx toutes positionnées différemment lorsqu'elles sont fixées sur la FCP [105]. Parmi celles-ci, deux sont qualifiées de Fx-bleues, deux de Fx-vertes et trois de Fx-rouges [127,165,195–197].

Le transfert d'énergie des molécules de Fx vers la Chl *a* a été particulièrement étudié [165]. Comme la péridinine, un caroténoïde spécifique de certaines microalgues dinoflagellés [198], la voie la plus efficace pour le transfert d'énergie lumineuse de la Fx vers la Chl *a* commence par l'état excité S1/ICT de la molécule de Fx [196]. Cet état est un couplage du singulet de Fx (état excité appelé S1) et du phénomène de transfert de charge intramoléculaire (ICT). Par rapport à leur configuration spatiale sur la FCP, les Fx-rouges sont des molécules de faible énergie et donc les plus disposées à atteindre l'état excité S1/ICT [165]. Cela donne aux Fx-rouges la capacité d'être particulièrement efficaces dans le transfert de l'énergie lumineuse incidente, par rapport aux Fx-bleues et aux Fx-vertes. Ainsi, les Fx-rouges sont capables de capturer des photons à des intensités lumineuses plus élevées, empêchant alors que l'énergie lumineuse soit en excès dans la cellule, ce qui pourrait générer des ROS nocifs.

La Fx peut donc être considérée, en quelque sorte, comme un pigment photoprotecteur bien que ce ne soit pas sa fonction principale contrairement à la Dtx. Plus précisément, il a été montré que certaines molécules de Fx étaient impliquées dans l'extinction de la fluorescence du triplet de la Chl *a*,  $^3\text{Chl}a^*$  [199]. Ces molécules sont les Fx-rouges, qui transfèrent

efficacement l'énergie de leur état singulet S1/ICT au  $^3\text{Chla}^*$ . Des mesures d'extinction de la  $^3\text{Chla}^*$  ont prouvé que la Fx jouait définitivement un rôle dans la photoprotection. Pour corroborer ce résultat, une autre étude sur la diatomée *Chaetoceros gracilis* a supposé que la capture des photons représentait environ 60 % de l'activité de la FCP tandis que l'extinction de la Chl *a* en représentait environ 30 %, en condition de faible luminosité [125]. La condition de faible luminosité éliminait la possibilité que cette extinction de fluorescence soit due au cycle photoprotecteur Ddx-Dtx, activé uniquement dans des conditions de forte luminosité [200]. De plus, aucune trace de Dtx n'a été trouvée dans les cellules [125]. Ce résultat a soutenu la possibilité d'un autre type d'extinction, par la Fx qui était auparavant uniquement considérée comme un pigment photosynthétique. Ce rôle photoprotecteur de la Fx pourrait être complémentaire au cycle Ddx-Dtx, qui n'est pas continuellement activé dans les thylakoïdes. Enfin, une étude cristallographique a confirmé la présence de plusieurs molécules de Fx distinctement positionnées (c'est-à-dire distinctement fixées) sur la FCP, chacune étant très proche d'au moins une Chl *a*, justifiant le transfert d'énergie rapide entre ces deux pigments [105].

### 3.2.2. Chez l'humain

De nombreuses revues de la littérature scientifique ont décrit les propriétés de la Fx dans le domaine de la santé humaine [80,178,201–204] et des cosmétiques [179,205,206]. Le Tableau 1 présente les récentes études des propriétés fonctionnelles de la Fx entre 2020 et 2021. Les études sur l'inhibition de différents cancers font partie des principales recherches sur la Fx, ce sont les études avec le plus d'occurrences dans la littérature [207]. Cependant, Terasaki et al. ont montré que le fucoxanthinol, connu pour être le véritable métabolite actif de la Fx [208], accélérât la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques humaines en régulant à la hausse l'expression de gènes clés [209]. Ces résultats sont à l'opposé de ce que la même équipe de recherche avait précédemment étudié dans des cellules cancéreuses pancréatiques de souris et de hamster, c'est à dire que le fucoxanthinol induisait l'apoptose dans les cellules cancéreuses [210,211].

Une autre activité biologique de la Fx repose sur ses effets anti-inflammatoires sur les cellules épithéliales, les macrophages, les adipocytes, les cellules hépatiques, les cellules pulmonaires, les fibroblastes, etc. Une étude a montré qu'un extrait méthanolique de *Tisochrysis lutea*, contenant de la Fx, avait un effet anti-inflammatoire plus élevé qu'un extrait pur de Fx avec la



même concentration de pigment [212]. En effet, *T. lutea*, comme *Isochrysis galbana* qui est une souche proche, possède plusieurs autres composés phénoliques qui peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires [213]. D'autre part, certaines études ont démontré que la Fx pouvait avoir des effets toxiques sur les cellules humaines. Il a été démontré que la Fx réduisait la viabilité des cellules PC-12 (cellules neuronales) si elle était présente en concentration supérieure à 5 µM. Également, la Fx réduirait de 40 % la viabilité des lymphocytes humains en 24 heures à une concentration de 10 µM et serait toxique pour les kératinocytes à une concentration de 40 µM en 16 heures [214–216].

**Tableau 1. Activités biologiques de la fucoxanthine - études de 2020-2021. La notation "p" signifie que la fucoxanthine a été achetée et non directement purifiée à partir de biomasse d'algues.**

Propriété	Source de fucoxanthine	Cellules/maladies ciblées	Référence
Anti-cancéreuse	p	Cellules cancéreuses pancréatiques de souris	[210]
	p	Cellules cancéreuses pancréatiques de hamster	[211]
	p	Cellules cancéreuses colorectales de souris	[217,218]
	p	Cellules cancéreuses colorectales humaines	[219,220]
	p	Cellules cancéreuses squameuses orales (KB)	[221]
	p	Cellules de glioblastome humain (U87MG)	[222]
	<i>Laminaria japonica</i>	Cellules cancéreuses pulmonaires humaines	[223]
	p	Cellules cancéreuses pulmonaires et cervicales humaines	[224]
Anti-inflammatoire	p	Cellules épithéliales trachéales de souris	[226]
	p	Stéatose hépatique non alcoolique	[227,228]
	<i>Sargassum fusiformis</i>	Inflammation induite par les matières particulaires	[229]
	<i>Tisochrysis lutea</i> , brown seaweeds	Macrophages RAW264.7 stimulés par les lipopolysaccharides (LPS)	[212,230,231]
	p	Réponse neuro-inflammatoire dans la maladie de Parkinson	[232]
	p	Inflammation aiguë des lésions pulmonaires	[233]
	<i>Cylindrotheca closterium</i>	Immunocytes, entérocytes, cellules souches mésenchymateuses	[234]

	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cytokines pro-inflammatoires	[235]
	p	Inflammation de l'uvéite induite par les lipopolysaccharides PAMP	[236]
Anti-obésité	p	Résistance à l'insuline des souris obèses	[237]
	<i>Sargassum siliquosum</i>	Obésité induite par l'alimentation chez le rat	[238]
	p	Microbiote intestinal chez des souris nourries avec un régime riche en graisses	[239]
	<i>Plocamium telfairiae</i>	Souris nourries avec un régime riche en graisses	[240]
Anti-diabète	<i>Sargassum angustifolium</i>	Souris avec diabète de type 2 induit par la streptozotocine-nicotinamide	[241]
Effets protecteurs	p	Atrophie des myotubes induite par la dexaméthasone	[242]
	p	Troubles neurodégénératifs	[243]
	p	Neurotoxicité induite par la 6-hydroxydopamine	[244]
	<i>Sargassum honeri</i>	Neurotoxicité induite par la méthamphétamine	[245]
	p	Stress oxydatif élevé induit par le glucose	[246]
	p	Souris irradiées	[247]
	p	Calcification des cellules interstitielles des valves cardiaques	[248]
	p	Dégénérescence maculaire et sénescence des cellules épithéliales pigmentaires rétinienne	[249]
	p	Symptômes de la dermatite atopique	[250]
	p	Sénescence cellulaire des fibroblastes	[251]
	p	Lésion d'ischémie-reperfusion dans le rein	[252]
	p	Cellules rétinienne de Müller induites par irradiation UV-B	[253]
Anti-oxydant		Revue de méta-analyse sur 20 ans	[254]
Anti-microbien	<i>Thalassiosira</i> sp., <i>Chaetoceroes</i> sp.	Bactéries pathogènes ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> )	[255]
	p	20 espèces bactériennes ( <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ...)	[256]
	p	Revue	[257]
Anti-Alzheimer	<i>Sargassum horneri</i>	Neurotoxicité induite par les oligomères A $\beta$	[258]

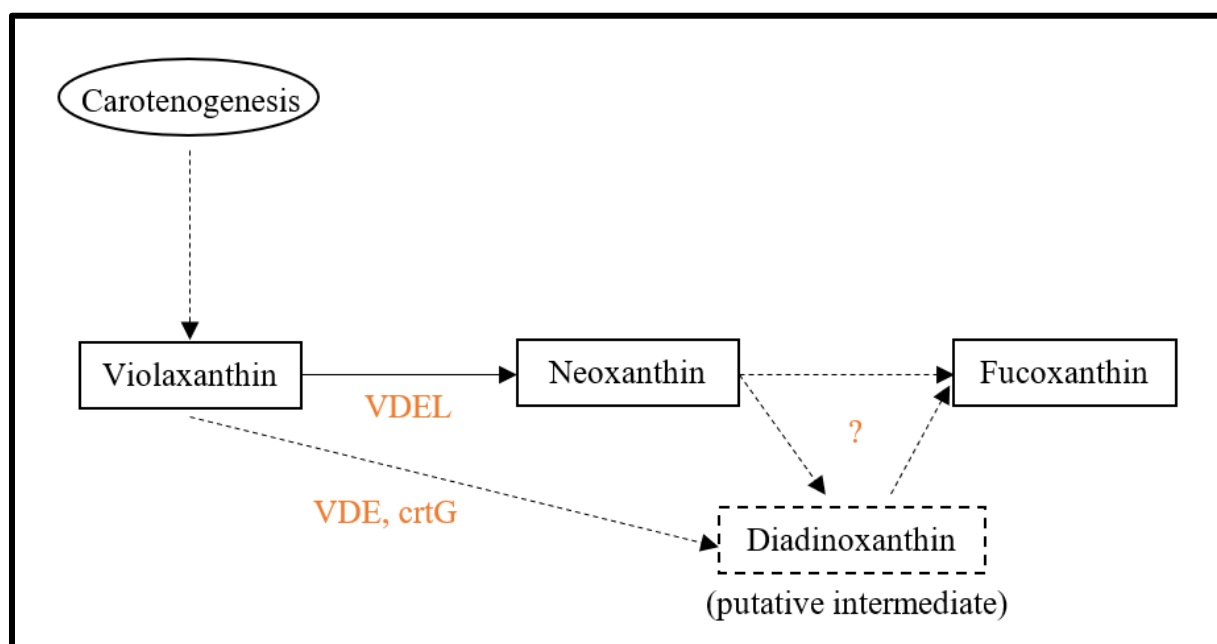
Anti-osteoclastogénèse	p	MAP kinase, signal Nrf2	[259]
Anti-urolithiatique	p	Calcul rénal induit par l'éthylène glycol chez le rat	[260]
Anti-fibrogénique	p	Cellules étoilées du foie	[261]

### 3.3. Biosynthèse chez les algues

Comme évoqué précédemment, les voies de la caroténogénèse ne sont actuellement pas entièrement caractérisées chez les algues. Certaines ont été identifiées par rapport à leur similitude avec celles des plantes terrestres et par rapport à la structure chimique des caroténoïdes [5]. Jusqu'en septembre 2022, la biosynthèse précise de la Fx était relativement inconnue (Figure 18). Des études avaient relié la Violaxanthine De-Epoxidase (VDE) à la régulation de la production de Fx. Kwon et al. avaient montré une corrélation entre la synthèse plus élevée de Fx et une augmentation de l'expression du gène de la VDE et du gène ISPD chez *P. tricornutum* [262]. Ces deux gènes seraient des gènes critiques pour la régulation de la biosynthèse de la Fx chez *P. tricornutum* d'après leurs résultats. Le gène de la VDE est susceptible de faire partie de la régulation en amont de la Fx, car il est connu pour jouer un rôle dans la dé-époxydation de la Vx en Ax puis en Zx [5]. De plus, une enzyme participant à la biosynthèse de la Fx avait été caractérisée par Gaidarenko et al. chez la diatomée *Thalassiosira pseudonana*, codée par le gène violaxanthine de-epoxydase like (VDEL) [263]. Lorsque le gène était régulé positivement, la teneur en Fx augmentait et les pigments du cycle de photoprotection tels que la Ddx et la Dtx diminuaient. Selon cette étude, et parce que le gène VDEL est présent chez cinq autres espèces de diatomées (*Thalassiosira oceanica*, *Cyclotella cryptica*, *P. tricornutum*, *Fragilariopsis cylindrus*, *Pseudo-nitzschia multi-series*), sa fonction supposée pourrait être similaire chez les diatomées de manière générale.

Sur la base de l'hypothèse de Lohr et Wilhem en 2001, arguant que la Vx était un précurseur de la Ddx, de Dtx et de la Fx [90], il est probable que l'enzyme VDEL n'influence pas seulement la teneur en Vx mais aussi la teneur en Ddx, Dtx et Fx, renforçant les résultats et l'hypothèse de Gaidarenko et al. De plus, une autre équipe de recherche avait confirmé que l'enzyme VDEL était responsable de la réaction centrale de conversion de la Vx en néoxanthine (Nx) chez les algues Chromistes [264]. L'équipe avait également supposé que la Ddx était un intermédiaire entre la Nx et la Fx, contrairement à une autre étude supposant que la Fx était synthétisée

directement à partir de Nx [204]. Dans ce dernier cas cependant, aucune enzyme n'a été identifiée à ce jour. L'enzyme VDEL pourrait, dans les deux hypothèses, réguler indirectement la production de Fx (Figure 18). Cependant, chez *T. lutea*, l'une des espèces les plus intéressantes pour la production de Fx, aucune trace de Nx n'a été observée jusqu'à présent [79,265]. Cela suggère deux possibilités, soit que la Nx représente un intermédiaire temporaire dans la voie de biosynthèse, dont la transformation est si rapide qu'on ne peut réussir à en détecter la moindre, soit que la Nx ne peut être considérée comme un précurseur de la Fx chez toutes les espèces du groupe des Chromistes.



**Figure 18. Voie de biosynthèse hypothétique de la fucoxanthine. Orange : gènes impliqués dans la biosynthèse.**

Les travaux de Bai et al. publiés en septembre 2022 révolutionnent cependant notre connaissance de la voie de biosynthèse de la Fx, révélant que le métabolisme de la diadinoxanthine est le carrefour central de la régulation qui relie le cycle photoprotecteur Ddx-Dtx à la synthèse de Fx chez *P. tricornutum* [174]. Ils montrent que la Ddx est un précurseur majeur de la Fx, l'enzyme VDL2 de *P. tricornutum* permettant la synthèse d'allénoxanthine (nom trivial et original proposé dans l'étude) à partir de Ddx (Figure 19). Ensuite, l'allénoxanthine est acétylée (par une enzyme encore inconnue), il en résulte la formation d'haptoxanthine (Figure 19). L'haptoxanthine est ensuite époxydée par l'enzyme ZEP1 (zéaxanthine-époxydase) en phanéroxanthine (nom trivial et original proposé dans l'étude), (Figure 19). Enfin, Bai et al.

proposent deux étapes finales hypothétiques conduisant à la synthèse de Fx, qui resteront à démontrer cependant.

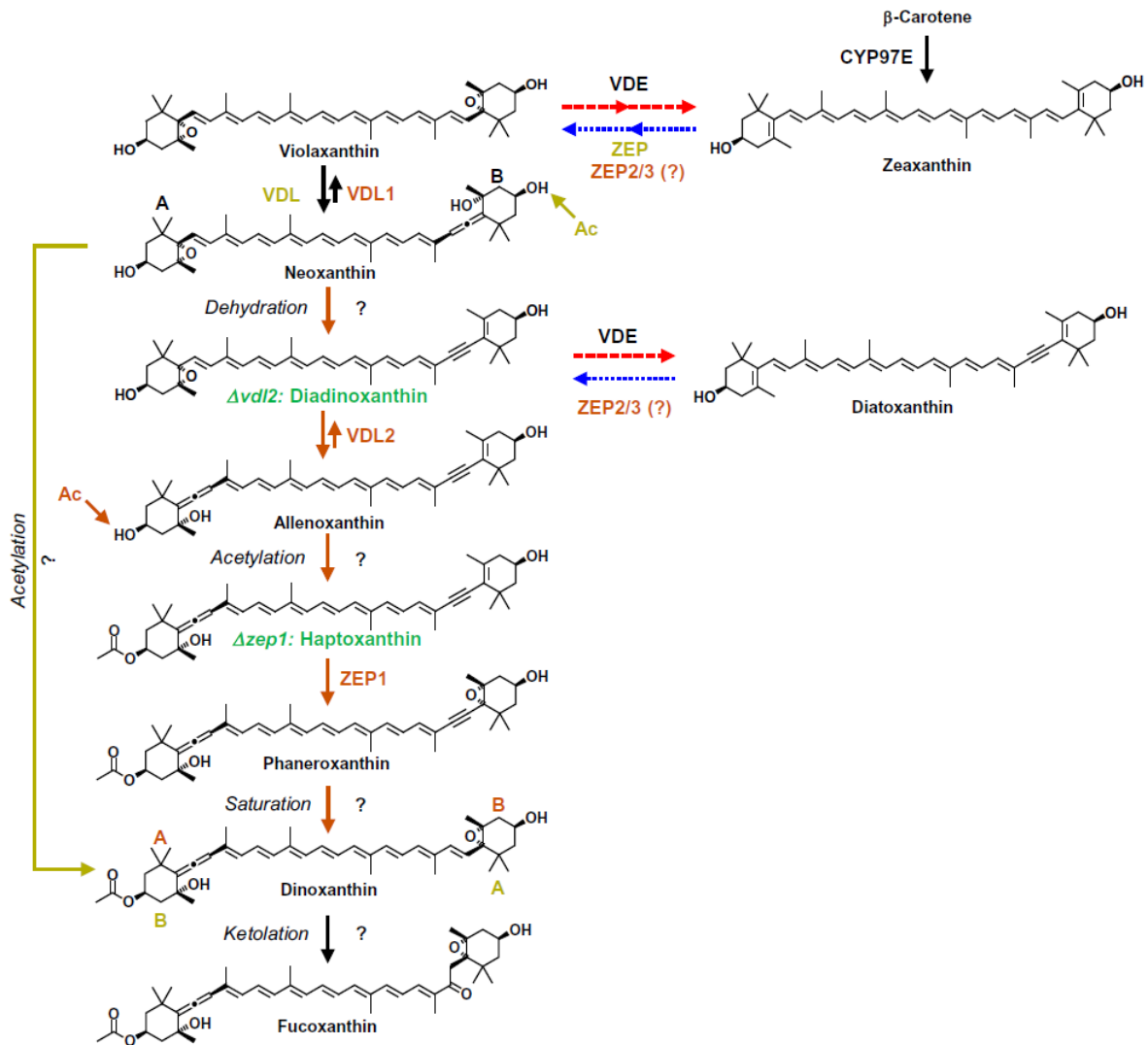


Figure 19. Proposition de la voie de biosynthèse de la fucoxanthine chez les algues. Les enzymes spécifiques des algues contenant de la diadinoxanthine sont indiquées en marron, tandis que les enzymes spécifiques des algues contenant de la violaxanthine sont indiquées en kaki. « ? » indique les étapes pour lesquelles aucune enzyme n'a été identifiée jusqu'ici. Les intermédiaires écrits en vert s'accumulent dans les mutants de *Phaeodactylum tricornutum* dépourvus de l'enzyme VDL2 ou ZEP1. Les flèches rouges en pointillés indiquent une activité enzymatique catalysée par la lumière tandis que les flèches bleues en pointillés indiquent les réactions inverses catalysées en faible lumière. [174]

Une autre étude a également mis en évidence le rôle de la voie de biosynthèse du MEP (voie du méthylérythritol phosphate) dans l'accumulation de Fx chez *P. tricornutum* [266]. Une équipe de recherche a montré que les gènes CMK et CMS, impliqués dans la voie de biosynthèse MEP, augmentaient la teneur en Fx chez *P. tricornutum*. Ces gènes permettraient

en effet d'augmenter l'efficacité photosynthétique des cellules et de rediriger les précurseurs métaboliques de la voie lipogénique vers la biosynthèse de Fx [266]. Ainsi, la voie MEP ne serait pas directement impliquée dans la biosynthèse de la Fx mais elle permettrait une plus grande accumulation de ce pigment chez *P. tricornutum*.

### **3.4. Biodisponibilité chez l'humain**

Il y a deux décennies, le devenir des produits de dégradation des caroténoïdes dans le corps humain était encore inconnu [267]. Puis, les effets bénéfiques de certains métabolites de caroténoïdes ont été démontrés, ce qui a motivé les recherches sur ce sujet. C'est par exemple le cas de la Fx, qui est ingérée principalement lors de la consommation alimentaire de macroalgues telles que les algues brunes du genre *Undaria* et *Laminaria* au Japon. Les chercheurs ont compris que l'intérêt de la Fx résidait avant tout dans sa biodisponibilité (c'est à dire la mesure du taux et de la vitesse d'absorption de la Fx par les cellules) et dans sa métabolisation. Chez les mammifères, la Fx est d'abord métabolisée en fucoxanthinol, puis en amarouciaxanthine A [268].

Plus précisément, une fois ingérée, la Fx est hydrolysée en fucoxanthinol dans le tractus intestinal. Ensuite, le fucoxanthinol est absorbé par les cellules intestinales et transporté vers les vaisseaux sanguins. Chez les mammifères, la biodisponibilité de la Fx repose donc en grande partie sur celle du fucoxanthinol [208]. Une étude a découvert que dans certaines cellules hépatiques murines, le fucoxanthinol était ensuite métabolisé en une autre molécule, l'amarouciaxanthine A. Cette observation ensuite été montrée à plus grande échelle, prouvant par ailleurs que le fucoxanthinol et l'amarouciaxanthine A étaient détectés dans de nombreux tissus (plasma, érythrocytes, foie, reins, cœur, rate pour le fucoxanthinol et tissu adipeux pour l'amarouciaxanthine A). En parallèle, la Fx n'a été observée qu'à l'état de traces, signifiant simplement qu'une infime partie n'avait pas été métabolisée [269,270].

### **3.5. La production de fucoxanthine par les algues**

#### **3.5.1. Les meilleures espèces productrices**

De nombreuses espèces d'algues sont connues pour leur teneur en Fx, et notamment les macroalgues brunes qui représentent la production commerciale actuelle [271]. Les macroalgues produisent de la Fx en quantité variable selon les espèces et selon leur

métabolisme. La teneur peut varier de 0,02 à 4,96 mg.g<sup>-1</sup> dans des échantillons frais (c'est à dire non lyophilisés) de différentes espèces d'algues (le maximum ayant été atteint pour l'espèce *Undaria pinnatifida*) et de 0,01 à 2,08 mg.g<sup>-1</sup> dans des échantillons secs (lyophilisés) [80]. La concentration en Fx chez les macroalgues est donc relativement faible et insuffisante pour répondre à la demande mondiale de ce composé nutraceutique actuellement très recherché. Les microalgues, d'autre part, se révèlent être une excellente source de Fx car leur teneur en Fx est élevée et leur culture facilitée par leur croissance rapide. Les diatomées et les haptophytes sont actuellement les microalgues les plus prometteuses pour la production commerciale de Fx [271]. Par exemple, la teneur en Fx peut atteindre 59,2 mg.g<sup>-1</sup> dans des échantillons secs de la diatomée *P. tricornutum* [57] et 79,40 mg.g<sup>-1</sup> dans des échantillons secs de l'haptophyte *T. lutea* [272] provenant d'une culture discontinue et dans des conditions optimales de production. Les diatomées accumulent de grandes quantités de Fx et ont déjà été largement étudiées et exploitées pour sa production. *P. tricornutum* et *Odontella aurita*, ainsi que l'haptophyte *T. lutea*, ont ainsi été identifiées comme les meilleures productrices de Fx d'après la littérature [80]. Le Tableau 2 répertorie les études entre 2020 et 2022 relatives à la production de Fx chez différentes espèces de microalgues.

**Tableau 2. Contenu et productivité en Fx par différentes espèces de microalgues à partir d'échantillons secs ou frais - études de 2020-2022. La notation "-" signifie que les données n'étaient pas disponibles.**

Espèce		Contenu en Fx (mg.g <sup>-1</sup> en poids sec)	Productivité en Fx (mg.L <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup> )	Condition	Référence
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	16.05	13.75	Sec	[273]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	6.66	1.82	Sec	[274]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	10.01	9.81	Sec	[275]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	13.09	-	Sec	[276]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	16.30	2.77	Sec	[277]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	17.80	1.14	Sec	[278]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	79.40	-	Sec	[272]
<i>T Isochrysis lutea</i>	Haptophyte	5.40	-	Sec	[279]
<i>Pavlova lutheri</i>	Haptophyte	20.86	4.88	Sec	[280]
<i>Isochrysis zhangjiangensis</i>	Haptophyte	22.6	3.06	Sec	[281]

<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	13.30	1.41	Sec	[278]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	7.00	-	Sec	[279]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	13.00	8.22	Sec	[282]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	16.30	-	Sec	[283]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	17.55	-	Sec	[284]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	16.13	-	Sec	[285]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	21.90	-	Frais	[286]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomée	21.20	-	Sec	[287]
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Diatomée	17.51	-	Sec	[288]
<i>Stauroneis sp.</i>	Diatomée	11.80	-	Sec	[289]
<i>Stauroneis sp.</i>	Diatomée	5.90	-	Sec	[290]
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Diatomée	9.00	5.10	Sec	[291]
<i>Odontella aurita</i>	Diatomée	16.20	9.41	Sec	[292]
<i>Amphora capitellata</i>	Diatomée	41.83	-	Sec	[293]
<i>Nitzschia laevis</i>	Diatomée	12.20	-	Sec	[294]
<i>Conticribra weissflogii</i>	Diatomée	10.00	-	Frais	[295]
<i>Sellaphora minima</i>	Diatomée	7.60	1.2	Frais	[296]
<i>Nitzschia paela</i>	Diatomée	5.70	0.60	Frais	[296]
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Diatomée	15.4	3.82	Frais	[297]

A l'échelle industrielle, l'objectif principal est d'optimiser les coûts de production constituant les dépenses les plus importantes, comme la main d'œuvre, l'énergie et les additifs chimiques [298]. Par exemple, le coût d'une culture de *P. tricornutum* par rapport à une culture de *Chaetoceros gracilis* pour une masse organique équivalente est quatre fois inférieur pour une production en éclosérie [299]. En général, les diatomées et les haptophytes représentent des espèces populaires car elles sont faciles à cultiver et peuvent atteindre une grande quantité de biomasse en peu de temps. La biomasse de *P. tricornutum* peut atteindre, par exemple, une productivité en biomasse de  $1500 \text{ mg.L}^{-1}\text{.jour}^{-1}$  en réacteur hélicoïdal [300], *T. weissflogii* peut atteindre  $538 \text{ mg.L}^{-1}\text{.jour}^{-1}$  en cuves de production [291], *T. lutea* peut atteindre  $940 \text{ mg.L}^{-1}\text{.jour}^{-1}$  [273] et  $350 \text{ mg.L}^{-1}\text{.jour}^{-1}$  [275] en PBR de 400mL. Même si la plupart des études portent sur des espèces de diatomées dans la littérature, la culture d'espèces haptophytes représente un



avantage certain dans les procédés d'extraction de la Fx. En effet, les diatomées possèdent un frustule de silice qui nécessite une étape supplémentaire dans le processus d'extraction car il faut pouvoir le fragmenter, alors que les haptophytes non coccolithophores, comme *T. lutea* et *P. lutheri*, n'en possèdent pas [301,302]. *T. lutea* est capable d'atteindre, entre 6 et 15 jours de culture seulement, une concentration élevée en biomasse ainsi qu'une concentration élevée en Fx [80,265]. Les conditions de culture permettant sa croissance sont relativement simples à mettre en place car elle peut croître dans une large gamme d'intensités lumineuses et de températures [303–305]. *T. lutea* est une espèce plus facile à cultiver que de nombreuses autres espèces de microalgues.

### 3.5.2. Les mesures de production et productivité

Dans les industries aquacoles, pharmaceutiques et nutraceutiques, les algues produisant de la Fx et d'autres caroténoïdes sont utilisées pour leurs propriétés anti-oxydantes. Dans certaines études ayant comme objectif une production continue de microalgues pour l'alimentation des naissains larvaires par exemple [306], il est courant de mesurer la productivité des pigments ( $\text{mg.L}^{-1}\text{.jour}^{-1}$ ). Cette mesure est également appelée taux de production ou productivité volumétrique. L'objectif est d'exprimer l'efficacité de la production en combinant deux facteurs principaux qui sont la teneur en pigment dans les cellules, et la croissance de la biomasse en termes de temps et de densité cellulaire.

Cependant, lorsque l'objectif est de mieux comprendre comment améliorer la teneur en Fx (ou tout autre molécule d'intérêt) dans les cellules, il est plus approprié de mesurer la production de Fx en  $\text{mg.g}^{-1}$  ou en  $\text{fg.cell}^{-1}$ . Le facteur de la quantité de biomasse est exclu. Cette mesure est également appelée concentration spécifique de Fx. En effet, même dans un objectif d'industrialisation à grande échelle, la première étape consistant à étudier la physiologie de l'espèce productrice de Fx est essentielle. La production de métabolites d'intérêt tels que les caroténoïdes peut en effet résulter d'un stress qui va impacter le métabolisme des cellules (nutriments, lumière, température, etc.) [266,289,303,307]. Certaines études expriment la production de pigment en  $\text{mg.L}^{-1}$ , également appelée concentration volumétrique. Cette mesure dépend de deux facteurs qui sont la teneur en pigment, et la biomasse en termes de densité cellulaire uniquement. Cette mesure n'est pas adaptée pour décrire la physiologie des cellules, car elle n'est pas normalisée par la densité cellulaire. Une production de Fx plus élevée en  $\text{mg.L}^{-1}$  n'implique pas nécessairement que les cellules produisent plus de Fx, cela pourrait

simplement être la conséquence d'une augmentation de la biomasse. Cette mesure peut être utilisée pour comparer la production de Fx dans plusieurs cultures en mode batch par exemple.

De nombreuses études rassemblent les informations en affichant à la fois des mesures de productivité et de production. Cette façon de présenter les résultats permet de considérer l'influence des conditions de culture simultanément sur le métabolisme cellulaire et la croissance des espèces étudiées (Tableau 2).

### **3.6. Les paramètres de culture pour une synthèse optimale de fucoxanthine**

#### **3.6.1. Les photobioréacteurs, la température, le pH et la salinité**

La culture de microalgues a traditionnellement débuté en systèmes ouverts tels que les *open tanks* et les *raceways* [33]. Les *open ponds* sont relativement simples à mettre en place et à utiliser, le coût de production de biomasse et par conséquent de fucoxanthine est peu élevé [308], comme cela a été montré pour *P. tricornutum* [309]. Cependant, le contrôle des cultures y est limité et les risques liés aux changements progressifs du milieu environnant tels que la contamination, l'augmentation de la salinité, le problème de transfert de masse et la perte de nutriments par évaporation, sont élevés [39]. Ces inconvénients ont soulevé l'intérêt pour les systèmes fermés, plus performants et mieux contrôlés, les PBRs (Figure 20). Les PBRs les plus utilisés pour la production de Fx sont les PBRs tubulaires, les *stirred tanks* et les PBRs plans. Ces derniers sont les plus plébiscités dans la littérature [278,310–312]. Ils présentent un rapport surface/volume élevé permettant une meilleure accessibilité de la lumière, ce qui réduit l'effet d'auto-ombrage lors de l'accumulation de biomasse. De plus, la faible accumulation d'oxygène dans ces PBRs empêche la croissance de microorganismes aérobies contaminants. La facilité de stérilisation des PBRs plans est également un avantage [313,314]. Une étude de Derwenkus et al. a analysé le coût d'une augmentation d'échelle de la co-production d'EPA (acide gras) et de Fx dans des PBRs plans. La rentabilité du processus dépendrait finalement principalement du prix de la Fx sur le marché et non du procédé de culture [283]. Pour la production de Fx, le mode de culture discontinu (mode batch) est régulièrement utilisé [57,282,313–316]. Pour optimiser la productivité de la Fx, il faut tenir compte à la fois de la production quotidienne de Fx et de la croissance des microalgues. Le mode de culture en continu est donc privilégié [275,282,283,308].

La température, en influençant la croissance des cellules donc la concentration en biomasse, influence également la productivité en Fx. Selon les espèces cultivées, la température optimale peut varier dans la gamme mésophile (pour *T. lutea*, la température optimale est de 30°C) [275,315,316]. Il a été démontré que le pH avait également une influence sur l'accumulation de Fx chez *P. tricornutum* [194]. Wu et al. ont démontré l'impact des flocculants, utilisés pour la récolte de la biomasse, sur la teneur en Fx des cellules [317]. L'utilisation de fortes doses de flocculants augmente le taux de récolte de la biomasse mais entraîne une réduction significative de la Fx en raison du faible pH et des effets néfastes associés aux ions métalliques tels que l'aluminium [24]. Les espèces les plus performantes actuellement pour la production de Fx sont des microalgues marines. Leur croissance dépend donc de la salinité du milieu, régulant le contrôle osmotique des métabolites. L'étude d'Ishika et al. a montré que *P. tricornutum* se développait bien et produisait plus de Fx à une salinité optimale de 45 ‰ tandis que les microalgues halophiles accumulaient plus de Fx jusqu'à 77 ‰ de salinité [308].

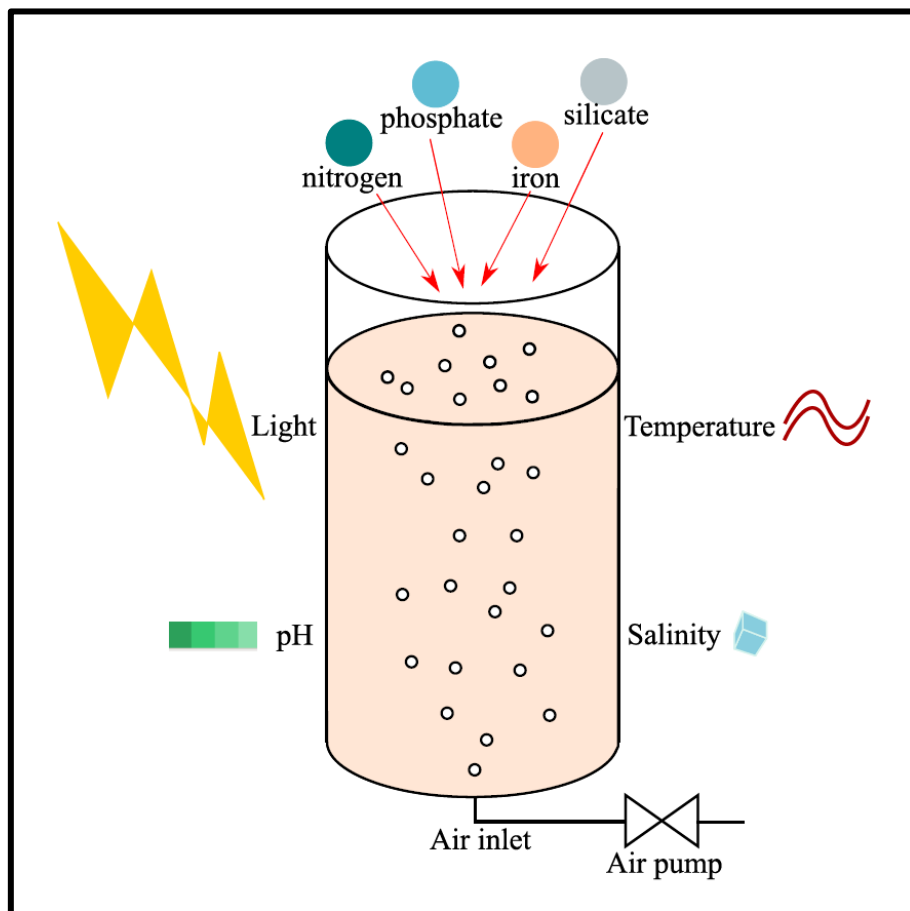


Figure 20. Schéma d'un photobioréacteur tubulaire et des principaux paramètres de culture à prendre en compte.

### 3.6.2. La lumière

L'un des paramètres les plus importants pour la synthèse de Fx est la lumière. Diverses études chez les algues Chromistes ont démontré l'influence de la longueur d'onde et de l'intensité de la lumière sur l'accumulation de Fx [12,23,27-31,33-34]. Certains travaux ont montré qu'une faible intensité lumineuse (moins de  $100 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) favorisait la production de Fx [80,156,275,281,318] tandis qu'une forte intensité lumineuse (à partir de  $150 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) activait plutôt les mécanismes de photoprotection, et notamment la synthèse de Dtx et Zx [102,156,164,172,200,319]. De plus, l'augmentation de la disponibilité des photons sature les photosystèmes, les cellules n'ont donc pas besoin de synthétiser plus de pigments photosynthétiques comme les chlorophylles et la Fx [167]. En effet, à forte luminosité, non seulement la Fx se dégrade [320] mais le rapport de la teneur en pigments photoprotecteurs et photosynthétiques change.

Cependant, la production de biomasse s'avère inversement proportionnelle à la production de Fx, car une faible intensité lumineuse ne favorise pas la croissance cellulaire [281]. Une amélioration de la productivité en Fx résulte donc d'un compromis entre une forte luminosité permettant une production importante de biomasse, et une faible luminosité qui augmente la production de Fx. Par exemple, dans des cultures de *T. lutea*, la productivité la plus élevée en Fx ( $9,81 \text{ mg.L}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) a été atteinte à  $300 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  tandis que la production la plus élevée en Fx ( $5,24 \text{ mg.g}^{-1}$ ) a été atteinte à  $150 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  [275]. Dans les cultures de *Isochrysis zhangjiangensis* (une haptophyte), la productivité la plus élevée en Fx ( $3,06 \text{ mg.L}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) a été atteinte à  $100 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  tandis que la production la plus élevée ( $22,6 \text{ mg.g}^{-1}$ ) a été atteinte à  $40 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  [281].

La Fx absorbe la lumière bleue-verte sur un large spectre. Chez les diatomées, il a été montré que la Fx s'accumulait particulièrement dans les cellules cultivées en lumière bleue tandis que la lumière rouge favoriserait la production d'autres pigments tels que la Ddx [282,316]. Chez la diatomée *Cylindrotheca closterium*, la lumière rouge et la lumière verte, sans lumière bleue, ont induit une diminution de la teneur en Fx dans les cellules [321]. Chez *T. lutea*, la teneur la plus élevée en Fx a été observée dans des cultures en lumière bleue-verte tandis que la productivité de Fx la plus élevée a été observée dans des cultures en lumière rouge-bleu-vert (qui est la plus proche de la lumière blanche) [277].

### 3.6.3. Les nutriments

Les nutriments jouent un rôle primordial dans la croissance des microalgues, ils sont nécessaires pour synthétiser les lipides, les macromolécules telles que les acides nucléiques et les protéines [322]. Le N, le P, le fer (Fe) et le silicium (Si) (pour certaines diatomées) ont été identifiés comme nutriments ayant un impact majeur sur la croissance cellulaire et sur l'accumulation de biomasse [194,296,313,316,317,323].

#### **L'azote**

Le N est vital pour les microalgues car il est incorporé dans des macromolécules telles que les protéines, les enzymes et les acides nucléiques, qui ont un rôle structural ou fonctionnel dans les cellules. Il peut être fourni à partir d'une source inorganique sous forme d'ammonium ou de nitrate [296,323,324]. Le nitrate est la principale forme de N qui s'accumule dans les cellules d'algues [43]. Il est ensuite converti en ammonium, plus facilement assimilable dans des grandes molécules par transamination dans les voies anaboliques [44]. Néanmoins, l'ammonium utilisé directement dans l'enrichissement du milieu de culture diminue le pH du milieu [325], ce qui peut nuire à la croissance des microalgues en raison des protéines et des enzymes sensibles au pH. De nombreuses études ont démontré la forte corrélation entre la concentration de nitrate et la production de biomasse, ce qui indique que le N est l'un des facteurs limitants de la production de biomasse [55,56,60,326–328]. Une teneur élevée en nitrate favorise la croissance des microalgues tandis qu'une faible concentration en nitrate la diminue. Le nitrate influe également sur la teneur en pigments car les porphyrines, le noyau des chlorophylles, contiennent du N [194,313]. L'étude menée par Gao et al. a montré la corrélation linéaire positive entre la Chl *a* et la Fx chez *T. lutea*, ce qui explique la dépendance indirecte de la Fx à la concentration en nitrate dans le milieu [276]. Des études ont montré une forte dépendance de la Fx à la concentration en nitrate chez diverses espèces de microalgues. Cependant, en mode de culture discontinue (batch), une concentration en nitrate plus élevée peut conduire à une augmentation de la concentration en biomasse plus élevée induisant ainsi l'auto-ombrage des cellules. Avec moins d'accès à la lumière incidente, l'accumulation des pigments photosynthétiques tels que la Fx est plus importante. Par conséquent, dans certaines études en mode de culture discontinu, une concentration plus élevée en Fx est corrélée à une biomasse plus élevée et non directement à une concentration plus élevée en nitrate [56,57,60,328,329].

D'après Xia et al., deux cultures en mode discontinu avec 6 mM et 18 mM de N ont donné la même concentration de biomasse après 12 jours de culture à faible luminosité. La teneur en Fx était cependant plus élevée dans la culture avec 18 mM de N [310]. Dans ce cas, on peut effectivement attribuer l'augmentation de la teneur en Fx à une concentration en N plus élevée. Quant à la production de Fx, en  $\text{mg.L}^{-1}$ , ou productivité de Fx, en  $\text{mg.L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ , elle est effectivement favorisée par un taux de nitrate élevé en raison de l'augmentation de la biomasse [57,272,315]. Xia et al. ont étudié l'effet de la concentration initiale de nitrate comme élément nutritif sur la teneur en Fx [59]. Une concentration initiale élevée de nitrate a stimulé l'accumulation de Fx dans les membranes chloroplastiques par rapport à une faible concentration initiale de nitrate. De plus, une concentration initiale élevée en nitrate couplée à un supplément de N a augmenté la teneur en Fx plus de quatre fois plus qu'une faible concentration initiale en nitrate [302]. En parallèle, il a été démontré qu'un supplément de N augmentait de deux à trois fois la teneur en Fx chez *P. tricornutum* [57]. Au contraire, une carence en N peut induire la dégradation des composés contenant de l'azote comme les protéines et les chlorophylles, et donc diminue les capacités photosynthétiques des cellules [58].

Ainsi, la composition des milieux d'enrichissement influence l'accumulation de Fx dans les microalgues [194,330]. Le milieu de Conway s'est avéré plus efficace que le milieu f/2 pour favoriser la production de Fx dans les travaux de Gómez-Loredo et al. [323]. Ce résultat est dû à une concentration plus élevée de nitrate dans le milieu de Conway, suffisante pour que les microalgues conservent une teneur élevée en Fx pendant toute la durée de la culture [57,323]. L'influence des nitrates sur la Fx peut également être considéré comme un effet synergique avec la lumière et la salinité [59]. La combinaison de la disponibilité de la lumière et de la concentration en nitrate peut augmenter la teneur en Fx chez *C. cryptica* tandis qu'une augmentation simultanée de nitrate et de la salinité améliore la teneur en Fx chez *T. lutea* [272].

### **Le phosphore**

Le P est essentiel pour les microalgues, il entre dans la composition des phospholipides, des acides nucléiques et de l'ATP [322]. Les travaux de Lu et al. et Sun et al. ont montré que le P n'avait pas une influence aussi importante sur la croissance de la biomasse et l'accumulation de Fx que le N [302,316]. Dans la littérature, très peu d'études ont par ailleurs démontré la

corrélation entre la teneur en P et la teneur en Fx contrairement à la corrélation avec le N [302,316].

### **La silice**

La paroi cellulaire des diatomées est composée de dioxyde de silicium ou silice, qui peut donc être un nutriment supplémentaire nécessaire à leur croissance. Par conséquent, la disponibilité de la silice dans le milieu de culture peut conditionner la morphologie des cellules de diatomées, ce qui peut avoir un impact sur la croissance cellulaire et éventuellement sur la teneur en Fx [294]. Il a d'ailleurs été montré qu'un niveau élevé de silice dans le milieu d'enrichissement favoriserait la croissance de la biomasse et l'accumulation de Fx chez les diatomées [294,295,331]. L'augmentation de la teneur en Fx serait due à la régulation positive du métabolisme associée à l'ajout de silice dans des cultures de diatomées [294]. L'étude de Mao et al a montré qu'une forte concentration de silice induirait l'accumulation de Fx mais qu'une faible concentration induirait une diminution de la synthèse de Fx [294]. Pour les expériences menées dans cette thèse, il n'a pas été nécessaire d'ajouter de la silice dans le milieu d'enrichissement car *T. lutea* est une microalgue haptophyte.

### **Le carbone**

La mixotrophie est la capacité des organismes à utiliser plusieurs sources de C soit par autotrophie (C inorganique) soit par hétérotrophie (C organique) [32,332]. Le fait de pouvoir exploiter différentes formes de C rend les microalgues plus indépendantes de la lumière. En photoautotrophie uniquement, la disponibilité en lumière peut en effet limiter la croissance de la culture, tandis qu'en mixotrophie les cellules sont tout de même capables, sans lumière, d'utiliser une source organique pour leur croissance. Comme pour le N, une biomasse plus élevée suite à l'ajout de C organique peut induire l'auto-ombrage des cellules et ainsi accroître la synthèse de pigments photosynthétiques tels que la Fx. Alkhamis et al. ont rapporté une augmentation de deux fois et demie de la teneur en Fx dans une culture mixotrophe de *T. lutea* (11,5 mg.g<sup>-1</sup> en masse sèche) par rapport à la culture photoautotrophe (4,8 mg.g<sup>-1</sup> en masse sèche) [303]. Dans une culture mixotrophe de la diatomée *Nitzschia laevis*, la teneur en Fx atteint 15,6 mg.g<sup>-1</sup> en masse sèche alors qu'en culture hétérotrophe elle atteint 10 mg.g<sup>-1</sup> DW [333]. Des cultures mixotrophes de *P. tricornutum* ont montré une forte accumulation de Fx dans les cellules [282]. L'ensemble de ces études ont prouvé que les cultures mixotrophes de

certaines microalgues pouvaient être une bonne approche à la fois pour l'accumulation de biomasse et de Fx. À l'échelle industrielle cependant, une limite de cette stratégie de production pourrait être le coût de la source de C organique utilisée (glycérol, amidon, hydrolysats) [8,296,297].

### **3.7. L'extraction et la purification de fucoxanthine**

#### **3.7.1. Le prétraitement aux ultrasons**

Parce que la Fx est attachée aux protéines et liée à d'autres pigments tels que les chlorophylles au sein de l'antenne collectrice de lumière, ancrée dans la membrane thylakoïdienne, son extraction peut être facilitée avec un prétraitement [336–338]. En particulier, il est nécessaire de fragmenter la paroi cellulaire épaisse en silice des diatomées. La dégradation des parois cellulaires et des membranes peut être réalisée soit par des méthodes mécaniques, chimiques, thermochimiques, biologiques ou électromagnétiques [339]. Les ultrasons (US) sont largement plébiscités dans la littérature, pour leur efficacité et leur facilité de mise en place (bain à US notamment). L'haptophyte modèle de ce travail de thèse, *T. lutea*, ne possède pas de paroi cellulaire en silice. Par conséquent, cette espèce est non seulement l'une des meilleures productrices, mais elle est également avantageuse pour l'extraction de Fx car elle ne nécessite pas de prétraitement spécifique. Un traitement aux US peut cependant être effectué pour renforcer l'étape d'extraction [79].

#### **3.7.2. Les solvants dits conventionnels et autres techniques**

La Fx est souvent extraite avec des méthodes dites conventionnelles utilisant des solvants organiques ou de l'eau et un temps de macération [336,340]. Comme la Fx contient de l'oxygène et d'autres groupes fonctionnels polaires, son extraction est effectuée avec des solvants de polarité moyenne tels que l'éthanol, l'acétone, etc. Bien que l'eau ait une constante diélectrique élevée, l'extraction à l'eau est peu efficace [340,341]. Guler et al. ont montré qu'un mélange de tétrahydrofurane (THF) et de dichlorométhane (DCM) était le meilleur système de solvants pour séparer la Fx de la membrane thylakoïdienne. Cependant, ces solvants présentent un risque élevé d'inflammabilité et d'explosion (formation de peroxyde en présence de air ou THF) [341]. Deux alcools sont souvent préférés pour l'extraction de la Fx, le méthanol, moins toxique que le THF et le DCM, et l'éthanol. Leur utilisation présente en effet moins de risques. De plus, les performances d'extraction de la Fx avec ces solvants se sont avérées supérieures à



celles des composés carbonylés tels que l'acétone (un tiers seulement du rendement par rapport à l'éthanol) et l'acétate d'éthyle (un sixième par rapport à l'éthanol) [183,310,337,340,341]. L'éthanol étant moins toxique et plus respectueux de l'environnement que le méthanol, il est relativement plébiscité dans la littérature. De plus, il a été démontré que l'éthanol est capable d'extraire efficacement la Fx à température modérée [183,340,342]. Bien que les solvants conventionnels se soient avérés efficaces pour extraire la Fx, le temps de macération peut être long et nécessitent souvent une importante quantité de solvant.

En plus des US cités précédemment [336,343], d'autres méthodes d'extraction peuvent être utilisées en complément d'une extraction par solvant afin d'en améliorer l'efficacité : l'utilisation de micro-ondes [339,343,344], de liquide sous pression [336,345,346], d'enzymes [347], l'homogénéisation à haute pression de l'extrait [348,349]. Ces techniques complémentaires permettent une extraction rapide et efficace permettant de ne pas dégrader les pigments. Les fluides sous-critiques et supercritiques sont également considérés pour l'extraction de Fx (et notamment le CO<sub>2</sub> supercritique), de nombreuses études ont d'ores-et-déjà démontré leur efficacité. De plus, ces méthodes sont relativement respectueuses de l'environnement en raison de la faible quantité de solvants organiques consommés, et de leur non-toxicité. Cependant, les fluides sous-critiques et supercritiques présentent une sélectivité plus faible entre les pigments et leur coût de fonctionnement reste élevé [337,340,341,350]. Les méthodes utilisant les électrotechnologies telles que le champ électrique pulsé [351,352], le champ électrique modéré [353], les décharges électriques à haute tension [354] et l'électroperméabilisation [355] ont également de bonnes performances d'extraction des composants intracellulaires. L'application d'un courant électrique et l'effet d'électroporation augmentent la perméabilité des cellules aux solvants et améliorent ainsi l'efficacité de l'extraction des pigments [356]. Jusqu'ici cependant, l'utilisation de ces méthodes pour l'extraction spécifique de Fx n'a pas encore été démontrée [340].

### 3.7.3. Les solvants biosourcés et écologiques

En raison de l'utilisation de solvants pétrochimiques et organiques toxiques pour l'extraction de Fx, des solvants biosourcés ont été proposés tels que les huiles alimentaires, les liquides ioniques et les mélanges eutectiques profonds naturels (*natural deep eutectic solvents, NADES*) [337].

### Les huiles alimentaires

Les huiles alimentaires en plus d'être d'ores-et-déjà commercialisées donc acceptées par le consommateur, sont non toxiques, biosourcées et sont considérées comme solvants relativement respectueux de l'environnement [337]. À notre connaissance, une seule étude a rapporté l'extraction efficace de la Fx à partir de *Sargassum horneri* (une macroalgue) à l'aide d'une huile comestible [357]. Le meilleur taux d'extraction a été obtenu avec les triacylglycérols à chaîne courte et moyenne (SCT et MCT). Le principal inconvénient de l'utilisation des huiles alimentaires étant leur viscosité élevée due à la chaîne carbonée, empêchant ainsi la diffusion des caroténoïdes dans l'huile, il est en effet préférable de sélectionner des huiles avec un nombre minimum de C telles que SCT et MCT (de C3 à C8) [357]. De plus, il a été démontré que le taux d'absorption et donc la biodisponibilité de la Fx étaient améliorés par l'ingestion parallèle de MCT à partir d'huile de poisson [358].

### Les liquides ioniques

Les liquides ioniques sont, depuis peu de temps, également envisagés pour une extraction plus écologique de la Fx. Ce sont des solutions de sel libérant des anions et/ou des cations qui interagissent avec les solutés, et dont le point de fusion est proche ou inférieur à la température ambiante. Jusqu'à présent, les liquides ioniques à base d'imidazolium, d'ammonium et de phosphonium sont les plus courants [359]. Outre le fait que ces solvants sont efficaces à relativement basse température, ils sont non volatils. Cependant, ils ne sont pas biosourcés et leur prix de revient est élevé, d'où la nécessité de les recycler par cristallisation par exemple. Le Tableau 3 présente des exemples d'extractions de caroténoïdes avec des liquides ioniques.

**Tableau 3. Exemple de l'utilisation de liquides ioniques pour l'extraction de caroténoïdes.**

Sel(s)	Caroténoïdes extraits	Référence
DACARB (diallylammonium diallylcarbamate)	Fucoxanthine	[288]
BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> (tetrafluoborate)	Astaxanthine	[360]
MS <sup>-</sup> (methylsulfate)	Astaxanthine	[360]
Ethanol + 1-n-butyl-3-methylimidazolium + Br <sup>-</sup>	Astaxanthine	[359]

### **Les *natural deep eutectic solvents* (NADES)**

Les NADES sont une autre alternative prometteuse aux solvants organiques volatils. Ils sont considérés comme respectueux de l'environnement car ils sont non toxiques, biodégradables et recyclables [361,362]. Les NADES sont composées de deux ou plusieurs composés naturels purs qui, ensemble, se comportent comme un composé unique. Ils ont déjà été utilisés pour l'extraction d'astaxanthine [363]. À notre connaissance, dans la littérature disponible, il n'existe qu'une seule étude suggérant l'utilisation de NADES pour l'extraction de Fx à partir d'une algue brune, *Fucus vesiculosus* [364], associée aux US (étape nécessaire avec l'utilisation d'une macroalgue). L'équipe de recherche a utilisé un NADES composé d'acide lactique et de chlorure de choline (taux molaire 3:1), et un autre composé d'acide lactique, de glucose et de H<sub>2</sub>O (taux molaire 5:1:3). L'activité antioxydante de la Fx a été mesurée et n'a pas été altérée par le processus d'extraction. Ces résultats ont mis en évidence le potentiel prometteur d'extraction de la Fx par les NADES.

#### 3.7.4. L'HPLC et les anti-solvants

Gallego et al. ont étudié l'extraction de Fx par High Performance Liquid Chromatography (HPLC) et sa purification par adsorbants à partir de biomasse de *T. lutea* [365]. Les résultats HPLC et de spectroscopie de masse ont montré que les chlorophylles et les autres xanthophylles étaient effectivement retenus par les adsorbants et éliminés de l'extrait brut qui ne contenaient plus que la Fx, bien qu'aucune donnée de pureté n'ait été spécifiée dans l'étude [365]. Chen et al. ont considéré un procédé écologique qui consiste à cristalliser la Fx à l'aide d'un anti-solvant supercritique de *Hinckesia mitchellae* en utilisant du CO<sub>2</sub> supercritique. Ils ont réussi à obtenir un taux de rendement et de pureté de Fx de 98,3 % et 87,7 % respectivement [366]. Malgré les avantages de ces nouvelles méthodes utilisant moins de solvants toxiques et prenant moins de temps que les procédés plus conventionnels, la chromatographie reste la méthode la plus efficace de purification après extraction.

#### 3.7.5. Le système en double phase aqueuse

Une autre méthode d'extraction prometteuse repose sur les systèmes à double phase aqueuse (*aqueous two-phase system*, ATPS). Cette méthode peut, en plus, être couplée à de l'ultrafiltration (UF) [367,368]. Ces deux techniques sont considérées comme respectueuses de l'environnement car elles impliquent l'utilisation de solvants aqueux non polluants. L'ATPS est

basée sur la différence de coefficient de partage de la Fx entre deux solvants non miscibles, l'eau étant le composant principal des deux phases [369–371]. Il existe différents types d'ATPS, les plus courants étant le système polymère-polymère (polyéthylène glycol, dextrane) [372,373] et le système polymère-sel (phosphate, sulfate, citrate) [374,375]. D'autres types d'ATPS incluent les systèmes alcool-sel (avec de l'éthanol, du propanol) [376], le système micellaire-micellaire inverse, le système de liquides ioniques (imidazolium). Gómez-Loredo et al. ont réussi à purifier la Fx avec un système alcool-sel à base d'éthanol-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [377]. Ils ont obtenu 95,36 % de taux de rendement et 66,01 % de pureté pour la Fx extraite de *P. tricornutum* et 89,18 % de récupération et 78,14 % de pureté pour la Fx extraite d'*I. galbana* [377].

### 3.7.6. La chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Pour pouvoir être utilisée dans les domaines de la pharmaceutique et de la nutraceutique, un pourcentage élevé de pureté est exigé pour une molécule bioactive telle que la Fx. La chromatographie de partage centrifuge (CPC) est un procédé de séparation qui a récemment permis d'obtenir de la Fx à une pureté supérieure à 99 % [103]. Le principe de la CPC est basé sur la différence de partage des solutés entre deux liquides non miscibles. L'objectif est d'enrichir une des deux phases en Fx et éliminer simultanément la plupart des impuretés [79]. Par rapport à une colonne de chromatographie en silice greffée, la CPC ne génère pas de particules de silice polluantes, ne nécessite pas une grande quantité de solvants, et est un processus rapide qui ne dégrade pas les solutés [79]. Cette technique a permis d'obtenir de la Fx hautement purifiée et de manière accessible, pour des applications éventuelles dans le domaine de l'alimentaire et de la pharmaceutique [79]. La Figure 21 illustre le processus de purification de la Fx utilisant la méthode de CPC à partir d'un extrait de pigments de *T. lutea* tel qu'appliqué dans cette thèse. Dans la littérature, il existe seulement deux rapports sur la purification de la Fx par CPC [79,378]. Selon l'étude de Gonçalves de Oliveira-Júnior et al., les premiers résultats obtenus à partir de biomasse de *T. lutea* valident l'utilisation de la CPC en tant que méthode respectueuse de l'environnement pour une extraction et une pré-purification très efficaces de la Fx à partir de microalgues. L'étude précise que le processus est une première approche et doit être optimisé [79].

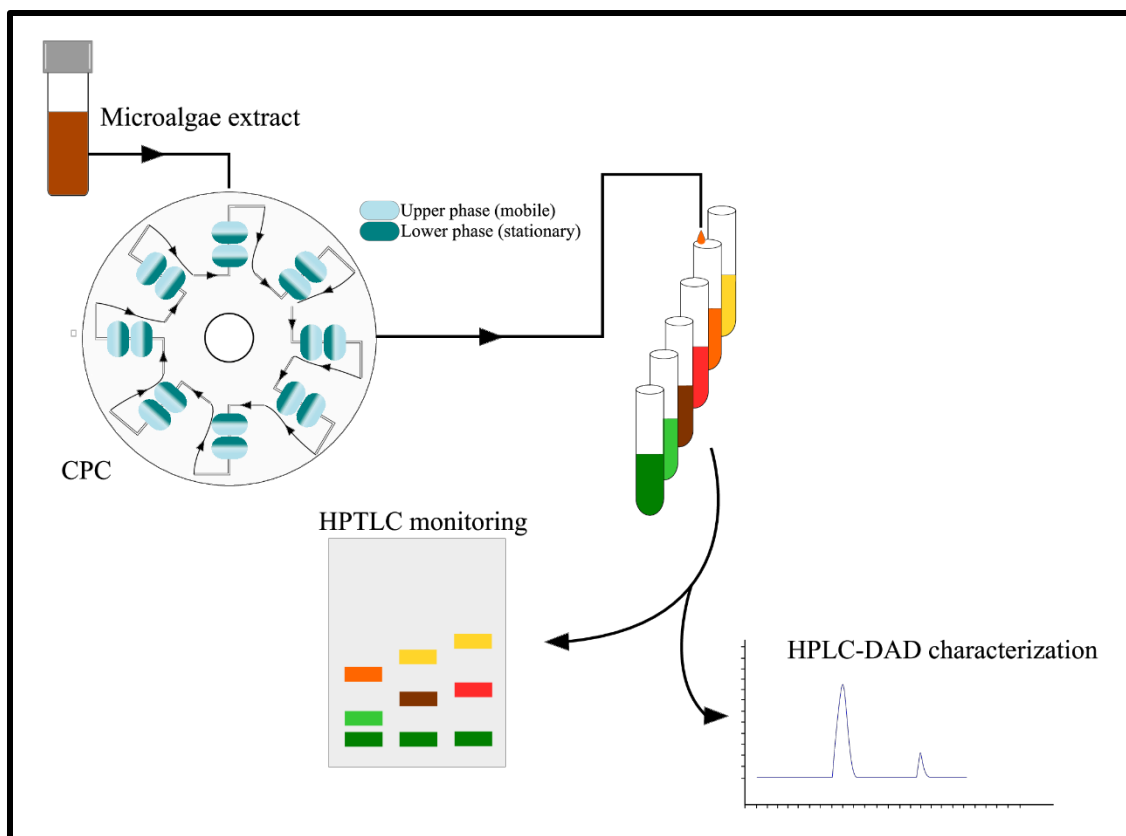


Figure 21. Exemple d'un procédé de purification de la fucoxanthine à partir d'un extrait de *T. lutea* en utilisant la chromatographie de partage centrifuge.

Toutes les méthodes d'extraction de la Fx présentent des inconvénients qui peuvent impacter sa pureté lors du procédé de séparation finale. Certaines méthodes nécessitent un traitement long et progressif qui augmente la teneur en impuretés, tandis que d'autres impliquent des températures élevées et des temps d'extraction longs, ce qui peut entraîner une dégradation de la Fx. D'autres facteurs pouvant induire la dégradation de la Fx, comme un pH trop faible ou l'exposition prolongée à la lumière, doivent être considérés lors de la mise en place de l'étape de purification.

Les études sur les activités et sur la toxicité de la Fx utilisent de la Fx à teneur minimale de 95 % afin de réduire les éventuels effets secondaires des impuretés [379,380]. Des études toxicologiques ont par exemple montré qu'il existait des effets négatifs de la Fx sur les cellules humaines. Il est donc nécessaire de connaître, pour un produit industriel, non seulement la pureté mais également la concentration en Fx [214]. Jusqu'ici, seuls les travaux d'Alghazwi et al. ont précisé la pureté de la Fx (95 %), et sa concentration limite de toxicité [214]. La

réglementation sur l'application des substances actives exige la qualification d'au moins trois tests cliniques pour garantir l'utilisation sûre de la substance pour la consommation humaine [381].

### 3.7.7. La stabilité de la fucoxanthine

En raison du grand nombre de doubles liaisons, la Fx est sensible à l'isomérisation durant les procédés d'extraction et de purification [190,382]. De plus, dans le cas d'une production à grande échelle, la stabilité et le stockage à long terme de la Fx sont deux paramètres supplémentaires à prendre en compte. Il a été démontré que la Fx était relativement instable après son extraction de la biomasse à cause de conditions externes telles que la lumière, la présence d'oxygène, des températures élevées, des milieux à faible pH et de la présence d'eau [183,189,194,383]. La Fx est par exemple facilement dégradée dans l'eau à 26 °C avec une perte de 30% de la teneur en Fx après quatre semaines de stockage [383]. Les étapes d'extraction et de purification doivent donc être réfléchies de sorte à éviter au maximum la dégradation de la molécule de Fx. Les procédés doivent être rapides, à des températures relativement basses. Une autre alternative pour éviter l'oxydation pourrait être, par exemple, d'intégrer un procédé anaérobie. Pour améliorer la bioaccessibilité de la Fx, les méthodes d'encapsulation sont envisagées dans la littérature. Elles permettraient également de conserver la structure moléculaire du pigment et d'augmenter sa stabilité [348,349]. Des matériaux comestibles tels que les acides gras, l'amidon poreux, la caséine, le chitosane ou encore l'or, ont été utilisés pour encapsuler la Fx sous forme de micro ou nanoparticules. Les résultats ont démontré que la stabilité et la bioaccessibilité de la Fx dans l'organisme avaient été améliorées [317,383–392]. Préserver la stabilité et améliorer la bioaccessibilité de la Fx induit cependant un coût plus élevé du procédé de production en raison de la complexité de l'encapsulation.

## 3.8. Le marché mondial de la fucoxanthine

Les multiples études sur la Fx ont démontré que ce pigment était une alternative écologique, en tant qu'ingrédient naturel, aux compléments alimentaires, aux composés des produits cosmétiques et à certains médicaments (Figure 22). En raison de sa structure inhabituelle, la synthèse chimique de la molécule de Fx n'est pas encore possible. Actuellement, les sources commerciales de Fx pour l'alimentation sont les algues brunes telles que *Laminaria* sp. (connue sous le nom de *Saccharina* sp.), *Sargassum* sp., *Fucus* sp., *Undaria pinnatifida*, *Hijka fusiformis*

[393]. La Fx est actuellement principalement vendue en Asie (Figure 22) sous forme de poudre ou d'huile d'algues brunes, principalement en capsule ou en cachet. Les acides gras polyinsaturés entrent parfois dans la composition de ces produits, car ce sont également des molécules à haute valeur ajoutée. Un nombre important d'entreprises asiatiques sont déjà des acteurs majeurs du marché (Oryza Oil & Fat Chemical Co., Yangling Ciyuan Biotech Co., Yigeda Bio-Technology Co., Agrochemi Co., etc.). Le règlement Novel Food en Europe autorise la consommation des espèces de macroalgues précédemment décrites, alors qu'il n'autorise à ce jour qu'une seule microalgue productrice de Fx, la diatomée *Odontella aurita* [394]. Cependant, *O. aurita* est actuellement commercialisée en tant que complément de silicium organique, et non en tant que concentré de Fx. Seules deux sociétés proposent ces produits (Algosud et Laboratoire Motima). Aux États-Unis, davantage de produits dérivés de microalgues ont été autorisés sur le marché (Figure 22) : Fucovital™ d'Algatech, NutriXanthin™ et DermaXanthin™ d'Algahealth, BrainPhyt™, Phaeosol™ et GamePhyt™ de Microphyt (qui a obtenu en 2019 le statut de *New Dietary Ingredient of the American Food and Drug Administration*). De plus, bien que certaines microalgues soient les meilleures productrices de Fx (les diatomées et les haptophytes), aucune méthode d'extraction n'a encore été standardisée [205]. Cela représente donc un défi majeur pour que la Fx soit considérée comme un ingrédient naturel économique, car son obtention doit nécessiter des méthodes technologiques simples, rapides, peu coûteuses et respectueuses de l'environnement [205].

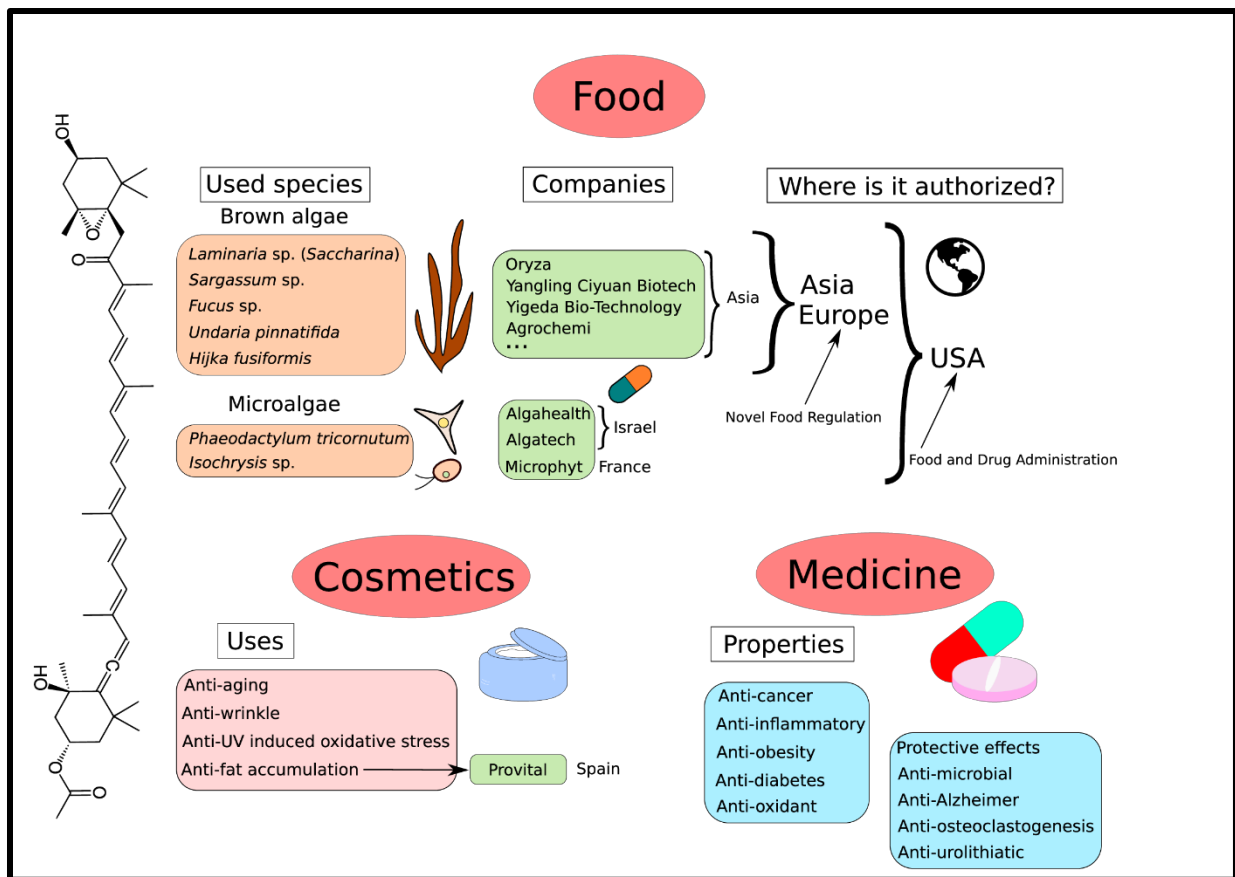


Figure 22. Applications et marché actuel de la fucoxanthine dans les domaines de l'alimentation, des cosmétiques et de la pharmaceutique.

La Fx représente un marché important en tant que nutraceutique et médicament pour ses nombreuses propriétés en santé humaine [395], mais également en tant qu'ingrédient cosmétique. Bien qu'il ne s'agisse pour l'instant que d'un marché secondaire, les activités de la Fx pour l'industrie cosmétique sont nombreuses : anti-âge, anti-rides, anti-stress oxydatif [179,396,397]. Ces propriétés sont principalement dues à l'activité anti-oxydante de la molécule, qui prévient la formation de ROS. En effet, le stress oxydatif joue un rôle important dans le processus de formation des rides en provoquant la dégradation de la matrice de collagène [398]. Par ailleurs, il est connu que la protéine UCP1 (uncoupling protein 1) empêche l'accumulation d'adipocytes spécifiquement dans le tissu adipeux brun. Des études in vivo sur des modèles murins suggèrent que la Fx permet l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux blanc [399,400], qui est le principal tissu adipeux de l'homme adulte, en particulier dans les cas d'obésité où le tissu adipeux brun est atrophié [401]. L'UCP1 empêcherait alors l'accumulation de graisse, réduisant la masse grasse du tissu adipeux blanc. Provitall, une société espagnole, a réalisé une étude démontrant qu'après l'application d'un gel-crème enrichi en Fx sur les tissus



adipeux chez 61 volontaires, la couche de graisse et la cellulite ont été réduites [402]. En réponse à l'intérêt accru pour ce caroténoïde, le taux de croissance annuel du marché actuel de la Fx en tant qu'ingrédient nutraceutique ou cosmétique est de +2,47% en moyenne. La taille du marché de la Fx était de 92 millions de dollars en 2014, 99 millions de dollars en 2017 et devrait atteindre 120 millions de dollars en 2022 [205,403]. Derwenkus et al. ont conclu que la rentabilité du processus d'obtention de la Fx dépendait finalement principalement du prix du marché de la Fx [283]. Ils ont également mis en évidence le fait que le coût de production de la biomasse des microalgues est plus faible dans les volumes de culture plus élevés (de 882€/kg à 228€/kg de 0,7t/an à 170t/an).

En conclusion, la Fx est actuellement un marché émergent spécialisé dans la pharmaceutique et la nutraceutique avec un intérêt croissant pour l'industrie cosmétique. À notre connaissance, aucune étude n'a démontré l'intérêt direct de la Fx pour l'alimentation animale (autre qu'en aquaculture avec la consommation directe de microalgues), ni comme colorant alimentaire ou non alimentaire. Jusqu'à présent, seules quelques entreprises commercialisent la Fx. Pour les marchés pharmaceutiques, nutraceutiques et cosmétiques, les produits semblent être soit un extrait de biomasse d'algues, soit un extrait de Fx purifiée. Dans les deux cas, certains produits sont aussi valorisés en y associant des acides gras poly-insaturés.

#### 4. Objectifs de la thèse

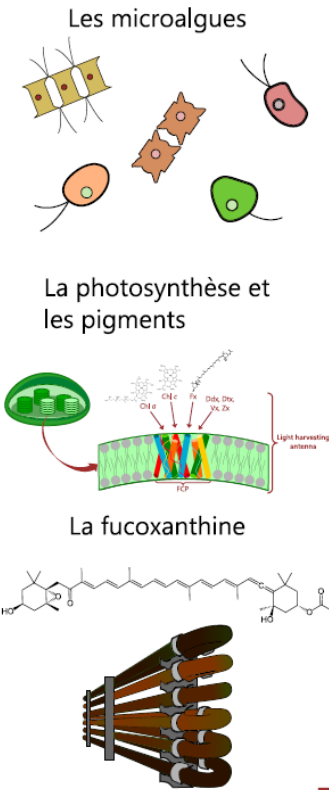
Cette thèse pluridisciplinaire, à l'interface entre deux équipes de recherche, l'une en physiologie et biochimie des microalgues, l'autre en bioprocédés et bioraffinage, commence par la compréhension de la physiologie d'une espèce de microalgue en amont de la production d'un métabolite d'intérêt, la fucoxanthine. Cette connaissance est nécessaire pour aborder la production de fucoxanthine à diverses échelles. A l'échelle de la cellule, il s'agit de comprendre et expliquer les processus métaboliques inhérents à la synthèse de fucoxanthine chez *T. lutea*. Cela passe par l'étude de l'environnement de la fucoxanthine dans les cellules, plus exactement dans l'antenne collectrice de lumière, avec deux sous-objectifs : une étude de biologie moléculaire et une étude des concentrations pigmentaires. A l'échelle de la culture, en petit photobioréacteur, il s'agit de choisir la souche et les conditions environnementales favorisant la productivité en fucoxanthine. A l'échelle de production, l'étude commence par une montée en échelle de la production de biomasse sa récolte et son séchage. La mise au point d'un procédé d'extraction-purification de la fucoxanthine, respectueux des principes de chimie verte

et d'éco-design, est également multi-échelles. A l'échelle du laboratoire, nous avons caractérisé les phases d'extraction solide-liquide et adapté un système biphasique liquide-liquide permettant d'enrichir la fucoxanthine en chromatographie de partage centrifuge. Les résultats obtenus permettront de discuter des conditions de changement d'échelle du procédé.

La Figure 23 présente le schéma global des travaux effectués dans cette thèse. Le Chapitre 1 est l'étude bibliographique de la photosynthèse et des pigments des algues Chromistes, et plus particulièrement de la fucoxanthine. Le Chapitre 2 présente les travaux d'annotation des gènes *lhc* de l'antenne collectrice de lumière de *T. lutea* ainsi que l'étude de la synthèse des pigments photosynthétiques (dont la fucoxanthine) et photoprotecteurs en fonction de l'azote et de l'intensité lumineuse. Le Chapitre 3 a consisté à étudier les différences dans les stratégies de photoprotection chez trois souches de *T. lutea* grâce à l'application séquentielle de quatre intensités lumineuses sur des cultures en continu. Le Chapitre 4 présente la montée en échelle de culture, de 350 mL à 300 L pour ces trois mêmes souches qui, en culture discontinue (ou batch) présentaient différentes concentrations de fucoxanthine. Enfin, les travaux du Chapitre 5 ont consisté à l'optimisation d'une méthode de purification de la fucoxanthine par chromatographie de partage centrifuge. Le Chapitre 6 présente la discussion générale de ces travaux.

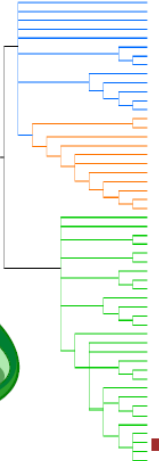
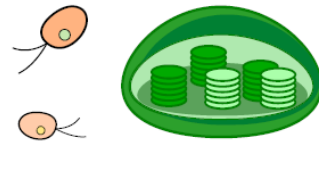
Le Chapitre 1, section 3. La fucoxanthine, a été valorisé sous forme d'un article publié, qui a été traduit en français pour être inclus dans l'état de l'art. Les Chapitres 2, 3 et 5 ont été valorisés sous forme d'articles publiés, soumis ou en cours de soumission. Ils sont organisés de la façon suivante : une synthèse de l'article en quatre parties (contextes et objectifs ; matériel et méthodes ; résultats et discussion ; conclusion), puis l'article est présenté en anglais en fin de chapitre. Le Chapitre 4 est rédigé en français et est en cours de rédaction en anglais pour soumettre prochainement un article.

**Chap. 1 :**  
Introduction et état de l'art



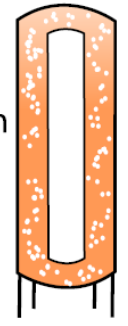
**Chap. 2 :**  
La photosynthèse chez *T. lutea*

- Annotation des gènes de la FCP
- Etude de leur expression en fonction de la disponibilité en lumière et en azote
- Etude de la synthèse de fucoxanthine



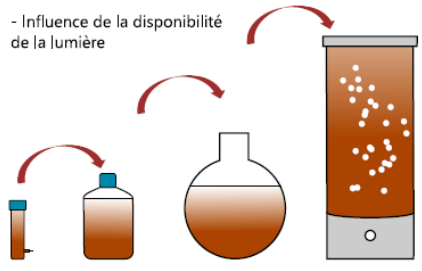
**Chap. 3 :**  
Les stratégies de photoprotection chez *T. lutea*

- Etude de 3 souches distinctes
- Etude en turbidostat de l'expression de la FCP et de la synthèse de pigments photoprotecteurs



**Chap. 4 :**  
Production de fucoxanthine par *T. lutea*

- Scale-up de 350 mL à 300 L
- Influence de la disponibilité de la lumière



**Chap. 5 :**  
Extraction et purification de fucoxanthine par CPC

- Optimisation de méthode et chimie verte
- Amélioration du rendement et de la pureté

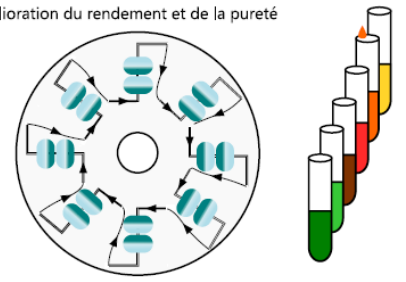


Figure 23. Schéma de présentation du travail de thèse.

---

# CHAPITRE 2

---

La photosynthèse chez *Tisochrysis lutea*



## Chapitre 2 – La photosynthèse chez *Tisochrysis lutea*

Ce chapitre présente un résumé des résultats ayant été valorisés dans l'article « *The Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein in Tisochrysis lutea: influence of nitrogen and light on FCP gene expression and fucoxanthin synthesis.* » publié dans le journal *Frontiers in Plant Science, Plant Biotechnology* en février 2022. Il comporte des précisions sur le matériel et les méthodes utilisés ainsi qu'un résumé des résultats principaux décrits dans l'article, présenté en fin de chapitre.

### 1. Contexte et objectifs

Tandis que la voie métabolique exacte de la fucoxanthine chez les algues brunes soit à ce jour inconnue, il est possible de mieux comprendre la façon dont les cellules synthétisent ce pigment. Comme précisé dans le Chapitre 1, section 2.2.1., La fucoxanthine fait partie de l'antenne collectrice de lumière, elle se fixe avec d'autres pigments à la Fucoxanthin Chl *a,c* binding Protein (FCP) afin de capturer les photons et initier la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse. Étudier l'antenne collectrice de *T. lutea* dans son ensemble permet donc de comprendre la réponse physiologique précise de la microalgue en fonction des paramètres majeurs dans la synthèse de fucoxanthine, l'intensité lumineuse (l'irradiance) et les nutriments (notamment l'azote).

Les études sur la structure des FCPs et les gènes *lhc* ont été principalement menées sur des diatomées, dont les mécanismes photosynthétiques et photoprotecteurs sont actuellement bien décrits contrairement aux microalgues haptophytes [101]. Comme évoqué précédemment (voir le Chapitre 1, section 2.2.1.), l'étude de Wang et al. détaille avec précision les séquences et la conformation des protéines Lhcf, Lhcr et Lhcx composant la FCP chez la diatomée modèle *P. tricornutum* [105]. Les sites de liaison des Chl *a*, des Chl *c*, et des molécules de Fx ont été identifiés sur les acides aminés des protéines Lhcf de la microalgue et il a été démontré que la proximité spatiale des molécules de Chl *a* et de Fx permet de rendre très efficaces le transfert et la dissipation de l'énergie lumineuse chez *P. tricornutum* [124–127]. En s'appuyant sur la littérature scientifique et notamment sur les travaux de Wang et al., il est alors possible de proposer une caractérisation de la FCP chez *T. lutea* et de préciser la classification des gènes *lhc* composant la FCP chez les haptophytes.

Les objectifs de cette étude étaient dans un premier temps d'identifier par analyse de similarité les gènes *lhcf*, *lhcr* et *lhcx* codant pour la FCP chez *T. lutea*, puis d'identifier des sites candidats pour la fixation des Chl et de la Fx sur les protéines Lhcf. Dans un second temps, nous avons investigué la plasticité physiologique de *T. lutea* au niveau de l'antenne collectrice de lumière, c'est à dire au niveau de la FCP et des pigments associés. Ainsi, la transcription des gènes *lh* ainsi que l'accumulation des caroténoïdes dans les cellules, dont la fucoxanthine, ont été étudiées en fonction de l'apport en N et de l'irradiance. Pour cela, les cultures de *T. lutea* ont été soumises soit à une lumière continue soit à un cycle jour/nuit, dans des conditions de limitation ou de réplétion en N.

## 2. Matériel et méthodes

Cette section a pour objectif de détailler la méthode d'analyse transcriptomique des gènes d'intérêt de *T. lutea* pour la présente étude du Chapitre 2 et celle du Chapitre 3.

### 2.1. Principe général de l'analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique, ou analyse RNAseq (RNA sequencing), étudie l'ensemble des ARN produits lors de la transcription du génome d'un organisme. L'ARN, ou acide ribonucléique, est synthétisé dans le noyau à partir de l'ADN durant la phase de transcription (Figure 24). Les gènes peuvent donc être transcrits ou non transcrits. La transcription des gènes peut être constitutive et/ou peut répondre à un stimulus de l'environnement des cellules. Par exemple, une variation de lumière influe sur les gènes liés à la photosynthèse dans l'antenne collectrice de lumière [120]. Les ARN messagers (ARNm) sont les ARN servant de matrice pour la synthèse des protéines. Après maturation, les ARNm sont transportés dans le cytoplasme de la cellule et peuvent être traduits en protéines (Figure 24). Parfois, la transcription et la traduction ne sont pas corrélés. L'analyse transcriptomique permet donc d'analyser les gènes transcrits dans les cellules, de les quantifier (un gène pouvant être transcrit de multiples fois), de démontrer que certains gènes spécifiques sont effectivement transcrits et de comparer l'effet individuel ou l'effet croisé de différentes conditions environnementales sur un organisme.

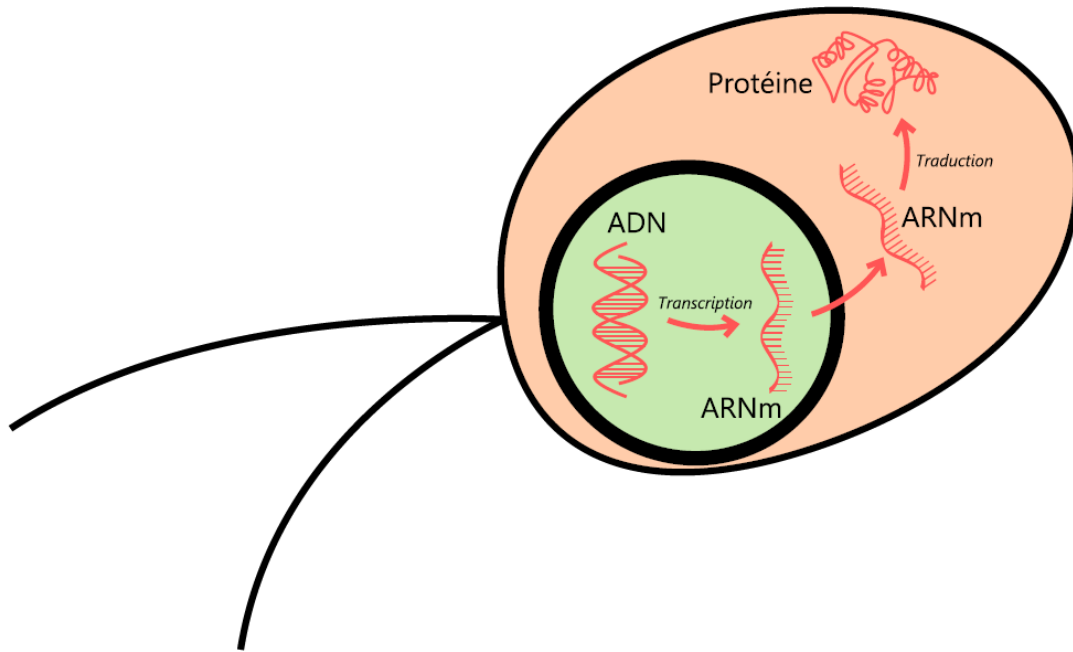


Figure 24. Schéma simplifié des processus de transcription et de traduction dans une cellule de *T. lutea*. ARNm = ARN messenger.

À partir d'une culture de microalgues, les ARN totaux sont extraits, puis les ARNm possédant une queue poly(A), *i.e.* les ARN polyadénylés, sont sélectionnés. La polyadénylation est l'ajout de ribonucléotides adénosine (A) à l'extrémité des ARNm pendant la phase de maturation, elle permet aux ARNm d'être stables et transportables vers le cytoplasme. Les ARNm sélectionnés sont ensuite fragmentés, puis amplifiés avec le même nombre de cycles (de sorte à pouvoir les quantifier), et enfin séquencés avec la technologie Illumina (séquençage NGS = Next Generation Sequencing). Le séquençage Illumina est basé sur la synthèse d'un brin correspondant à chaque fragment, soit sur l'ajout séquentiel de nucléotides. Chaque nucléotide émet une fluorescence unique lorsqu'il est ajouté au cours du séquençage, ce qui permet de l'identifier (Figure 25). Le séquençage est simultanément pour tous les fragments.



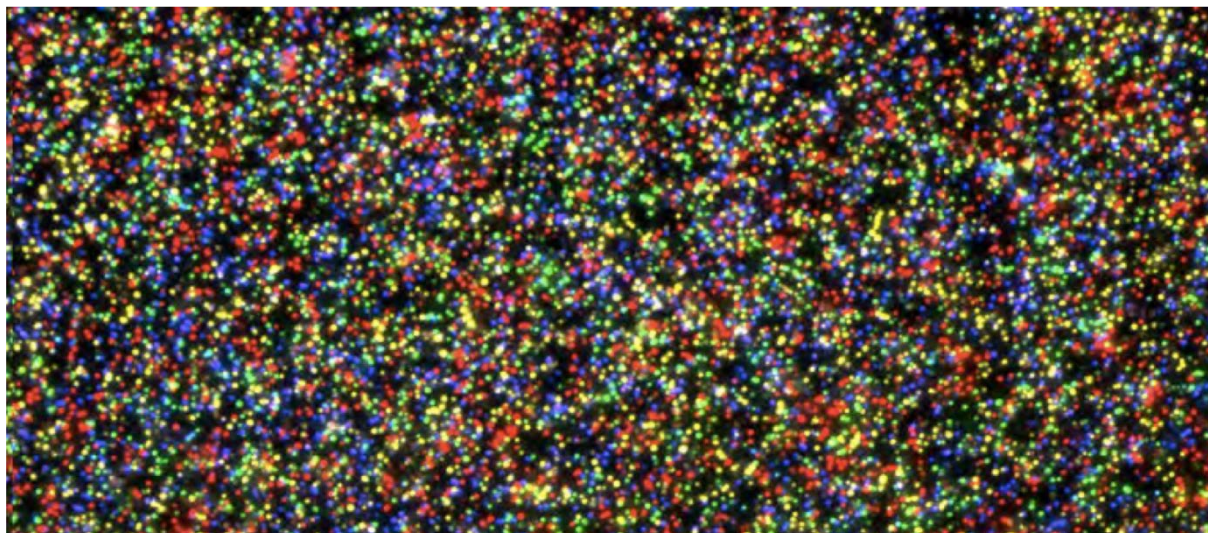


Figure 25. Analyse en cours d'un séquençage NGS. Chaque point représente l'ajout d'un nucléotide sur un fragment. La couleur du point indique la nature du nucléotide en cours d'ajout. Crédit image : Shendure et al., Science, 2005 [404].

Les « reads » correspondant aux différents fragments d'ARN sont ensuite récupérés. Comme les fragments ont été amplifiés, il y a un grand nombre de reads correspondant à un seul fragment. Si un gène est transcrit plusieurs fois, il y aura de nombreux fragments associés, et un nombre de reads proportionnel.

Le traitement bioinformatique des reads se déroule ensuite en plusieurs étapes. La qualité des reads est contrôlée, les éventuels ARN ribosomaux restants (qui ne sont normalement pas sélectionnés avec les ARNm poly(A)) sont éliminés, les adaptateurs également (spécifiques au séquençage Illumina, ils permettent de fixer les fragments lors du séquençage). Puis la qualité des reads dits corrigés est de nouveau contrôlée. Ensuite, les reads sont alignés sur un génome de référence (ou bien un transcriptome) dont les gènes sont annotés, afin que les reads soient attribués aux gènes correspondants. Les reads s'alignant sur des gènes correspondent donc à des gènes qui ont été transcrits. Ces derniers sont ensuite comptés puis normalisés (en général par leur taille). Il est alors possible d'analyser statistiquement les transcrits (par une analyse de l'expression différentielle entre un ou plusieurs facteurs, par un suivi de l'évolution de l'expression).

## 2.2. Méthode et outils utilisés

Après extraction des ARN totaux des cultures de *T. lutea* au laboratoire, le séquençage a été effectué par la plateforme GENOTOUL de l'INRAE de Toulouse (France). Ensuite, le traitement

bioinformatique des reads pour chaque échantillon a nécessité l'utilisation du supercalculateur DATARMOR, localisé au Centre IFREMER Bretagne. Dans un premier temps, la plateforme internet Galaxy a été utilisée pour accéder aux outils de calcul DATARMOR de manière simplifiée. Puis, afin d'avoir plus de libertés dans les commandes et les paramètres de calcul, DATARMOR a été utilisé en ligne de commande.

La qualité des reads a été évaluée une première fois avec l'outil FastQC pour chaque échantillon [405]. Le score étant élevé, cela a mis en évidence que seuls les reads des ARN poly(A) avaient bien été sélectionnés pour le séquençage. L'élimination des adaptateurs des reads a ensuite nécessité l'utilisation de l'outil TrimGalore [406]. La qualité finale a été évaluée avec FastQC, et les reads ont été validés pour chaque échantillon. Le programme d'alignement HISAT2 [407] a ensuite été utilisé afin d'aligner les reads sur le génome de référence de *T. lutea* [408] afin de les référer aux gènes correspondant. Ensuite, pour plus de facilité, les outils de calculs ont été utilisés via l'environnement RStudio et la programmation en R. L'outil featureCounts [409] a été utilisé pour compter la totalité des transcrits par gène pour chaque échantillon. Tous les comptages ont ensuite été normalisés avec l'outil DESeq2 [410]. Puis, les gènes d'intérêt (*lhcf*, *lhcr*, *lhcx*) ont été sélectionnés et regroupés dans une table présentant le nombre normalisé de transcrits par gène et par échantillon.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Précision de la classification des gènes *lhc* chez les algues Chromistes

À la lumière de l'étude bibliographique et des résultats de cette étude, les gènes *lhcf* ont été subdivisés en quatre groupes phylogénétiquement distincts et représentant les haptophytes (2 groupes), les diatomées (1 groupe), et les algues brunes (1 groupe). *T. lutea* possède 52 gènes *lhc* qui ont été identifiés par de multiples recherches de similarité et des alignements : 28 gènes *lhcf*, 12 gènes *lhcr* et 12 gènes *lhcx*. La proportion de *lhcr* suggère que la capture de la lumière chez *T. lutea* est importante dans le PSI tandis que chez une autre haptophyte, *Emiliania huxleyi*, elle se déroule principalement dans le PSII.

## 3.2. Identification des sites de fixation de la fucoxanthine et des chlorophylles

La comparaison des sites de fixation des pigments de *P. tricornutum* avec les séquences protéiques Lhcf de *T. lutea* suggère que *T. lutea* posséderait au moins neuf molécules de Chl et cinq de Fx se répartissant sur plusieurs séquences protéiques Lhcf. Trois séquences Lhcf possédant très peu de ces sites de fixation correspondent aux trois gènes transcrits les plus exprimés. Il est probable que ces séquences possèdent un rôle structural très important dans la FCP plutôt que la fixation de pigments. Bien que la conformation exacte de la FCP de *T. lutea* reste inconnue, ces résultats suggèrent fortement que la capacité de capture de la lumière des haptophytes est similaire à celle des diatomées.

## 3.3. Expression des gènes *lhcf*, *lhcr* et synthèse de la fucoxanthine

### 3.3.1. Influence de la lumière

Les analyses transcriptomiques ont montré que les gènes *lhcf* et *lhcr* étaient exprimés le jour et peu voire non exprimés la nuit. À l'inverse, les pigments photosynthétiques comme la fucoxanthine s'accumulaient la nuit dans les cellules. Ces résultats suggèrent que les cellules ont synthétisé le complexe FCP pendant le jour afin de permettre la fixation des pigments photoprotecteurs, en anticipant l'accumulation et donc la fixation des pigments photosynthétiques à plus faible lumière. Il existe donc un compromis entre le besoin de photoprotection le jour, et le processus de capture de lumière particulièrement actif en début de nuit à faible lumière.

### 3.3.2. Influence de la disponibilité en azote

Il a été suggéré que la FCP représentant une fraction constante du quota d'azote total (qN) dans les cellules [411]. En passant d'une condition de limitation à une condition de réplétion en N, puis de la réplétion à la déplétion en N, il y a eu respectivement une augmentation puis une diminution significative de l'expression des *lhcf* et *lhcr* ainsi que du contenu en Fx. Ces résultats suggèrent une corrélation entre la fixation de la Fx sur les séquences Lhcf et Lhcr, si les gènes *lhcf* et *lhcr* transcrits sont effectivement traduits en protéines.

### 3.4. Expression des gènes *lhcx* et synthèse des pigments photoprotecteurs

La Dtx a été accumulée durant le jour contrairement à la Ddx, corroborant le rôle de la Dtx dans la photoprotection et illustrant la dé-époxydation progressive de la Ddx en Dtx. Cependant, la Ddx n'a pas été totalement dé-époxydée en Dtx, suggérant que la Ddx peut également jouer le rôle de pigment photosynthétique secondaire. En parallèle, les gènes *lhcx* ont été plus exprimés le jour. Ces résultats sont similaires à de nombreuses études chez les diatomées [118,120,412–414], et révèlent la corrélation entre les gènes *lhcx* spécifiques à la photoprotection, et le cycle de pigments xanthophylles photoprotecteurs Ddx-Dtx.

## 4. Conclusion

La FCP de *T. lutea* a été caractérisée pour la première fois dans cette étude, de trois manières différentes. Dans un premier temps, 52 gènes *lhcr* codant pour la FCP de *T. lutea* ont été annotés. Ils ont ensuite été classés en 3 familles : *lhcf*, *lhcr*, *lhcx*. Le sous-groupe *lhcz* a été identifié au sein du clade *lhcr* de *T. lutea*. Ensuite, le potentiel de capture de la lumière de *T. lutea* a été évalué en localisant des sites de fixation putatifs des pigments sur les protéines Lhcf. En cherchant à redevenir stable, les molécules de Fx peuvent probablement transférer rapidement les électrons issus de leur état d'excitation aux Chl *a* et ainsi activer la chaîne de transport d'électrons. Enfin, l'expression des gènes *lhcr* a été analysée. L'étude d'un cycle photopériodique dynamique et d'une variation de disponibilité en N a démontré une dynamique très sensible des pigments photosynthétiques et photoprotecteurs, ainsi qu'une nette différence dans l'expression des gènes *lhcr*.

## 5. Article : The Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein in *Tisochrysis lutea*: influence of nitrogen and light on FCP gene expression and fucoxanthin synthesis.

**Article publié** : « Pajot, A.; Lavaud, J.; Carrier, G.; Garnier, M.; Saint-Jean, B.; Rabilloud, N.; Baroukh, C.; Bérard, J.-B.; Bernard, O.; Marchal, L.; Nicolau, E. The Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein in *Tisochrysis Lutea*: Influence of Nitrogen and Light on Fucoxanthin and Chlorophyll a/c-Binding Protein Gene Expression and Fucoxanthin Synthesis. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, doi :10.3389/fpls.2022.830069 » [415].

Les données supplémentaires citées « Figure S » et « Table S » sont disponibles en version numérique sur le site de l'éditeur.

### 5.1. Abstract

We observed differences in *lhc* classification in Chromista. We proposed a classification of the *lhcf* family with two groups specific to haptophytes, one specific to diatoms, and one specific to seaweeds. Identification and characterization of the Fucoxanthin and Chlorophyll a/c-binding Protein (FCP) of the haptophyte microalgae *Tisochrysis lutea* were performed by similarity analysis. The FCP family contains 52 *lhc* genes in *T. lutea*. FCP pigment binding site candidates were characterized on Lhcf protein monomers of *T. lutea*, which possesses at least nine chlorophylls and five fucoxanthin molecules, on average, per monomer. The expression of *T. lutea lhc* genes was assessed during turbidostat and chemostat experiments, one with constant light (CL) and changing nitrogen phases, the second with a 12 h:12 h sinusoidal photoperiod and changing nitrogen phases. RNA-seq analysis revealed a dynamic decrease in the expression of *lhc* genes with nitrogen depletion. We observed that *T. lutea lhcx2* was only expressed at night, suggesting that its role is to protect cells from return of light after prolonged darkness exposure.

**Keywords:** carotenoids, fucoxanthin and chlorophyll a/c-binding proteins, Lhcf, Lhcr, Lhcx, *Tisochrysis lutea*, turbidostat culture, chemostat culture

### 5.2. Introduction

Marine planktonic photosynthetic organisms are responsible for approximately 50% of Earth's primary production and fuel the global ocean biological carbon pump [416]. Among these

producers, 50% are represented by Chromista [417], including the haptophytes which are abundant primary producers. Haptophytes are ubiquitous and they play an important role in ocean carbon fluxes [70,73–75]. They are of a great interest for aquaculture and human health applications [22,80,213,418]. Along with other Chromista, haptophytes contain the most abundant photosynthetic carotenoid pigment in oceans, fucoxanthin (Fx), which shows numerous pharmacological properties including anti-oxidant, anti-cancer, anti-diabetes activities [419].

In Chromista, light-harvesting complexes (LHC) are composed of pigments and of Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*-binding Proteins (FCPs). FCPs belong to the superfamily of transmembrane LHC proteins, currently well described in diatoms [101]. FCPs bind photosynthetic pigments such as Fx, chlorophylls *a* and *c* (Chl *a/c*), and diadinoxanthin (Ddx) which can be de-epoxidized in diatoxanthin (Dtx) for photoprotection purposes [94,102,103]. In particular, FCPs spatial organization and their carotenoids confer to Chromista a very strong absorption capacity in the blue-green spectral range of visible light, which are the most available radiations in the water column [104,105].

Studies on FCP protein sequences characterized three main families [106–108], and two families whose function is unknown, Lhcz and Lhcq in diatoms, Lhcq being commonly found in red algal PSI [109,110]. The Lhcf are the dominant proteins, they are attached to PSII [111,112]. Lhcr proteins are attached to PSI [109,113]. Both Lhcf and Lhcr proteins mostly bind photosynthetic pigments such as Fx and Chl *a* and *c*. Finally, the Lhcx proteins play a role in photoprotection [114–117]. It is assumed that Lhcx proteins bind both Ddx and Dtx in diatoms (Beer *et al.*, 2006; Zhu & Green, 2010; Lepetit *et al.*, 2013). FCP genes encoding for the three families are referred to as *lhcf*, *lhcr* and *lhcx* (i.e. *lhc* genes).

Studies on FCPs structure and *lhc* genes have been mostly carried out on diatoms, for which the photosynthetic and photoprotective mechanisms, are now well described [121,122]. In *Chaetoceros gracilis*, two FCP supercomplexes were characterized, related to both photosystems, PSII-FCPII, PSI-FCPI. With cryo-electron microscopy (cryo-EM) analyses, it was found that PSI-FCPI presents different binding pattern of pigments [109,113] than PSII-FCPII [111,112]. In the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*, FCPs are composed of 17 Lhcf proteins, 14 Lhcr proteins, and 4 Lhcx proteins [101]. In an in-depth description of the light-harvesting antenna of *P. tricornutum* with crystallography analysis [105], 9 binding sites for Chl

*a* and *c* have been identified along with 7 binding sites for Fx, among 17 Lhcf sequences. Furthermore, the study of these binding sites demonstrated that Chl *a* and Fx molecules are closely related (i.e. each Fx is related to 1 Chl *a*) [105]. This close spatial proximity allows for an efficient energy transfer and dissipation [124–127].

Fucoxanthin molecules shift absorption properties according to their amino-acid binding sites on Lhcf monomers [105]. There exists three types of Fx molecules named according to their absorption properties: “Fx-blue” strictly absorb in the blue range of the visible light spectrum ( $\lambda_{\max} = 463$  nm), “Fx-green” absorb in a wider blue/green light range ( $\lambda_{\max} = 492$  nm), and “Fx-red” additionally absorb in an even wider blue/green light called “red-shifted” range ( $\lambda_{\max} = 500$ -550 nm) [165]. This specific shift in absorption properties explains the capacity of Fx to harvest photons over a wide light spectrum [105], allowing Chromista to perform photosynthesis under a broad range of light conditions, including different habitats (water column, shallow sediments, sea-ice, etc.) and different depths [127,199,420].

Contrary to diatoms, FCPs of haptophytes have not been much described, except for *Emiliania huxleyi*. *E. huxleyi* FCPs are composed of 66 proteins (encoded by 75 genes), all named Lhcf and sub-divided into five groups, Lhcf group1, Lhcf group2, Lhcf(red), Lhcz-like, LI818-like [128,129]. They were determined according to the classification of the LHC superfamily of Koziol *et al.* (2007) and has not been updated since. In Koziol *et al.*, the LI818/LI818-like group is related to photoprotection, the Lhcr/Lhcc group related to the LHC of red algae and cryptomonads, the Lhcf group related to the FCPs, and the Lhcz group whose specific function is still unknown. Because haptophytes are direct descendants of the cryptomonad lineage [131,132], the Lhcf(red) group of *E. huxleyi* was named after the Lhcr/Lhcc group.

In Chromista, light intensity and nitrogen availability are of a major influence on the photosynthetic process. Indeed, the concentration of pigments is changing with light wavelength and intensity [282,421–423]. It is known that low light increases the photosynthetic pigments content [80,156,275,318] and the *lhcf* expression [128] while high light increases the quenching of excess energy with photoprotective pigments (Lavaud *et al.*, 2002; Demmig-Adams *et al.*, 2014), increases the *lhcx* expression [425], and decreases the *lhcf* expression [128]. Furthermore, it was shown in the haptophyte *Isochrysis galbana* that the carotenoid content decreased with nitrogen (N) deprivation [60], and that, reversely, in the diatom *Odontella aurita*, an initial high concentration of nitrate boosted the accumulation of Fx in the chloroplast

membranes, and even more when coupled with N supplement [59]. Several studies showed an increase in the pigment content with an increase of N availability [56,57,60,328,329]. In batch culturing mode however, as an increase of N availability generates an increase of the biomass, the light availability decreases over time as the culture develops. With less access to light, photosynthetic pigments content is increased and the expression of photosynthesis related genes such as *lhc* genes is impacted. Therefore, the direct impact of N availability is hard to assess in batch culturing mode. However, in continuous culturing mode with very limited variations of biomass, it is possible to measure the pigment content per cell without the shelf-shading effect.

We selected *Tisochrysis lutea*, whose genome was sequenced [426], with the aim to update and complete *lhc* genes and FCP proteins classification in haptophytes. This species contains high amounts of fucoxanthin and other carotenoids [80], whose biological activities are of a great value in the field of aquaculture (*i.e.* bivalve hatcheries) [19,20] and biotechnologies (*i.e.* nutrition, pharmacology, etc) [427,428]. Our objectives were to identify for the first time *T. lutea* *lhc* genes, and to classify them into the three families *lhcf*, *lhcr* and *lhcx*. Then, we relied on a crystallographic study performed with *P. tricornutum* [105] to determine some of the chlorophylls and fucoxanthin binding sites candidates on FCPs of *T. lutea*. We further analysed the influence of N availability and light intensity in co-regulating the transcript levels of *lhc* genes. In parallel, we investigated the synthesis of the carotenoids associated to these genes in *T. lutea*, the Fx, the Ddx and the Dtx.

### 5.3. Materials and methods

#### 5.3.1. Homologies of FCP sequences in Chromista

Before studying specifically *Tisochrysis lutea*, we collected FCP protein sequences of diverse microalgae from the literature (Table S1). A similarity analysis of the well described 35 FCP sequences of *Phaeodactylum tricornutum*, taken as a reference, to all protein sequences available in Chromista was performed. Sequences with an e-value  $< 10^{-40}$  were available for eleven diatom strains (*Fragilariopsis solaris*, *Fragilariopsis cylindrus*, *Pseudo-Nitzschia multistriata*, *Nitzschia inconspicua*, *Thalassiosira pseudonana*, *Thalassiosira oceanica*, *Cyclotella cryptica*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros tenuissimus*), six haptophytes strains (*Emiliania huxleyi*, *Chrysothila carterae*, *Chrysochromulina*



*tobinii*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Diacronema lutheri*), four ochrophytes (*Aureococcus anophagefferens*, *Nannochloropsis gaditana*, *Pelagomonas calceolata*, *Heterosigma akashiwo*), four dinoflagellates (*Heterocapsa triquetra*, *Symbiodinium microadriaticum*, *Polarella glacialis*, *Durinskia baltica*), three brown seaweeds (*Ectocarpus silicosus*, *Saccharina latissima*, *Saccharina japonica*), and one alveolate (*Vitrella brassicaformis*).

### 5.3.2. Identification of Lhcf, Lhcr and Lhcx proteins in *Tisochrysis lutea* proteome

Lhcf Lhcr and Lhcx were identified by homologue search in the proteome of *T. lutea* generated *in silico* from sequenced genome [426]. We used as a query the FCP sequences of three diatoms, *Phaeodactylum tricornutum*, *Fragilariopsis cylindrus* and *Thalassiosira pseudonana* (Table S2). Similarity analysis was done with the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTP). All targets in *T. lutea* proteome were selected. We specified the three Lhc families of *T. lutea* by correspondence with the best similarity matches with the diatom sequences (Tables S3, S4, S5).

The Lhcf family representing the majority of FCP sequences, we additionally built a cladogram with the Lhcf sequences of *T. lutea*, of the four diatoms *Phaeodactylum tricornutum*, *Fragilariopsis cylindrus*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, of *Saccharina japonica* and *Saccharina latissima* (brown seaweeds), and of *Emiliana huxleyi* (haptophyte) (Table S6). Using the software GENEIOUS<sup>®</sup>, we aligned the 134 sequences with Clustal Omega and built a cladogram by Neighbor-Joining using the genetic distance model Jules-Cantor with 100 permutations. Bootstrap scores of the main nodes are displaying on the cladogram.

With the same method we also built a cladogram representing the FCP sequences in *T. lutea* and another representing the Lhcr sequences of *T. lutea* and *E. huxleyi* in order to identify the subgroup Lhcz.

### 5.3.3. Binding sites of Chl *a*, Chl *c* and Fx in *T. lutea*

In a crystallographic study, the binding sites of Chl *a*, Chl *c* and Fx on Lhcf sequences of *P. tricornutum* were found [105]. We aligned Lhcf proteins of *T. lutea* with the ones of *P. tricornutum*. Then, we identified the amino-acid binding sites in *T. lutea* by comparing with the ones in *P. tricornutum*. Binding sites are of two different kinds. They are either central ligands or H bond ligands, as it is described in *P. tricornutum*. Furthermore, a majority of pigments possess several binding sites (up to four) and are not necessarily present in all Lhcf sequences

of a species. Therefore, for each amino-acid binding site, the percentage of presence over all the Lhcf sequences was calculated.

#### 5.3.4. Culture conditions

All the experiments were performed with *T. lutea* strain CCAP 927/14. The inoculum were maintained in Walne's medium [429] at  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Both experiments were conducted in a continuous 8-L flat panel photobioreactor (1000 × 400 × 250 mm).

##### *Constant light experiment (CL):*

To assess the effects of N availability on pigments content and transcripts levels of *lhc* genes, we used and completed the data of a continuous culture in chemostat performed by Garnier *et al.* (2016). A chemostat is a continuous culture with a controlled chemical environment and for which the dilution rate (ratio of inflow rate over the reactor volume) is constant. *T. lutea* was grown for 85 days with a  $0.5 \text{ day}^{-1}$  dilution rate illuminated with constant light ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The dilution rate was periodically checked by weighing the output culture. A modified Walne's medium containing 125/125  $\mu\text{M}$  N:P ratio was used to induce a limitation in N. The reactor was continuously aerated by bubbling and maintained at 27 °C and pH 7.3. Three nitrate ( $\text{NO}_3$ ) spikes, consisting in the injection of 3.5 mmol of  $\text{NaNO}_3$  in the 10 L of culture, were made at days 20, 43 and 83. The experiment has therefore been run in consecutive triplicates.  $\text{NO}_3$  spikes during cultivation aim to subject the algae to different N regimes monitored with the N quota ( $q_N$ ), i.e. the intracellular N/C ratio analysis: balanced limitation phase (steady-phase,  $q_N = 0,09 \text{ molN molC}^{-1}$ ), dynamic repletion phase (more dissolved N available in the culture medium,  $q_N = 0.13 \text{ molN molC}^{-1}$ ) and dynamic depletion phase (less dissolved N available in the culture medium,  $0.013 > q_N > 0.09$ ).

##### *Dynamic light experiment (DL):*

We performed a second experiment in turbidostat to understand the impact of both diel cycle and N availability on pigments content and transcript levels of *lhc* genes expression. A turbidostat is also a continuous culture, but the dilution varies in order to maintain the cell density at a constant level (*i.e.* the turbidity). *T. lutea* was grown at 23°C during 15 days with Walne's medium [429]. The light regime was sinusoid photoperiods of 12 h with a maximal irradiance of  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at 12:00 h and darkness from 18:00 h to 00:00 h. Two  $\text{NO}_3$  spikes of 3.5 mmol  $\text{NaNO}_3$  were injected at days 1 and 8. The experiment was carried out two times

in similar conditions (sequential duplicates). The culture was monitored in N repletion and in N depletion phase (no dissolved N available in the culture medium) by sampling every two hours. For transcriptomic analysis, the culture was harvested during the selected day at 8:00 h, 12:00 h and 00:00 h for both N phases.

#### 5.3.5. Intracellular N concentration, cell concentration

The number of cells per unit of culture medium and intracellular carbon (C) and N were measured once a day for the CL experiment and every two hours for the DL experiment. Intracellular C and N were measured on an elemental analyser (Flash 2000, Thermofisher). Cell counting was performed using a Malassez hemocytometer.

#### 5.3.6. Pigment extraction and HPLC analysis

For both experiments, we measured the FCP pigment content: the chlorophyll *a* (only in the DL experiment), the Fx, the Ddx and the Dtx. For the CL experiment, samples were centrifuged and wet pellets were stored at -80°C. Each pellet with a known number of cells (250 to 500  $10^6$  cells) was dispersed in 5 ml of 95% acetone, vortexed, and then mixed for 3 to 9 min at 30 Hz frequency in a mixer-mill (Retsch MM-400) with 0.74 g of 1 mm glass beads. Acetone extract was filtered on a 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE filter before immediate HPLC analysis.

For the DL experiment,  $15 \cdot 10^6$  cells were harvested on a 0.2  $\mu\text{m}$  fiberglass filter, then immersed in 2 ml 95% acetone overnight. The acetone extracts were filtered on a 0.2  $\mu\text{m}$  fiberglass filter prior to injection in HPLC.

The filtered acetone extracts were analysed by HPLC-UV-DAD (Agilent Technologies series 1200 HPLC-UV-DAD) using an Eclipse XDB-C8 reverse phase column (150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  particle size, Agilent) following the method described by Van Heukelem & Thomas (2001). Briefly, solvent A was 70:30 MeOH: H<sub>2</sub>O 28 mM ammonium acetate and solvent B was pure MeOH. Gradient elution was the same as described in Van Heukelem & Thomas (2001). Quantification was carried out using external calibration against pigments standard (Chl *a* for DL experiment, Dtx, Ddx and Fx for both experiments, provided by DHI, Denmark).

#### 5.3.7. RNAseq

50 ml of algal culture were sampled for transcriptomic analysis. Total RNA was extracted and sequenced as described by Carrier *et al.* (2014). Library of RNAseq were built for each sample.

Poly(A) mRNA were isolated from total RNA using oligo(dT) magnetic beads (MicroPoly(A) Purist™ Kit, Ambion). The two cDNA libraries were built according to the manufacturer's instructions and sequenced with an Illumina HiSeq 3000 sequencer by the GenoTool platform. We obtained an average of  $2,6 \cdot 10^7$  and  $3,2 \cdot 10^7$  reads per sample in the CL and DL experiments respectively.

Raw reads of each sample were filtered using TrimGalore to remove known Illumina adapter sequences. Low quality reads were excluded using a quality score threshold of 30 and a minimal length of 75 or 150 bases. The quality of reads was assessed using FastQC. Then, sequenced reads for each sample were aligned using Bowtie 2 in the QuasR package in R (Quantify and Annotate Short Reads in R). Each gene within the alignment was counted using the Rsubread package in R with the function featureCounts, based on *T. lutea* reference genome [408]. Gene counts were obtained for each sample and normalized with DESeq2.

#### 5.3.8. Statistics

In order to analyse the influence of the N status (qN) and of the light intensity on the *lhc* gene transcripts level in *T. lutea*, a Differential Expression (DE) analysis of *lhc* genes was performed on R using the DESeq2 tool. The global influence of qN and light was determined with the Fold Change and the adjusted p-value ( $<0.05$ ) of the DESeq2 comparison of all transcripts in each culture condition. The resulting Mean Average plot (MA-plot) allows to visually identify a significant difference of expression of all transcripts (Figure S5-S10).

The Fold Change and the adjusted p-value of the corresponding 52 transcripts in the resulting table of the DESeq2 comparison were selected to observe if their expression was significantly influenced by qN and light intensity. In addition, an analysis of variance (ANOVA) was performed on the 52 transcripts counts between each condition.

### 5.4. Results

#### 5.4.1. Homologous sequences in Chromista

Our comparative analysis of sequences available in Chromista revealed that among all the sequences similar to those of *P. tricornutum*, the majority are classified as unknown protein or as hypothetical light harvesting proteins. In two diatoms (*Fragilariopsis cylindrus*, *Thalassiosira pseudonana*) and one haptophyte (*Emiliania huxleyi*), sequences are classified as LHC proteins

(i.e. FCPs). These results lead us to study more specifically the FCP proteins of the FCP complex in *T. lutea* coded by the *lhcf*, *lhcr* and *lhcx* genes.

#### 5.4.2. Lhcf, Lhcr and Lhcx annotation in the proteome of *T. lutea*

Our analysis revealed that 52 FCP proteins constitute the FCP in *T. lutea* (Figure 26, Table S7). All of them matched to either the Lhcf, the Lhcr or the Lhcx sub-family of diatom FCPs. According to the similarity scores obtained with *P. tricornutum*, *F. cylindrus* and *T. pseudonana* (Tables S3-S5), among the sequences of *T. lutea* 28 were Lhcf, 12 were Lhcr and 12 were Lhcx (Figure 26). In *T. lutea*, the Lhcf23 sequence has been classified as a Lhcr after one single match with low score in BLAST results, but the cladogram (Figure 26) clustered this sequence into the Lhcf family. It is likely that the algorithm did not display all the lowest scores in the similarity search BLAST. Knowing it is classified as a Lhcf sequence with the cladogram, a new similarity search was done between this sequence and the Lhcf sequences of all the three diatoms. We observed a very few matches of the Lhcf23 with Lhcf diatom sequences, with scores in the same range than the previous match with the Lhcr sequence of *F. cylindrus*. We conclude, according to the BLAST results only, that the probability of the Lhcf23 belonging to either the Lhcr or Lhcf family was the same, but according to the cladogram, it was decided to classify it as a Lhcf sequence. Furthermore, it was not possible to classify the Lhcx5 sequence with certitude because although BLAST results were slightly higher with the Lhcx of the three diatoms (Table S3-S5), it did not appear as pertaining to the Lhcx family on the cladogram (Figure 26).

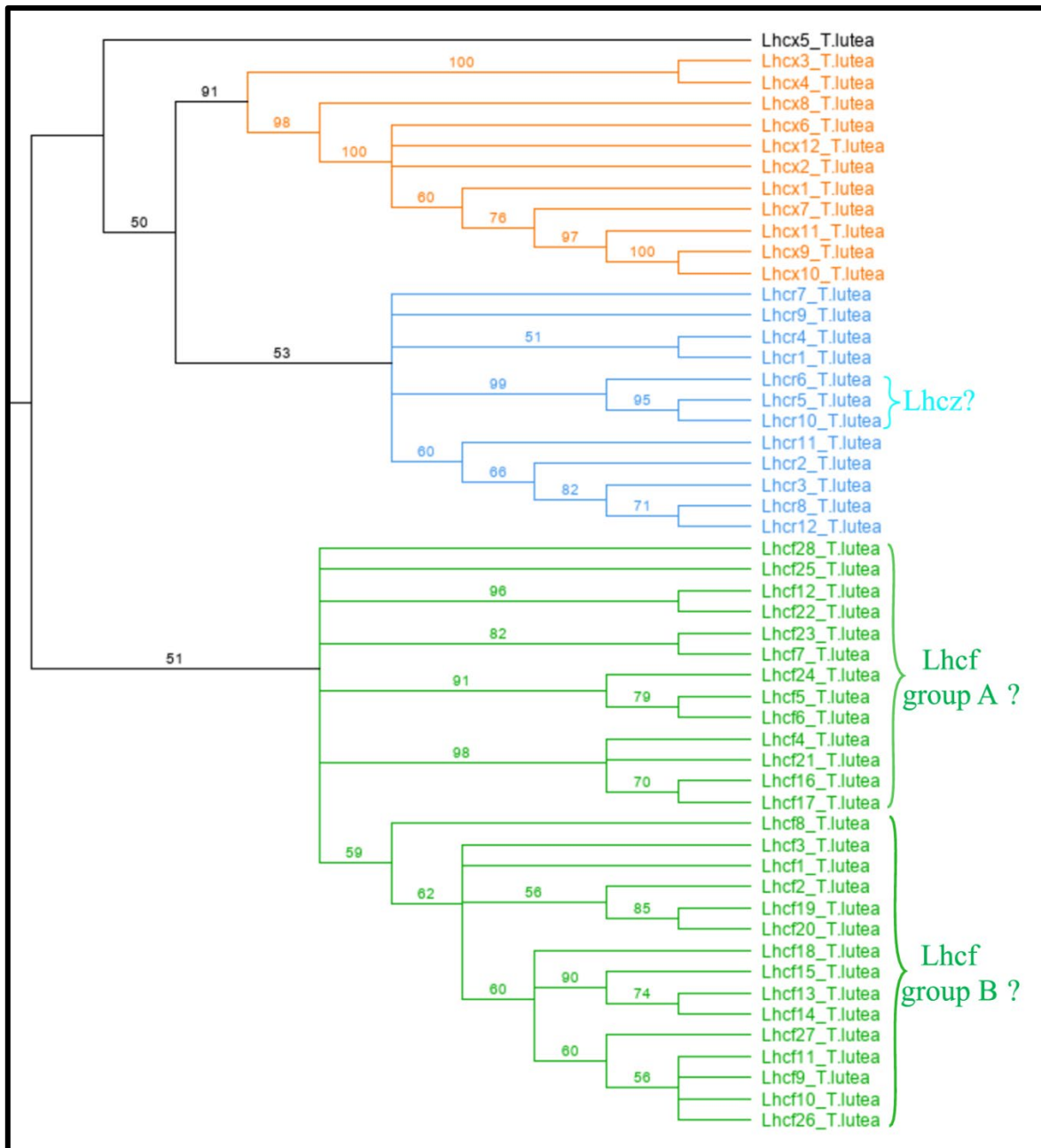


Figure 26. Cladogram of the 52 Lhc sequences of *Tisochrysis lutea*. Orange: LhcX. Blue: LhcR. Green: LhcF.

To further analyse the Lhcf, major sequences of the FCP, we built a cladogram showing four main well supported clades of Lhcf in haptophytes, diatoms and brown seaweeds (Figure 27).

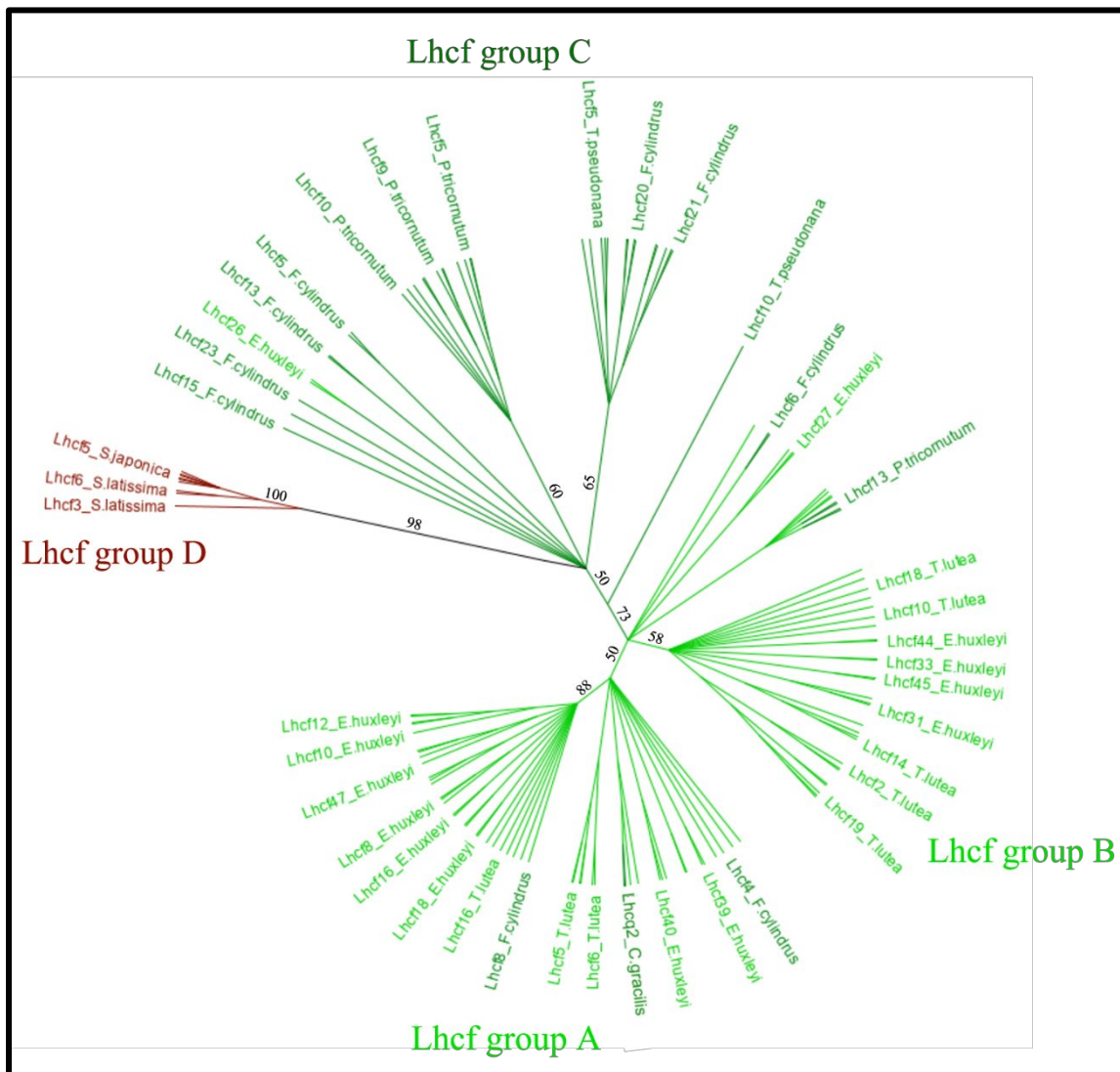


Figure 27. Cladogram of the 134 Lhcf sequences of eight species, *Phaeodactylum tricornutum*, *Fragiliaropsis cylindrus*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, *Saccharina japonica*, *Saccharina latissima*, *Emiliana huxleyi*, and *Tisochrysis lutea*. Light green: haptophyte Lhcf. Dark green: diatom Lhcf. Dark red: seaweed Lhcf.

Consequently, complementary to sequences classification in diatoms [431], we propose a new classification of FCPs for haptophytes (Table 4). Lhcf group A sequences are mainly found in haptophytes, Lhcf group B sequences are exclusively found in haptophytes, Lhcf group C sequences are exclusively found in diatoms, and Lhcf group D sequences are exclusively found in brown seaweeds. Based on this cladogram, we observed that the Lhcf groups I and II of *E.*

*huxleyi* described in [129] correspond to the Lhcf groups A and B respectively. Furthermore, we aligned all the FCP sequences of *E. huxleyi* and found out two other distinct groups: all sequences of the Lhcf(red) and LI818-like groups in *E. huxleyi* [129] correspond respectively to the Lhcr and Lhcx groups (Table S6, Figure S1). It appeared that one sub-group of the Lhcr family corresponds to the Lhcz-like family described in McKew *et al.* By building a cladogram between the Lhcr of *E. huxleyi* and those of *T. lutea* (Figure S2), we observed two Lhcr sub-groups, one of which is composed of the Lhcz-like of *E. huxleyi* along with three Lhcr of *T. lutea* (Lhcr5, Lhcr6, Lhcr10), which might therefore be Lhcz sequences. We propose a new annotation of the 75 *E. huxleyi* *lhc* genes into the three *lhcf*, *lhcr* and *lhcx* families (Table S6), and we hypothesize the existence of a fourth family being the Lhcz, both in *E. huxleyi* and *T. lutea*.

**Table 4. Proposal for a new classification of Lhcf**

<i>Lhcf</i> groups	Haptophytes	Diatoms	Brown seaweeds
<i>Lhcf</i> group A	+++	+	-
<i>Lhcf</i> group B	+++	-	-
<i>Lhcf</i> group C	-	+++	-
<i>Lhcf</i> group D	-	-	+++

#### 5.4.3. Binding sites of chlorophylls and fucoxanthin in Lhcf proteins in *T. lutea*

All Lhcf sequences of *P. tricornutum* and *T. lutea* have been aligned and pigment binding sites candidates were identified in *T. lutea* (Figure 28).



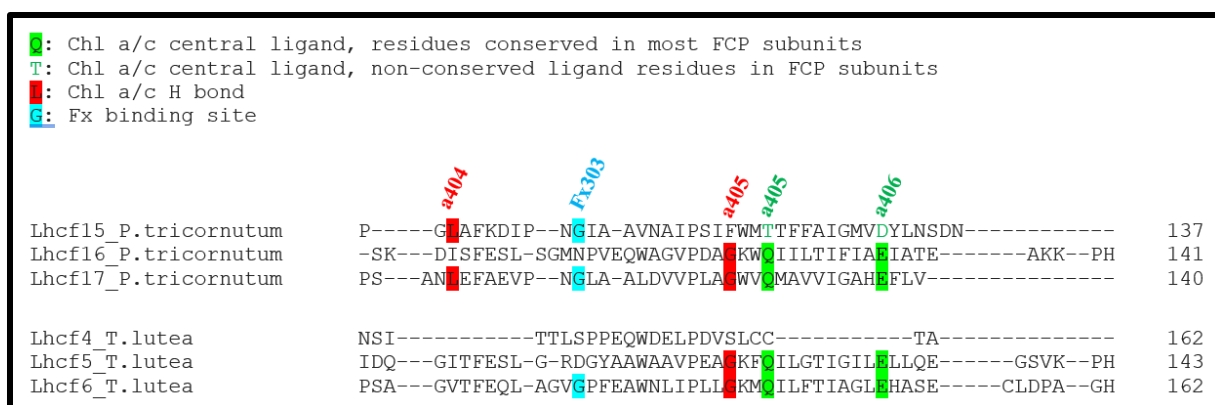


Figure 28. Example of a part of the alignment of three Lhcf sequences of *P. tricornutum* and three Lhcf sequences of *T. lutea* with binding sites of three Chl a (a404, a405, and a406) and one fucoxanthin (Fx303).

Table 5 and Table 6 present the different types of ligands for Chl *a*, Chl *c* and Fx in Lhcf sequences of *P. tricornutum* compared to that of *T. lutea* at the same amino-acid positions. A majority of pigments possess several bindings sites (e.g. Chl a404, Fx302).

Table 5. Binding sites of Chl a and c amino-acid (in capital letters) in *T. lutea* according to those identified in *P. tricornutum* [105]. Percentages represent the presence of the amino acid binding sites among all Lhcf sequences of each species. The central ligand of Chl a and c is or is not conserved (shifted or new amino-acid position) compared to Chl a and b binding sites of the LHCII of plants.

Chl identified in		Central ligand		H bond	
		conserved	% among lhcf	not conserved	% among lhcf
Chl a401	<i>P. tricornutum</i>	P	35%		77%
	<i>T. lutea</i>	P	61%		43%
					0%
Chl a402	<i>P. tricornutum</i>	E	100%		59%
	<i>T. lutea</i>	E	89%		29%
Chl c403	<i>P. tricornutum</i>	H	100%		71%

	<i>T. lutea</i>	H	89%			R	50%
Chl a404	<i>P. tricornutum</i>	Q	47%	T or V	53%	L	24%
	<i>T. lutea</i>	Q	14%	T or V	43%	L	29%
Chl a406	<i>P. tricornutum</i>	E	82%	D	18%	K	100%
	<i>T. lutea</i>	E	75%	D	18%	K	89%
Chl a405	<i>P. tricornutum</i>	Q	88%	A or T	12%	G	94%
	<i>T. lutea</i>	Q	89%	A or T	0%	G	71%
Chl a407	<i>P. tricornutum</i>	E	100%			F	65%
	<i>T. lutea</i>	E	93%			F	14%
Chl c408	<i>P. tricornutum</i>	Q	65%	N or H	35%	K	65%
	<i>T. lutea</i>	Q	0%	N or H	93%	K	68%
Chl a409	<i>P. tricornutum</i>	H	88%	E or S	12%		
	<i>T. lutea</i>	H	61%	E or S	4%		

Table 6. Binding sites of Fx amino-acid (in capital letters) in *T. lutea* according to those identified in *P. tricornutum* [105]. Percentages represent the presence of the binding sites among all Lhcf sequences of each species.

Fx identified in		Central ligand	% among lhcf
<i>P. tricornutum</i>			
Fx 301	<i>P. tricornutum</i>	L	77%
	<i>T. lutea</i>	L	50%
Fx 302	<i>P. tricornutum</i>	R	100%
		T	24%
		Y	25%
		M	71%

	<i>T. lutea</i>	R	93%
		T	0%
		Y	54%
		M	0%
	<i>P. tricornutum</i>	F	59%
Fx 303		G	94%
	<i>T. lutea</i>	F	29%
		G	68%
	<i>P. tricornutum</i>	K	65%
Fx 304		K	68%
	<i>T. lutea</i>	K	68%
	<i>P. tricornutum</i>	L	24%
Fx 305		L	18%
	<i>T. lutea</i>	L	18%

All Chl *a* and *c* conserved central ligands in *P. tricornutum* (excepted c408) corresponded to homologous domains in *T. lutea*. All non-conserved central ligands (excepted a405) were located in *T. lutea*. All H bond sites (excepted a401) were located in *T. lutea*. *T. lutea* conserved the same Fx binding sites than for *P. tricornutum* (Table 6), except for 2 binding sites of the Fx302. Among the 7 Fx of *P. tricornutum*, the comparison with *T. lutea* could only be done upon Fx301, 302, 303, 304, 305. Among these five, four Fx binding sites in *P. tricornutum* corresponded completely to homologous amino-acid domains in *T. lutea*. However, Fx302 in *P. tricornutum* had four binding sites, R, T, Y and M but only R and Y were found in *T. lutea*. More precisely, the Y binding site in *P. tricornutum* corresponded to a Y on a 3 aa shifted position in *T. lutea*. This position corresponded to the T binding site of Fx302 in *P. tricornutum* (Figure S2), highlighting the relevance of this protein section in binding a Fx molecule.

According to these results, 9 binding sites of Chl *a*, *c* and 5 binding sites of Fx (for multiple sites, at least one is found) were found in *T. lutea* and described in Figure S3. Another observation is that except for the Chl a404 central ligand and the Chl a407 H bond ligand, the percentages of the presence of binding sites among all *T. lutea* Lhcf sequences were very close to those in *P. tricornutum*.

#### 5.4.4. Effects of nitrogen availability and light intensity on the expression of *lhcf* genes

*CL experiment: qN and biomass*

After the NO<sub>3</sub> spike, qN (i.e. the N quota, the intracellular N/C ratio analysis used to determine the N regime of the cultures) immediately increased, cells entered the repletion phase for 12 hours. The biomass started to increase 10 hours after the NO<sub>3</sub> spike. The qN decreased in 24 hours after reaching its maximum (0.13 mol N mol C<sup>-1</sup>), it is the depletion phase. The biomass increased for 24 hours before stabilizing for another 24 hours, and finally decreased. Eventually, cells reached a new steady phase with constant qN and biomass (Figure 29A).

*CL experiment: pigments*

Figure 29B,C shows an increase of Fx, Ddx and Dtx content in cells (expressed as Fx:C, Ddx:C and Dtx:C ratio) concurrently with qN (Figure 29A) during the repletion phase. Fx and Ddx content were tripled and were maximum when qN was maximum, then slightly decreased during the depletion phase. Reversely, Dtx content was doubled during depletion (Figure 29C). The Ddx + Dtx pool was up to five times higher during the dynamic phases of the experiment repletion and depletion phases (2.5e-03 mg mg<sup>-1</sup>) than during the limitation phase (5.0.e-04 mg mg<sup>-1</sup>).

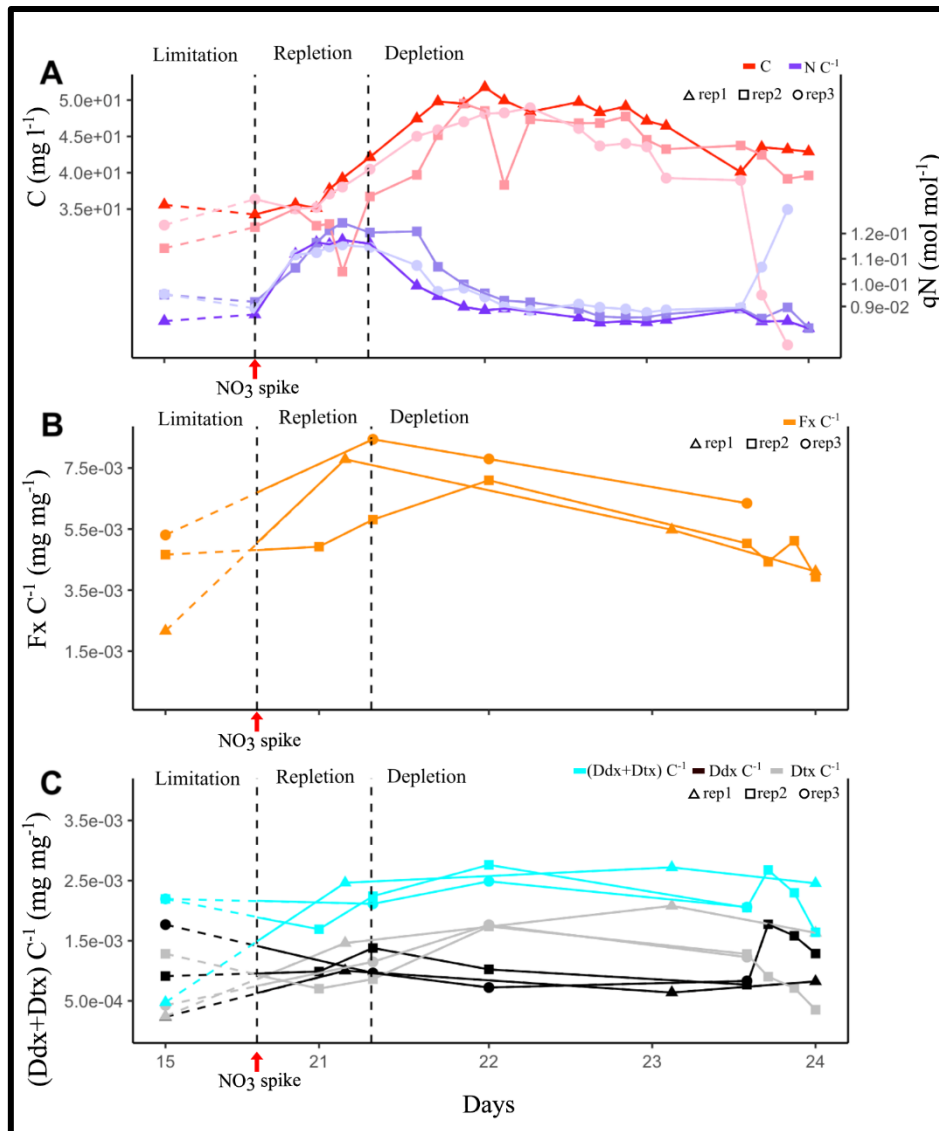


Figure 29. Constant light (CL) experiment. Dashed curve corresponds to the first 5 days of culture under N limitation conditions. (A) Evolution of cell biomass expressed as total intracellular C and of qN expressed as intracellular N:C ratio of three culture replicates. (B) Evolution of the Fx:C ratio of three culture replicates. (C) Evolution of the photoprotective pigment ratios: (Ddx + Dtx):C, Ddx:C, and Dtx:C of the three culture replicates. Vertical black dashed lines mark the transition between limitation and repletion, and repletion and depletion in N.

#### CL experiment: *lhc* genes expression

The evolution of FCP gene counts has been studied in as a function of N availability in the same cultures. Transcriptomics analyses were performed on two replicates. We observed an increase of all *lhcf*, *lhcr* and *lhcx* transcripts counts during the repletion phase compared to limitation, and a decrease in depletion phase compared to repletion (Figure 30, Tables S8-S10). The global

analysis of variance did not show significant differences of *lhcx* counts between all N phases. However, specific analysis of genes revealed that two *lhcx* were regulated with significant differences. Along with one *lhcf* outlier (*lhcf13*), *lhcx2* and *lhcx5* gene counts were between 3 and 20 times higher than the median value of other *lhcf* and *lhcx* genes in each N condition (Figure 30). No expression was recorded for *lhcr9*.

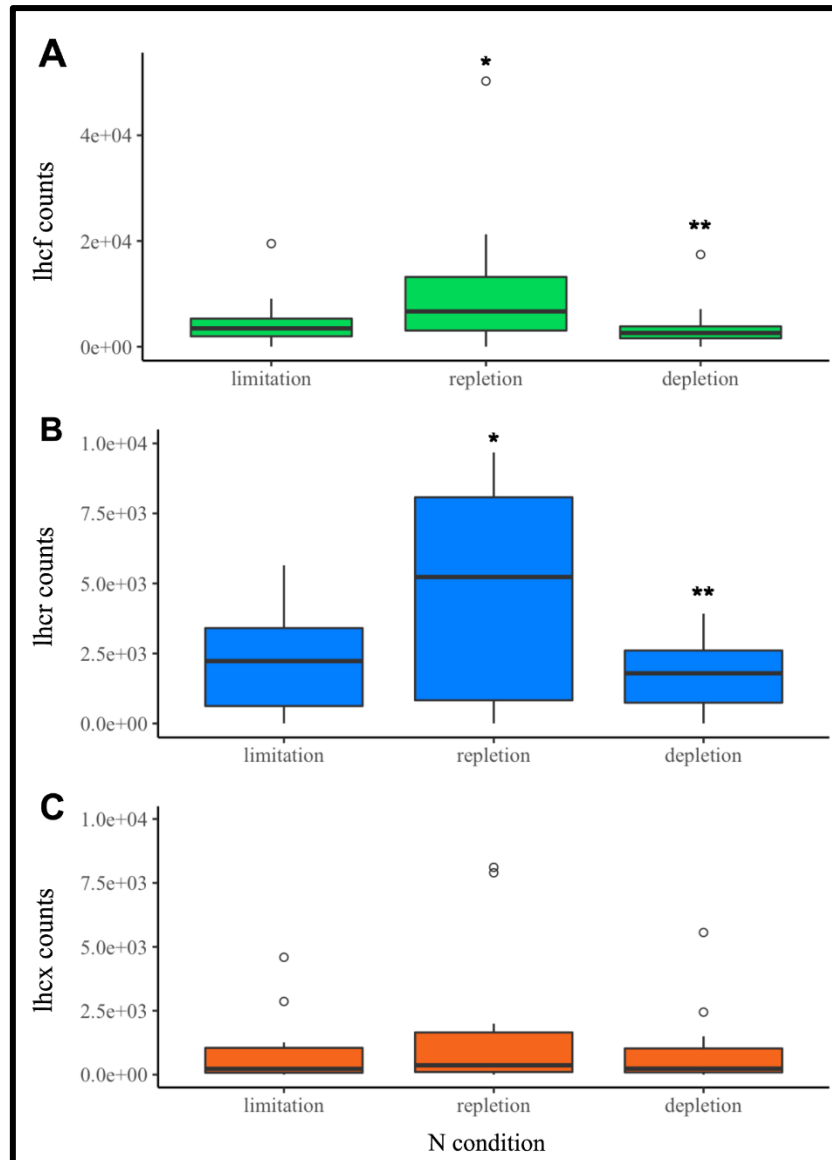


Figure 30. CL experiment. Normalized transcript counts of (A) *lhcf* (green), (B) *lhcr* (blue), (C) *lhcx* (orange) genes according to N status (limitation, repletion, and depletion). Analysis of variance (ANOVA) test: \*p-value < 0.05, \*\*p-value < 0.01.

For 11 *lhcf* genes over 28, 2 *lhcr* genes over 12 and 4 *lhcx* genes over 12, the repletion phase was significantly correlated (DE p-value < 0,05) with an increase of their expression between 1.5

and 4 times than during the limitation phase (Table S17). During the depletion phase, the expression was significantly lower between 3 and 5,5 times less than repletion for 22 *lhcf* genes over 28, 8 *lhcr* genes over 12 and 3 *lhcx* genes over 12, (Table S17).

Looking at the CL experiment, it turned out that in parallel with a lower concentration of the pigments measured, the depletion in N corresponded to the lowest expression of the *lhc* genes.

#### *DL experiment: qN and biomass*

In the DL experiment, the biomass was kept constant between  $1.0 \cdot 10^6$  to  $1.5 \cdot 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> (Figure 31A). qN and Fx content (Fx:C) changed according to N bioavailability in the culture, following a similar pattern as the one the of CL experiment. During the repletion phase, qN followed the light signal (day:night cycles), reaching a minimum and a maximum value respectively at 00:00 h and 12:00 h (Figure 31B). During the depletion, qN was not significantly impacted by light variation and decreased for 24 h before it stabilizing at its minimum value. During the repletion phase, biomass evolved in correlation with the day:night cycles. When the light intensity reached  $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  around 06:00 h, the algal biomass increased until the light intensity was back to  $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at 18:00 h, and it further decreased during the night. However, during the depletion phase, a difference was observed. The biomass correlation with the day:night cycles was less distinct, and the difference of biomass concentration between day and night was reduced.

#### *DL experiment: pigments*

Whatever the N phase of the cultures, Fx content (Figure 31B) and Chl *a* content (Figure S4) increased during the night and decreased during the day. During N depletion though, the day:night cycles influence on Fx, Chl *a* and Ddx (Figure 31C) was minimized as their content were two to three times lower than in repletion. In the contrary, during N repletion, the day:night cycles influence on Dtx content was barely noticeable as it was two times lower than in depletion. Reversely, the Dtx content increased during the day and drastically decreased at night all along the experiment (Figure 31C). It was doubled in depletion compared to repletion. However, the Ddx+Dtx pool decreased in depletion, mainly influenced by the Ddx content.

Overall, these results corroborated those of CL experiment, apart from the Ddx+Dtx pool which decreased during the N depletion phase.

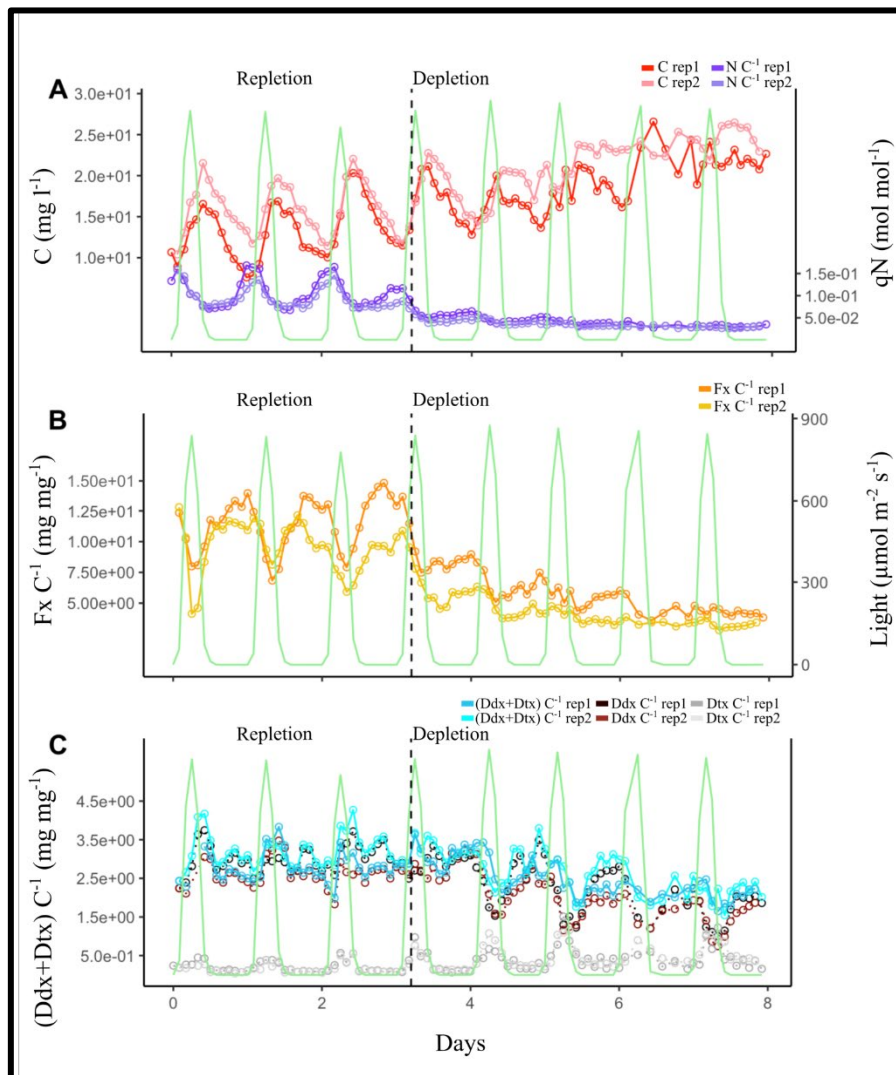


Figure 31. Dynamic light (DL) experiment. The green curve represents photosynthetically active radiation (PAR) during the day:night cycle. (A) Evolution of the cell biomass expressed as total intracellular C and of the qN expressed as intracellular N:C ratio of the two culture replicates. (B) Evolution of the Fx:C ratio of the two culture replicates. (C) Evolution of the photoprotective pigment ratios: (Ddx + Dtx):C, Ddx:C, and Dtx:C of the two culture replicates. Vertical black dashed line marks the transition between the repletion and depletion phases in N.

#### *DL experiment: lhca genes expression*

In DL experiment, the *lhca* expression varied according to both N bioavailability and light intensity (Figure 32). Similarly to CL experiment, gene counts were lower in N depletion than



in repletion phase. It is especially highlighted with gene counts of replicate 1. Also, genes were more expressed in repletion phase compared to CL experiment. All genes counts are available in supporting information (Tables S11-S16).

Most of the genes were up-regulated during the day at 8:00 h and 12:00 h and down-regulated at night (00:00 h) (Figure 32A,B,C). Specifically, *lhcx* genes were significantly up-regulated at 8:00 h than 12:00 h, except for *lhcx2* which was the only one expressed exclusively during the night (Figure 32D, Table S18). Also, *lhcf21* and *lhcr6* were the only *lhcf* and *lhcr* genes to be significantly up-regulated at 8:00 h vs 12:00 h (Table S19).

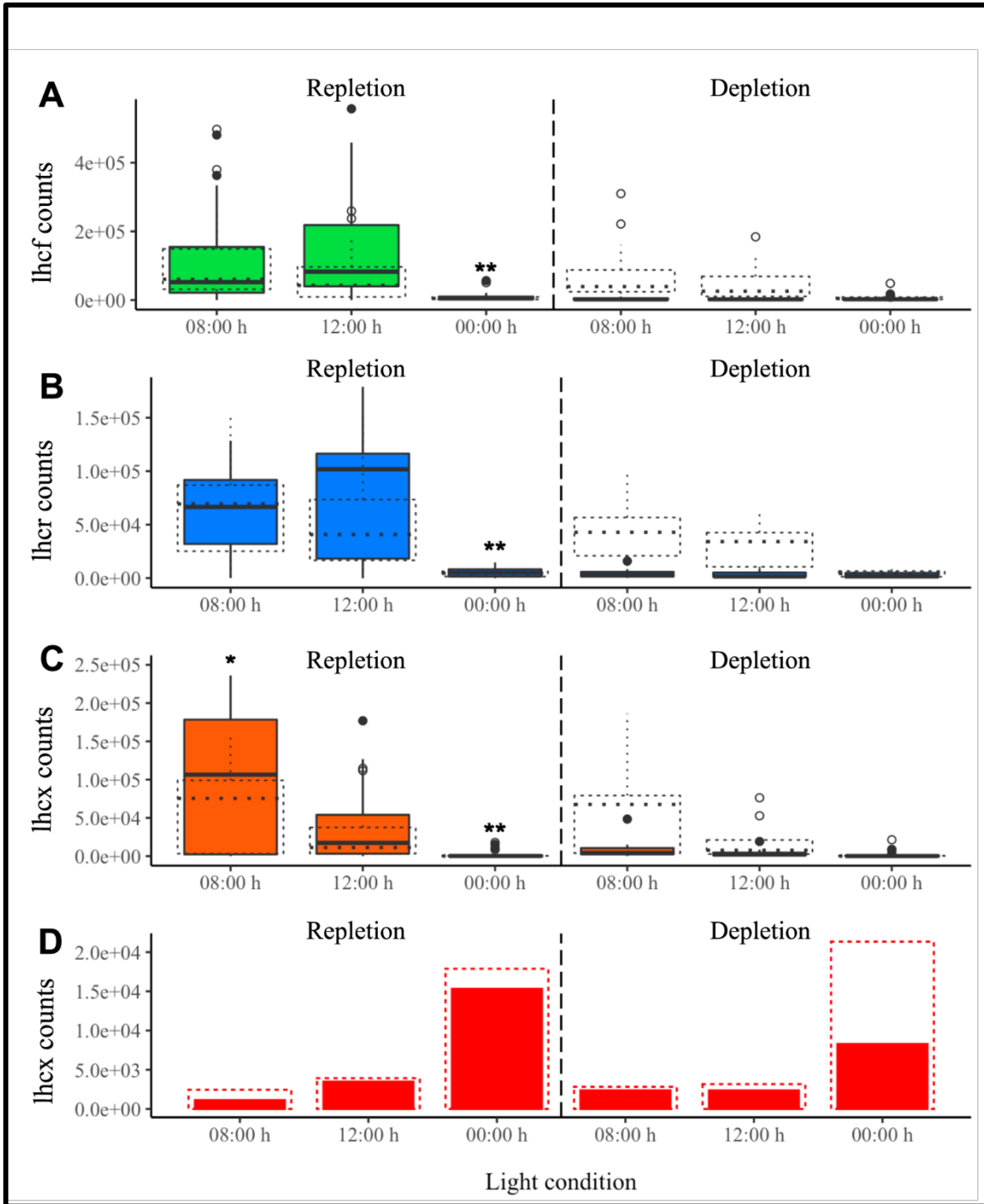


Figure 32. DL experiment. Normalized transcript counts of (A) *lhcf* (green), (B) *lhcr* (blue), (C) *lhcx* (orange) genes and (D) *lhcx2* (red) gene according to N status (repletion and depletion) and day:night cycles. ANOVA test: \*p-value < 0.05, \*\*p-value < 0.01. The experiment was realized in duplicate and represented by solid (replicate 1) and dotted lines (replicate 2). Vertical black dashed line marks the transition between the repletion and depletion phases in N.

The DE analysis reveals that the percentages of up-regulation in repletion phase compared to depletion were similar to CL experiment. However, these results were for replicate 1 only. Indeed, in replicate 2, no *lhc* gene was significantly down-regulated in depletion compared to repletion. We also confirmed that the great majority of the *lhcf*, *lhcr* and *lhcx* genes were significantly up-regulated during the day (Table 7). Another observation was the high percentage of *lhcx* significantly up-regulated at 8:00 h compared to 12:00 h (25%, *lhcx3*, *lhcx11*, *lhcx12*).

**Table 7. percentages of lhcf, lhcr or lhcx genes up-regulated at 8:00 h and 12:00 h in DL experiment**

	Up-regulation of <i>lhc</i> genes		
	At 8 :00 h	At 8 :00 h	At 12 :00 h
	VS 12 :00 h	VS 00 :00 h	VS 00 :00h
<i>lhcf</i>	3.6%	82%	68%
<i>lhcr</i>	8.3%	82%	92%
<i>lhcx</i>	25%	75%	75%

## 5.5. Discussion

### 5.5.1. FCP protein sequences in Chromista species

Only a few annotated FCP sequences were available for haptophytes compared to the data available in literature for other groups of Chromista. The known classification in diatoms supported the annotation of the 52 FCP sequences in the haptophyte *Tisochrysis lutea*. Our results also emphasised the diversification of the Lhcf family: we propose the Lhcf group A mainly composed of haptophytes sequences, the Lhcf group B to be specific to haptophytes, the Lhcf group C to be specific to diatoms and the Lhcf group D to be specific to brown seaweeds. These groups may indicate that the evolutionary distance between diatoms and haptophytes is also reflected in their light harvesting complexes [420]. As the novel group named Lhcq was proposed in diatoms [109,110], it is not excluded that some *T. lutea* sequences pertain to this group. However, there is not enough information so far to confirm it.

Furthermore, our results suggested that three Lhcr in *T. lutea* belong to the *Lhcz* group (Lhcr6, Lhcr10, Lhcr11), defined as a sister clade of Lhcr in Kumazawa et al. (2021). Overall, the *lh* genes in *T. lutea* are 54% *lhcf*, 23% *lhcr* (including *lhcz*), and 23% *lhcx*, while in *E. huxleyi* they are respectively 70%, 9% and 21%. While the proportion of photoprotection-related Lhcx was similar among both species, *T. lutea* overall FCP composition is enriched in PSI-related Lhcr while it is enriched in PSII-related Lhcf in *E. huxleyi*. In parallel, we know that the amount of light harvested by PSII and PSI is determined by the effective absorption cross-sections, respectively  $\sigma_{\text{PSII}}$  and  $\sigma_{\text{PSI}}$ . In two strains of *E. huxleyi*, the ratio  $\sigma_{\text{PSII}}:\sigma_{\text{PSI}}$  was found to be ~0.4-0.5 [432] while in *Isochrysis galbana*, a close species to *T. lutea*, it was found to be ~0.25-0.35 [433]. As  $\sigma_{\text{PSII}}:\sigma_{\text{PSI}}$  is higher in *E. huxleyi*, this could mean that the light-harvesting is more effective in the PSII in *E. huxleyi*, compared with *I. galbana* where it is more effective in the PSI. Supposing that the  $\sigma_{\text{PSII}}:\sigma_{\text{PSI}}$  ratio in *T. lutea* is similar to the one in *I. galbana*, this observation is consistent with the FCP composition of both species.

Possibly this distinction could be linked to a different adaptation to the *in situ* light climate with *T. lutea* originating from an environment with strong light variations, which requires a stronger balance between PSII and PSI photochemistry. In comparison, *E. huxleyi* is found in coastal, temperate continental and cold regions with less harsh light intensity growing conditions [434,435] but still requiring great ability to tolerate different light intensities [436].

#### 5.5.2. Biding sites of chlorophylls and fucoxanthin in Lhcf proteins in *T. lutea*

In the Lhcf of *P. tricornutum*, the most red-shifted Fx306 and Fx307 were directly bound to Chl *c* [105]. Therefore, even if these two candidate sites were found on the Lhcf of *T. lutea*, it is not possible to certify that these Chl effectively bind Fx molecules. This could only be observed with a crystallographic or a cryo-EM study as it was done in *P. tricornutum* [105] and in *C. gracilis* [110]. Amino-acids homologies between *P. tricornutum* and *T. lutea* FCP sequences strongly suggested that *T. lutea* possesses at least 9 Chl *a* or *c* binding-sites among the majority of Lhcf monomers. Most of the Fx binding sites identified in *P. tricornutum* were also found in *T. lutea*, although none of the Lhcf showed all the Fx binding sites identified in *P. tricornutum*. This result suggests the presence of Fx binding sites specific to haptophytes as compared to diatoms. Among the 28 *T. lutea* Lhcf, three of them (Lhcf7, Lhcf11 and Lhcf13) showed a few of the identified Chl and Fx binding sites candidates. It suggests they rather have an important structural role in the light-harvesting spatial organization. In particular, Lhcf13 was the most

expressed in our experiments (Tables S7, S20, S21). These results are to be carefully considered because transcripts could be regulated before translation into protein [437]. Over all, and although the exact oligomeric spatial organization of the light-harvesting system of *T. lutea* remains unknown, sequence comparison with *P. tricornutum* strongly suggested that the light harvesting capacity of haptophytes is similar to the one of diatoms.

### 5.5.3. *lhcf* and *lhcr* expression and fucoxanthin synthesis

#### Influence of N

In *P. tricornutum*, the FCP and the general photosynthesis pathway are down-regulated during a N stress [438]. In *I. galbana*, a close strain of *T. lutea*, it was suggested that the FCP is a constant fraction of the total qN of about 6,8% [411]. Both our experiments showed that qN decreased by up to 1.6 times in N limitation and depletion compared to N repletion. It was therefore consistent to observe, from a N limitation to a N repletion phase, an increase in the expression of the photosynthetic genes *lhcf* and *lhcr*, an increase of Fx content, and a distinct decrease from repletion to depletion. In parallel, photosynthetic pigments content decreased during depletion. These results might indicate the correlation of the binding of Fx and Ddx on Lhcf and Lhcr. Furthermore, they demonstrate the positive influence of an increase of qN on Fx and Ddx content and on the expression of the majority of *lhc* genes, significantly for 34 *lhc* genes including *lhcx*. The DL experiment showed that the Chl *a* content varied similarly to the Fx content (Figure S3). The positive linear correlation between Chl *a* and Fx in *T. lutea* has already been reported in a study [276]. As chlorophylls contain N, contrary to carotenoids, they are positively influenced by N supplementation, which can explain the indirect dependence of Fx on the N concentration in the culture. Furthermore, Chl *a* binds on Lhcf and Lhcr proteins. Therefore, there is a correlation between the N needed for Chl *a* synthesis and the Lhcf and Lhcr proteins needed for the Chl *a* binding.

#### Influence of light

Experiments with a photoperiodic cycle as our DL experiment can reveal the dynamic shift between photosynthesis and photoprotection. In our experiments, we observed that *lhcf* and *lhcr* genes were up-regulated during the day, and were almost not expressed at night, reversely to photosynthetic pigments. On one hand, and as expected, Fx and Ddx content increased with low light intensity to perform photosynthesis even with a few photons. Furthermore, several

studies hypothesized that Ddx is a precursor of Fx synthesis [264,439], enhancing the fact that both pigments evolve simultaneously. On the other hand, the fact that *lhcf* and *lhcr* genes were not up-regulated during the night was unexpected. We supposed that cells synthesized the whole FCP complex during the day, allowing the binding of photoprotective pigments while preparing the need for photosynthetic pigments when the light decreases at night. This shift might explain a trade-off between the need for the photoprotection during the day and the light-harvesting process mainly active at the beginning of the night. When comparing both experiments, *lhc* genes were more expressed in repletion with a day:night cycle than in repletion with a constant light, which indicates that light intensity is a more impacting factor than N for FCP expression.

Finally, qN varying according to NO<sub>3</sub> concentration in the culture medium, along with the light intensity, is partly responsible for the balance between photosynthetic and photoprotective activities of *T. lutea*.

#### 5.5.4. *lhcx* expression, diadinoxanthin and diatoxanthin synthesis

The photoperiodic cycle of the DL experiment allowed to distinguish the photoprotection dynamic between the *lhcx* and the Ddx/Dtx content. At 8:00 h, after two hours of illumination, cells expressed more *lhcx* than at 12:00 h. In parallel, we observed that the Dtx content was higher during the day, corroborating its role in photoprotection. These results were in line with what was found in diatoms with the increase, under high light, of the Dtx content in *Cyclotella meneghiniana* [118], of both the Dtx content and L1818-like proteins (also referred as Lhcx) in *T. pseudonana* [119], of the Ddx+Dtx pool and three *lhcx* in *P. tricornutum* [120], of the Ddx+Dtx pool and the synthesis of Lhcx2 and Lhcx3 in *P. tricornutum* [116,440]. Furthermore, a tryptophan residue located closely to the Ddx/Dtx binding site of Lhcx was characterized as involved in the energy-dependent fluorescence quenching (qE) in *P. tricornutum*, a photoprotection mechanism [441]. Dtx results from the de-epoxidation of Ddx, it was therefore consistent to observe that Dtx content was reversely symmetrical to Ddx content in both our experiments. However, even under maximum light intensity, Ddx was not entirely de-epoxidized in Dtx, highlighting its double role as photosynthetic and photoprotective pigment [442]. Overall, the Ddx+Dtx pool increased with light intensity in repletion as what was found in *Cyclotella meneghiniana* when applying high light [413], supporting the main photoprotective role of these pigments. Finally, *T. lutea* cells seemed to activate their

photoprotection mechanisms to endorse the light onset without risking the deterioration of cellular mechanisms.

Similarly, in *C. meneghiniana*, proteins encoded by one *lhcx* named *fcp6/7* were more present under HL conditions [118,412,413]. In addition, *lhcx2* in *P. tricornutum* was strongly up-regulated when exposed to a constant 48 h HL, whereas *lhcx3*, *lhcr6* and *lhcr8* were strongly up-regulated after 0.5 h of HL but slightly decreased during the last 47.5 h of HL [414]. It suggested a photoprotective role followed by an acclimation to HL for *lhcx3* but also for *lhcr6* and *lhcr8*. According to our BLAST results, the corresponding Lhcr6 and Lhcr8 proteins in *P. tricornutum* had the highest similarity scores with Lhcr5 and Lhcr6 in *T. lutea* respectively. The corresponding *lhcr6* gene in *T. lutea* was the only *lhcr* significantly up-regulated at 8:00 h vs 12:00 h, along with *lhcf21*. Others *lhcr* were not up-regulated in HL neither in *T. lutea* nor in *P. tricornutum* [414]. Lhcr6 protein in *T. lutea*, in addition with Lhcf21 and the Lhcx, could therefore participate in the binding of photoprotective pigments or play a structural role in the FCP conformation for photoprotection under HL, like Lhcx1 in *T. pseudonana* [119,443]. Furthermore, Lhcr6 and Lhcr10 could also be classified as Lhcz (Table S7), which might highlight the potential photoprotective function of the Lhcz. Indeed, although *lhcr10* was not significantly up-regulated at 8:00 h, its p-value of 0.0512 was close to the 0.05 threshold.

In *T. lutea*, *lhcx2* was the only gene up-regulated at night. It is known the Lhcx4 protein in *P. tricornutum* is also more synthesized at night [115,117,120,444]. Furthermore, in transcriptomics analysis, *lhcx4* was barely expressed under HL [414], but there was no clear explanation about its function yet. A hypothesis is that Lhcx4 could protect from the return of the light after a prolonged darkness exposure. We can suppose the Lhcx2 protein in *T. lutea* plays the same role.

## 5.6. Conclusion

We characterized the FCP of *Tisochrysis lutea* for the first time, in three ways. Initially, 52 *lhcr* genes were annotated. We classified the genes into 3 families *lhcf*, *lhcr*, *lhcx*, as for diatoms. We also identified the Lhcz sub-group within the Lhcr clade of *T. lutea*. Furthermore, we do not exclude the existence of a novel group found in diatoms named Lhcq, whose function is unknown so far. Then, we evaluated the light-harvesting capacities of *T. lutea* by locating pigment binding domains in Lhcf proteins monomers, which are likely to be homologous to

those of *P. tricornutum*. Finally, we investigated the expression of the *lhc* genes. The study of a dynamic photoperiodic cycle and of a dynamic N intake within the culture of *T. lutea* demonstrated a very sensitive dynamic of both photosynthetic and photoprotective pigments, along with a clear difference of the *lhc* genes expression.

### **5.7. Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge Ifremer and the Region Pays de la Loire (France) for the PhD grant of Anne Pajot. The authors acknowledge the support of the Inria Project Lab program *Algae in Silico* for the DL experiment and Jérémy Berthelier, Aurélie Charrier, Catherine Rouxel, Nathalie Schreiber, Ewa Lukomska for their participation to the design and the sampling of both experiments.





---

# CHAPITRE 3

---

Les stratégies de photoprotection chez  
*Tisochrysis lutea*



## Chapitre 3 – Les stratégies de photoprotection chez *Tisochrysis lutea*

Ce chapitre présente un résumé des résultats valorisés dans l'article « *Light-response in two clonal strains of the haptophyte Tisochrysis lutea: evidence for different photoprotection strategies.* » (soumis dans le journal *Algal Research* le 26 août 2022, ALGAL-D-22-00647, révisé et re-soumis le 20/10/2022). Il comporte des précisions sur le matériel et les méthodes utilisés, un résumé des résultats principaux décrits dans l'article et d'autres résultats complémentaires obtenus. L'article est présenté en fin de chapitre et les données supplémentaires sont présentées en annexe (Annexe II).

### 1. Contexte et objectifs

Les travaux présentés dans le chapitre 2, nous ont permis de décrire le fonctionnement du système de capture de la lumière chez *T. lutea*, soit le début de la photosynthèse, et la synthèse de molécules d'intérêt telle que la fucoxanthine par cette espèce. L'étude des mécanismes de photoprotection est également nécessaire afin de mieux comprendre comment les cellules de *T. lutea* effectuent l'équilibre nécessaire entre l'activité photosynthétique d'une part, et photoprotective d'autre part lorsque la lumière est présente en excès. Cela permet d'améliorer la maîtrise de la culture de cette microalgue. Dans cette partie, nous avons exploré la réponse physiologique des cellules de *T. lutea* à leur environnement lumineux et avons tenté d'apporter des nouvelles connaissances sur le fonctionnement du photosystème chez cette espèce.

Pour comprendre les mécanismes de photoprotection, deux souches clonales de *T. lutea* ont été sélectionnées pour leur différente composition pigmentaire, notamment les pigments photoprotecteurs. Lorsque cultivées dans les mêmes conditions, la souche clonale T-5cl6 synthétise une grande quantité de Ddx et Dtx tandis que la souche clonale T-4cl3 synthétise de l'échinénone. Ces différences ont été montrées lors d'un précédent projet ANR du laboratoire nommé DynAlgue, qui a montré la première étude de génétique des populations de *T. lutea*. Ce projet a généré plus de 100 souches clonales de *T. lutea* qui ont été phénotypées pour leurs compositions en lipides et en caroténoïdes. L'objectif général de cette étude était de comprendre comment deux stratégies de photoprotection potentiellement différentes étaient exprimées chez les deux souches clonales T-5cl6 et T-4cl3. En mettant en place des

cultures en turbidostat, nous avons étudié la réponse physiologique des algues aux changements d'intensité lumineuse (ou irradiance), soit la photoacclimatation.

## 2. Matériel et Méthodes

Les deux souches clonales T-4cl3 et T-5cl6 (clone 3 de la souche RCC1344 et clone 6 de la souche Ifremer-Argenton respectivement) ont été soumises à différentes intensités lumineuses de 50, 150, 300 et 550  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ . Des mesures de la fluorescence de la Chl *a* ont été réalisées, appelées  $F_v/F_m$ . Le  $F_v/F_m$  est le rendement quantique maximal de la photosynthèse, c'est à dire le pourcentage d'énergie absorbée qui est utilisée pour la photosynthèse. En parallèle, l'analyse de la composition pigmentaire et du niveau de transcription de certains gènes spécifiques a été effectuée. En plus des gènes codant pour la FCP (*lhcx*, *lhcx*, *lhcr*), l'expression de plusieurs gènes candidats codant pour la Ddx dé-époxydase (DDE), la Vx dé-époxydase (VDE) et la Zx époxydase (ZE) a été mesurée. C'est la première fois que ces gènes ont été annotés et caractérisés chez *T. lutea*.

### 2.1. Turbidostat

Cette section a pour objectif de détailler la mise en place des cultures de *T. lutea* en turbidostat (Figure 33). Comme précisé dans l'introduction (Chapitre 1, section 1.3.4.), un turbidostat est un mode de culture en continu à turbidité constante, soit à densité cellulaire constante. Lorsque la culture dépasse le seuil de turbidité qui a été préalablement fixé, correspondant à une densité cellulaire spécifique, du milieu de culture frais est ajouté dans le photobioréacteur afin de diluer la culture. Le taux d'ajout des nutriments, présents dans le milieu de culture, varie donc en fonction du taux de dilution de la culture. Ce dernier diffère selon le taux de croissance des cellules, qui est majoritairement influencé dans cette expérience par l'irradiance incidente sur le photobioréacteur.



**Figure 33. Photo du triplicat de culture d'une souche de *T. lutea* en turbidostat.**

Trois photobioréacteurs de 3.5 L ont été utilisés pour cette expérience. Conçus au laboratoire, ils sont composés de deux colonnes transparentes de polyméthylmétacrylate (PMMA) de 60 mm de diamètre (Figure 34), connectées entre elles par une bride inférieure et une bride supérieure. Du fait du matériau PMMA, ces photobioréacteurs ne sont pas autoclavables. Un processus de stérilisation par action de l'acide peracétique est donc nécessaire. Une fois remplis d'eau de mer filtrée et enrichis avec du milieu de Conway, les photobioréacteurs ont été inoculés avec *T. lutea*. La lumière blanche est délivrée à l'aide de six tubes fluorescents donc l'intensité est modulable. Les photobioréacteurs ont été constamment aérés et agités par un bullage hélicoïdal depuis la base de la colonne de droite, créant un courant de sens anti-horaire. La température a été réglée à l'intérieur des photobioréacteurs à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  par un circuit d'eau fermé dans un doigt de gant (Figure 34). Le pH a été mesuré avec une sonde et réglé à 8.2 par l'apport de  $\text{CO}_2$  (Figure 34). La turbidité de chaque photobioréacteur, relative à la densité cellulaire, a été mesurée à l'aide d'un capteur de densité optique (voir section 2.2), qui a commandé l'action d'une pompe. Cette dernière a permis d'ajouter du milieu de culture frais contenu dans une poche de 20 L, sous chaque photobioréacteur (Figure 34). La densité cellulaire fixée était entre 1.5 et 2 millions de cellules par mL. Les poches de milieu de culture ont été remplies de manière stérile en injectant du milieu de Conway à  $1 \text{ mL.L}^{-1}$  puis en ajoutant

de l'eau de mer filtrée sur 0.2  $\mu\text{m}$ . Les poches ont pu être remplies plusieurs fois successivement. Chaque poche a ensuite été connectée à la pompe qu'il a fallu amorcer. Lors de l'ajout de milieu, le photobioréacteur se diluait en déversant de la culture par une surverse dans un bac de récolte (Figure 34). Ce bac de récolte était régulièrement pesé pour mesurer le taux de dilution et donc le taux de croissance.

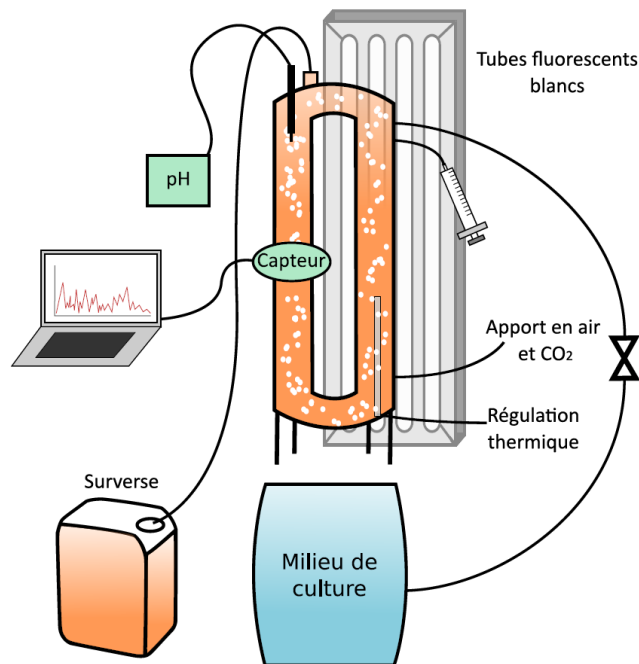


Figure 34. Schéma détaillé de la mise en place d'une culture continue en turbidostat.

## 2.2. Fabrication des capteurs de densité optique

### 2.2.1. Composition des capteurs

Afin de suivre et réguler en continu la densité cellulaire, soit la turbidité des cultures, des capteurs de densité optique ont été utilisés pour chaque triplicat de culture. Ils ont été précédemment conçus et développés au laboratoire et optimisés puis fabriqués pendant cette thèse. Le capteur circulaire est constitué de deux parties en demi-cercle, une partie émettrice et une partie réceptrice, qui s'assemblent en cercle autour d'une des colonnes du photobioréacteur (Figure 35).

La partie émettrice (Figure 36A) est composée d'une carte électronique sur laquelle sont assemblées trois LEDs (diode électroluminescente : bleue, rouge, infrarouge). La partie

réceptrice (Figure 36B) est composée d'une carte électronique comprenant une photodiode, diverses résistances et un amplificateur. Les LEDs et la photodiode se font donc face en entourant la colonne du photobioréacteur (Figure 37). Les schémas de fabrication des capteurs sont disponibles en annexe (Annexe I).

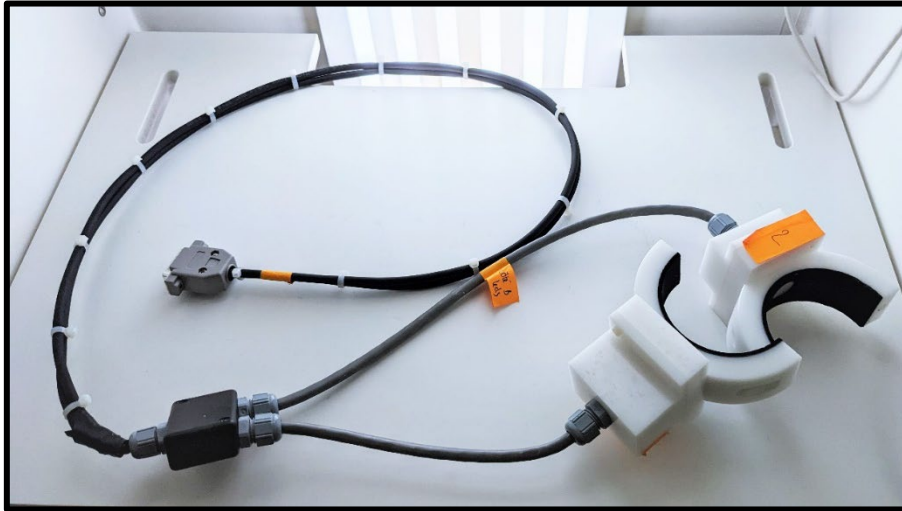


Figure 35. Capteur de densité optique entier.

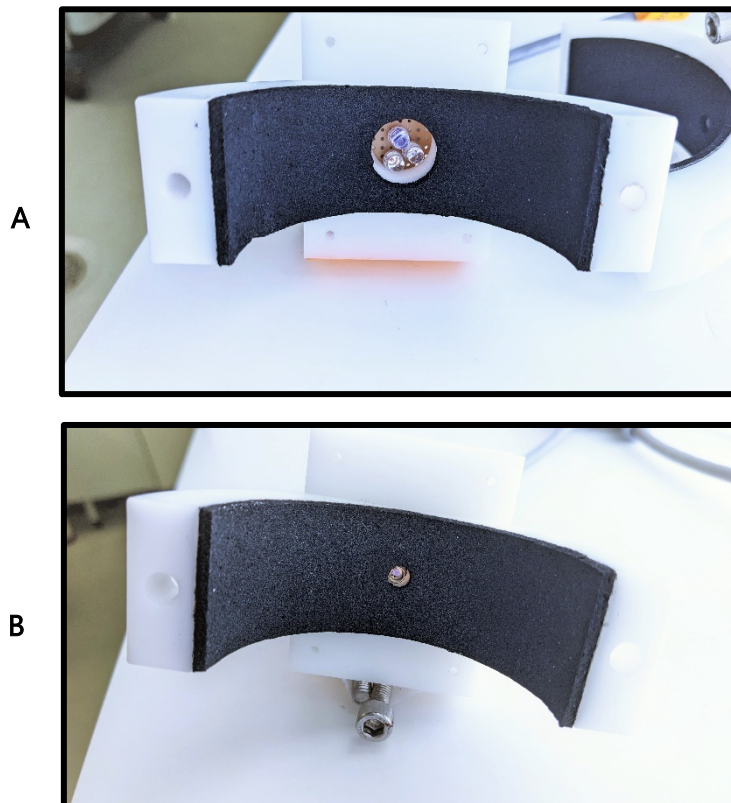


Figure 36. Partie émettrice (A) et partie réceptrice (B) du capteur de densité optique.



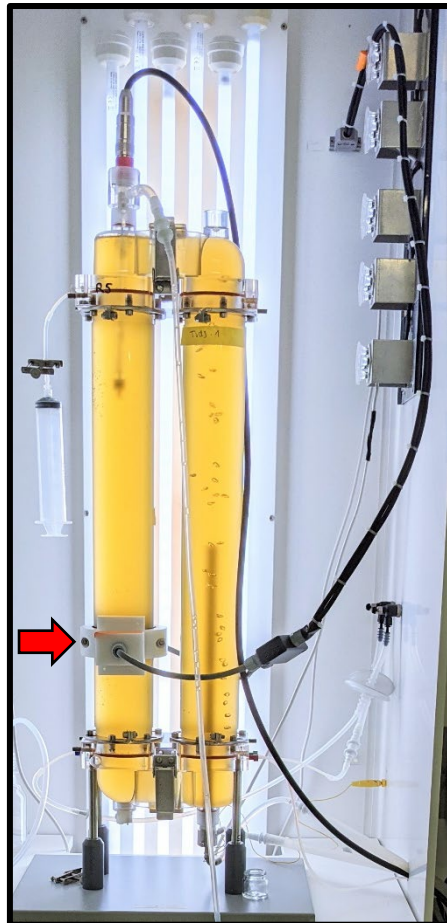


Figure 37. Positionnement du capteur de densité optique autour d'une colonne du photobioréacteur

### 2.2.2. Principe de fonctionnement

Les LEDs envoient un signal lumineux que reçoit la photodiode de l'autre côté de la colonne du photobioréacteur. Le signal reçu par la photodiode est appelé signal de sortie. Une consigne est appliquée à la photodiode avec une valeur fixe du signal de sortie qu'elle doit recevoir. En conséquence, les LEDs s'allument, elles envoient un signal lumineux appelé signal d'entrée, qui doit être suffisamment élevé pour atteindre la consigne du signal de sortie sur la photodiode. Le signal d'entrée peut donc varier en fonction de la turbidité de la culture. Si la densité cellulaire augmente, la turbidité augmente, donc les LEDs doivent envoyer un signal lumineux plus élevé pour atteindre la consigne. À la densité souhaitée, soit à la turbidité souhaitée, le signal d'entrée des LEDs est enregistré comme une consigne d'entrée. Lorsque la concentration cellulaire de la culture augmente encore, la turbidité de la culture augmente également, la consigne d'entrée est alors dépassée. Ce dépassement déclenche une pompe qui permet

d'apporter du milieu de culture dans le photobioréacteur afin de diluer la culture jusqu'à ce que la consigne d'entrée soit à nouveau atteinte.

Pour une même densité cellulaire, la consigne d'entrée peut varier. Le signal lumineux envoyé par les LEDs n'est pas seulement impacté, lors de sa traversée jusqu'à la photodiode, par la concentration en cellules, mais également par leur contenu en chlorophylle. En effet, des cellules cultivées à faible lumière vont contenir plus de chlorophylle, la lumière bleue va alors être plus absorbée. Inversement pour les cellules cultivées à forte lumière, qui posséderont moins de chlorophylle, la lumière bleue sera moins absorbée, le signal lumineux sera plus faible, la consigne d'entrée sera donc plus faible pour une même densité cellulaire.

La fabrication et la mise en fonction des trois capteurs de densité optique fut un véritable challenge. Il a fallu dans un premier temps découper puis équiper les cartes électroniques composés des LEDs et de la photodiode, ainsi que les cartes des boîtiers de connexion (les pièces circulaires étant déjà disponibles au laboratoire). Puis, tous les fils ont été soudés à la fois sur le boîtier de connexion et sur l'embase, élément permettant de relier les capteurs au système d'acquisition du photobioréacteur. Ensuite, il a fallu configurer et programmer le logiciel permettant l'acquisition des données fournies par le capteur et l'application des consignes sur les signaux d'entrée et de sortie. Après de nombreuses difficultés et le retard généré par les confinements successifs pendant la crise sanitaire, les capteurs furent finalement fonctionnels et sont aujourd'hui toujours utilisés au laboratoire pour des cultures en continu.

### 3. Résultats et Discussion

#### 3.1. Résultats principaux

##### 3.1.1. Les différentes stratégies de photoprotection des souches de *T. lutea*

Les deux souches clonales de *T. lutea*, T-5cl6 et T-4cl3, ont été cultivées dans les mêmes conditions d'irradiance, de température, de pH, de nutriments et à la même concentration cellulaire. Chez les deux souches, la forte corrélation entre le contenu en Dtx et le  $F_v/F_m$  (Figure 41) a souligné l'implication de la Dtx dans la dissipation de l'énergie lumineuse en excès, donc dans la photoprotection. La souche T-5cl6 était associée à un contenu en Ddx, Dtx, Vx et Zx plus élevé que la souche T-4cl3 (Figure 41, Figure 42). Ces résultats ont donc indiqué que la stratégie de photoprotection de T-5cl6 était principalement basée sur l'utilisation des cycles

de pigments xanthophylles Ddx-Dtx et Vx-Zx. Bien que T-4cl3 utilisait également le cycle Ddx-Dtx, dans une moindre mesure par rapport à T-5cl6, sa stratégie s'est distinguée par la synthèse d'échinénone à partir de 150  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  (Figure 43). Ce résultat est remarquable, c'est en effet la première fois que la synthèse d'échinénone par une microalgue haptophyte due à l'augmentation de l'intensité lumineuse est démontrée. Jusqu'ici, il avait été montré que *T. lutea* (souche CCAP 927/14) produisait de l'échinénone dans des conditions de carence en N. L'échinénone est habituellement retrouvée chez les cyanobactéries, c'est un pigment qui permet d'éliminer les radicaux libres oxygénés (ROS) [445]. Le schéma présenté en Figure 38 met en évidence les différences de contenu en pigments photosynthétiques chez les deux souches T-5cl6 et T-4cl3.

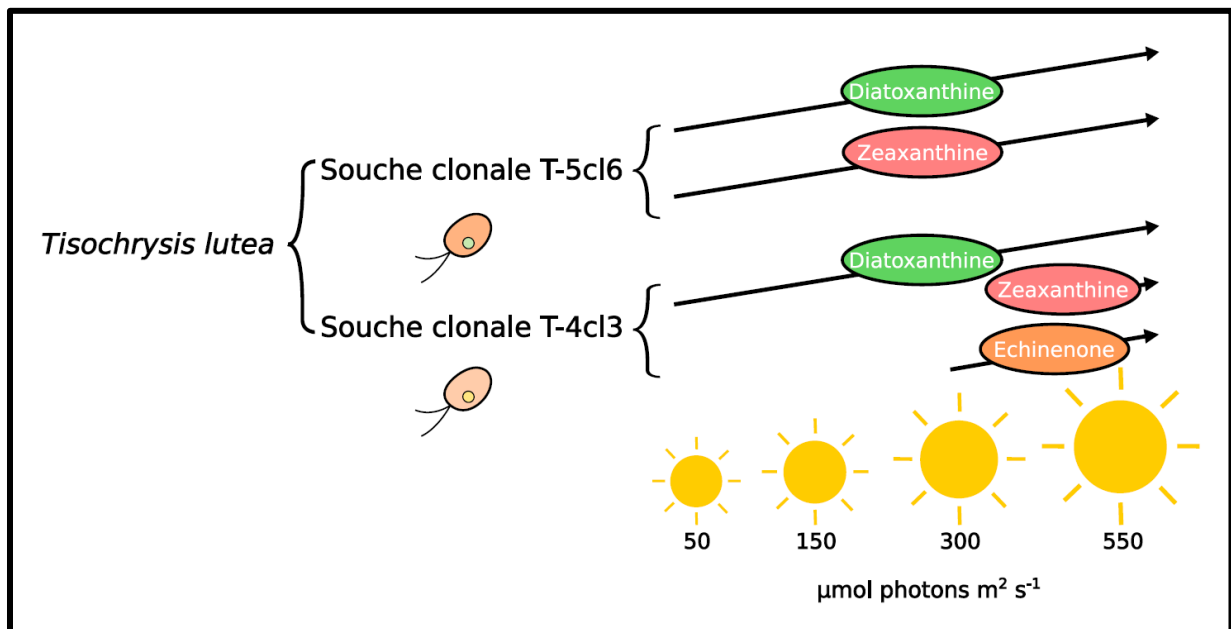


Figure 38. Evolution du contenu en pigments photoprotecteurs chez deux souches de *T. lutea* en fonction de l'irradiance.

### 3.1.2. Les enzymes dé-époxydases et époxydases chez *T. lutea*

Dans cette étude, des gènes candidats codant pour la DDE et la VDE ont pour la première fois été caractérisés chez *T. lutea*. Ils ont été annotés respectivement DDE\_L, VDE\_L1 et VDE\_L2 (L signifiant « like »). Ces gènes résultent de la recherche de similarité entre le génome de *T. lutea* et des séquences annotées dans la littérature : 19 gènes VDE parmi 5 espèces de diatomées, 10 gènes VDE parmi 2 espèces d'haptophytes, 1 gène DDE d'une diatomée. Par ailleurs, VDE\_L1 chez *T. lutea* a le meilleur score de similarité avec le gène VDL2 (Vx de-epoxydase-like) de *P. tricornutum* (identification du gène : PHATR DRAFT\_45846), qui code pour

une enzyme ayant récemment été démontrée comme centrale dans la voie de biosynthèse de la Fx dans une étude par Bai et al. (2022) [174]. Cette étude suggère que la Ddx serait également un substrat de l'enzyme VDL2, en plus de la Vx donc. VDL2 serait en effet capable de catalyser la réaction de tautomérisation (isomérisation d'une fonction moléculaire) de la Ddx en allénoxanthine, ces deux pigments étant des précurseurs clés de la Fx [174]. De plus, il est précisé que l'enzyme VDL2 est très probablement soumise à une régulation stricte chez les diatomées et les haptophytes, de sorte à ce que la Ddx puisse jouer à la fois son rôle de précurseur du pigment photosynthétique majeur qu'est la Fx, et son rôle dans la photoprotection au sein du cycle Ddx-Dtx.

De même, le gène ZE\_L a été caractérisé pour la première fois chez *T. lutea* suite à la recherche de similarité entre le génome de *T. lutea* et les séquences annotées dans la littérature : 10 gènes ZE issus de 4 espèces de diatomées, 7 gènes ZE issus de 2 espèces d'haptophytes. Plus particulièrement, il a été montré que le gène ZEP1 (zeaxanthin epoxydase) chez *P. tricornutum* (identification du gène : PHATRDRAFT\_45845), codait également pour une enzyme centrale dans la voie de biosynthèse de la Fx [174]. Ce gène présentant un score de similarité élevé avec ZE\_L chez *T. lutea*, on suppose que son rôle, en plus de l'époxydation de la Zx, est également central dans la biosynthèse de Fx chez notre espèce modèle et chez les haptophytes de manière générale.

Chez *T. lutea*, le suivi de l'expression de DDE\_L, VDE\_L1, VDE\_L2 et ZE\_L en fonction de l'irradiance a permis de corréliser leur transcription aux différentes stratégies de photoprotection de T-5cl6 et T-4cl3, et d'émettre des hypothèses sur leur fonction. La dé-époxydation de la Ddx était plus élevée chez T-5cl6 que chez T-4cl3 (Figure 41) et en parallèle, l'expression du gène DDE\_L était plus élevée chez T-5cl6 que chez T-4cl3 aux quatre irradiances testées.

De même, en plus de l'augmentation de son expression avec l'augmentation de l'irradiance, VDE\_L1 était plus exprimé chez T-5cl6 que chez T-4cl3. Ce résultat est corrélé au taux de dé-époxydation de la Vx en Zx supérieur chez T-5cl6. La protéine correspondant à VDE\_L1 est associée avec une activité de dé-époxydation de la Vx d'après Interproscan (logiciel d'analyse fonctionnelle de protéines) [446]. En plus de cette fonction, la protéine correspondant à VDE\_L2 est associée à une famille de protéines transmembranaires, les canaux potassiques voltage-dépendants. Ces complexes permettent le passage des ions  $K^+$  en réponse aux changements de potentiel membranaire. Le changement de potentiel de la membrane du chloroplaste est

un mécanisme connu de l'équilibre entre photosynthèse et photoprotection. À forte lumière, le pH du lumen du chloroplaste change, ce qui permet d'activer les cycles des pigments xanthophylles comme le cycle Vx-Zx lors d'un excès de lumière.

La réaction inverse de la dé-époxydation est l'époxydation, effectuée par les enzymes époxydases. Plus l'irradiance augmente, moins il y a de réactions d'époxydation. L'expression du gène ZE\_L diminue avec l'augmentation de l'irradiance, et pourrait donc correspondre à une diminution de la synthèse de l'enzyme Zx époxydase.

Les hypothèses sur les fonctions de ces quatre gènes ont été appuyées par des analyses de similarité avec des gènes connus effectuées avec l'outil BLAST, ainsi que par l'analyse fonctionnelle de domaines protéiques avec Interproscan (voir les détails dans la section 1).

### 3.1.3. Le NPQ soutenu chez *T. lutea*

Lors des prélèvements, les cultures ont été soumises à deux heures d'obscurité afin de mesurer le  $F_v/F_m$ . Cette mesure a été utilisée comme proxy du relâchement du NPQ chez *T. lutea*. À l'obscurité, les cellules n'ont plus besoin d'effectuer la photoprotection, le NPQ se relâche, il y a plus d'énergie disponible pour effectuer la photosynthèse, le  $F_v/F_m$  augmente chez les deux souches. En revanche, la totalité de la Dtx ne s'est pas re-époxydée en Ddx même après deux heures d'obscurité, en particulier chez T-5cl6. Cela signifie que le NPQ est « soutenu » [447]. Cette forme de NPQ pourrait être complémentaire au NPQ dit *energy-dependent* (qE), et pourrait faire partie de la stratégie de photoprotection de T-5cl6 en permettant aux cellules de répondre rapidement à une augmentation de l'intensité lumineuse.

### 3.1.4. Le rôle des *lhcx* chez *T. lutea*

Le suivi de l'expression des gènes *lhcx* chez les deux souches a permis de distinguer deux sous-groupes de *lhcx*. Les gènes *lhcx1*, *lhcx4*, *lhcx8* et *lhcx11* sont des acteurs majeurs du NPQ chez *T. lutea*. Les protéines associées sont probablement celles fixant le maximum de Dtx dans l'antenne collectrice de lumière. Comme les niveaux d'expression sont similaires chez les deux souches mais que le NPQ est plus important chez T-5cl6, c'est probablement la traduction de ces gènes *lhcx* en protéines qui expliquerait la différence de NPQ. Deux gènes *lhcr*, *lhcr5* et *lhcr6*, semblent également être impliqués dans la photoprotection.

Au contraire, les gènes *lhcx2* et *lhcx5* étaient les seuls à être moins exprimés lors de l'augmentation de l'irradiance, et étaient particulièrement exprimés à faible irradiance. Il est possible que la fonction de ces gènes soit de répondre à une potentielle augmentation de l'irradiance pendant une période d'acclimatation à faible luminosité. Ces gènes étant les plus exprimés chez les deux souches, ils pourraient également jouer un rôle structurel important au sein de la FCP chez *T. lutea*.

## 3.2. Résultats complémentaires : Les facteurs de transcription des gènes

### lhc

Ces résultats sont complémentaires à ceux décrits précédemment et ne sont pas présents dans l'article.

#### 3.2.1. Identification des facteurs de transcription

Phatr3\_EG02570 (et son orthologue Phatr3\_EG01922) est un facteur de transcription de la famille des MYB (myeloblastosis), impliqué dans la régulation des gènes *lhc* chez *P. tricornutum* [448]. Les gènes MYB sont des facteurs de transcription connus chez les animaux et les plantes. Une recherche de similarité avec l'outil BLAST a été effectuée entre Phatr3\_EG02570 et le génome de *T. lutea*.

Parmi les cinq résultats BLAST, trois gènes étaient déjà annotés comme facteurs de transcription MYB chez *T. lutea* dans une précédente étude (MYB-rel\_11, MYB-2R\_2, MYB-3R) [449]. MYB-rel\_11 est lié à la photosynthèse tandis que MYB-3R est un candidat intéressant pour la régulation du contenu en lipides dans les cellules [449]. Dans cette précédente étude, deux autres facteurs de transcription sont également liés à la photosynthèse, MYB-2R\_20 et MYB-2R\_14, respectivement TISO\_17672 et TISO\_11956. Bien qu'ils ne soient pas issus de la recherche de similarité avec *P. tricornutum*, il a été décidé de les prendre en compte. Les sept gènes ont été analysés avec Interproscan, les résultats sont résumés dans le Tableau 8.

Les deux autres gènes issus de la recherche de similarité, TISO\_00361 et TISO\_14959 n'appartiennent pas à la famille MYB selon Interproscan. Cependant, TISO\_00361 possède une fonction moléculaire de liaison à l'ADN et trois domaines MYB. Sachant que la fonction d'un facteur de transcription est de réguler la transcription en se liant à des séquences d'ADN spécifiques, nous avons présumé que le gène TISO\_00361 est un facteur de transcription MYB,

il est nommé MYB-rel\_1. TISO\_14959 ne possède pas de fonction moléculaire de liaison à l'ADN selon Interproscan, mais sa séquence contient également des domaines MYB ; il a donc également été considéré comme un facteur de transcription MYB, il est nommé MYB-rel\_5. *T. lutea* pourrait donc posséder jusqu'à cinq facteurs de transcription des gènes *lhc*.

**Tableau 8. Facteurs de transcription des gènes *lhc* chez *T. lutea***

Name	Précédente annotation	Résultats Interproscan		
		Famille de protéines	Fonction moléculaire	Domaines
TISO_00361	n/a	n/a	DNA binding (GO :0003677)	Myb domains (IPR001005) (IPR017930) (IPR006447)
33128	Transcription_factor_MYB-rel_11	n/a	n/a	Myb domains (IPR001005) (IPR017930)
01406	Transcription_factor_MYB-2R_2	Myb-related protein B (IPR028311)	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific (GO:0000981)	Myb domains (IPR001005) (IPR017930)
17552	Transcription_factor_MYB-3R	n/a	n/a	Myb domains (IPR001005) (IPR017930)
14959	n/a	n/a	n/a	Myb domains (IPR001005) (IPR017930)

17672	Transcription_factor_MYB- 2R_20	n/a	n/a	Myb domains (IPR001005)  (IPR017930)
11956	Transcription_factor_MYB- 2R_14	n/a	n/a	Myb domains (IPR001005)  (IPR017930)

### 3.2.2. Expression des facteurs de transcription en fonction de l'irradiance

Parallèlement à la diminution de l'expression de cinq facteurs de transcription (MYB-rel\_11, MYB-2R\_2, MYB-3R, MYB\_rel\_5 et MYB-2R\_20) (Figure 39), l'expression de la majorité des gènes *lhcr* et de tous les gènes *lhcf* a également significativement diminué avec l'augmentation de l'irradiance chez T-5cl6 (Figure 39). Au contraire, l'expression de cinq gènes *lhcx* a augmenté tandis que celle de trois autres gènes *lhcx* a diminué. Nous émettons l'hypothèse que ces cinq facteurs de transcription ont la fonction d'activer la transcription de la majorité des gènes *lhcr* et *lhcf*, et trois *lhcx* (*lhcx2*, *lhcx5* et *lhcx7*), et/ou d'inhiber la transcription de cinq gènes *lhcx* (*lhcx1*, *lhcx3*, *lhcx4*, *lhcx8*, *lhcx11*) (Tableau 9).

Chez T-4cl3, MYB-rel\_5 en particulier était le moins exprimé à 150 PPF, tandis qu'à 300 et 550  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  son expression était similaire. L'expression de MYB-rel\_5 semble être l'exacte symétrie des huit *lhcx* étant remarquablement sur-exprimés à 150  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  chez T-4cl3. MYB-rel\_5 semble donc avoir pour fonction d'inhiber l'expression d'une majorité de *lhcx* chez T-4cl3 et probablement également chez T-5cl6 (Tableau 9). Comme il s'agit du seul facteur de transcription régulé négativement à 150  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ , il est possible que MYB-rel\_5 soit le principal facteur de transcription régulant les gènes *lhcx* (Tableau 9).

Une autre observation notable était l'absence d'expression de MYB-2R\_14 chez T-5cl6. Parmi les 52 gènes *lhcr* chez *T. lutea*, un seul *lhcx* n'était presque pas exprimé chez T-5cl6 (*lhcx6*). De plus, l'évolution de l'expression de *lhcx6* étant similaire à celle du gène MYB-2R\_14, une corrélation directe est suggérée entre ces deux gènes. MYB-2R\_14 semble activer spécifiquement la transcription de *lhcx6* (Tableau 9).



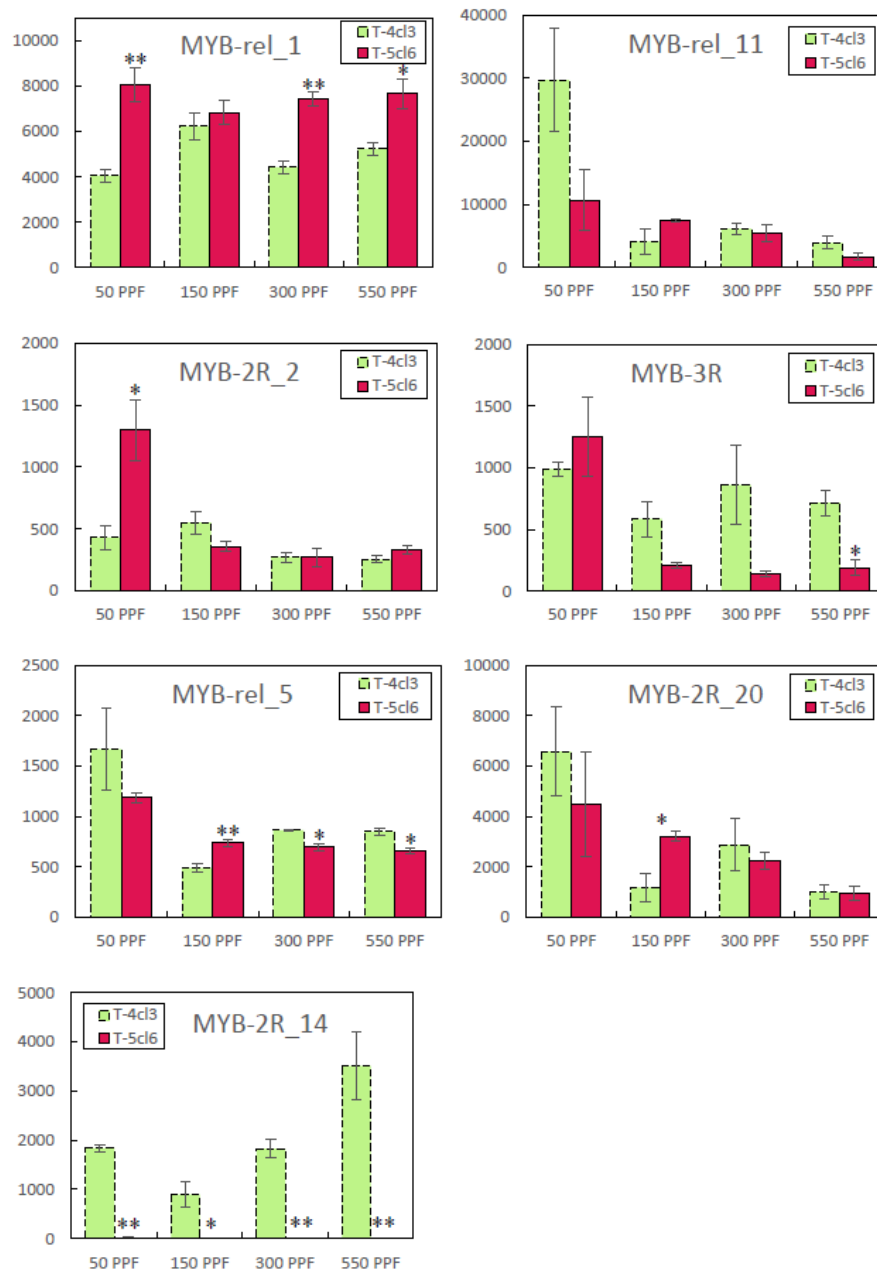


Figure 39. Évolution du nombre de transcrits normalisés des facteurs de transcription lh (moyenne ± intervalle de confiance) en fonction de l'irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \* : pvalue < 0.05, \*\* : pvalue < 0.01.

Tableau 9. Fonction supposée des facteurs de transcription des gènes *lhc*.

Source	Non TISO_	Annotation	Fonction supposée
BLAST (MYB)	Phatr3_EG02570 00361	Transcription_factor_MYB-rel_1	
BLAST (MYB)	Phatr3_EG02570 33128	Transcription_factor_MYB-rel_11	• Activent la majorité des
BLAST (MYB)	Phatr3_EG02570 01406	Transcription_factor_MYB-2R_2	<i>lhcf</i> et <i>lhcr</i> , et de <i>lhcx2</i> , <i>lhcx5</i> , <i>lhcx7</i>
BLAST (MYB)	Phatr3_EG02570 17552	Transcription_factor_MYB-3R	et/ou • Inhibent <i>lhcr5</i> , <i>lhcr6</i>
BLAST (MYB)	Phatr3_EG02570 14959	Transcription_factor_MYB-rel_5	et/ou • Inhibent <i>lhcx1</i> , <i>lhcx3</i> ,
Thiriet-Rupert et al. 2018 [449]	17672	Transcription_factor_MYB-2R_20	<i>lhcx4</i> , <i>lhcx8</i> , <i>lhcx11</i>
Thiriet-Rupert et al. 2018 [449]	11956	Transcription_factor_MYB-2R_14	• Active <i>lhcx6</i>

#### 4. Conclusion

Cette étude a permis de caractériser des différences de stratégies de photoprotection entre deux souches clonales de *T. lutea*, modulées par les composants du qE (*energy-dependent quenching*) lors de la mise en place du NPQ à forte irradiance. Pour les deux souches, l'augmentation de l'irradiance a été corrélée à une augmentation de l'expression des gènes *lhcx*. En parallèle, une augmentation progressive de la teneur en pigments photoprotecteurs et une augmentation de la dissipation de l'énergie lumineuse en excès a été observée. La stratégie de photoprotection de la souche T-5cl6 est principalement basée sur les cycles de pigments xanthophylles Ddx-Dtx et Vx-Zx. La stratégie de la souche T-4cl3 est également basée

sur le cycle Ddx-Dtx, mais dans une moindre mesure, et sur l'accumulation parallèle d'échinénone. À la plus forte irradiance, la synthèse de Dtx et d'échinénone semblait insuffisante pour dissiper l'excès d'énergie lumineuse chez la souche T-4cl3, qui a commencé à synthétiser de la Zx.

Chez les deux souches, l'équilibre entre photosynthèse et photoprotection est donc la combinaison de (i) la structuration de la FCP, (ii) la modulation des pigments photosynthétiques Chl et Fx, (iii) la synthèse des pigments photoprotecteurs ainsi que la transcription des dé-époxydases et des époxydases. Les différences entre les deux souches clonales ont mis en évidence des corrélations précises entre ces éléments. Il est possible que ces différences soient dues à l'adaptation des souches au climat lumineux de l'environnement naturel d'où elles ont été isolées, et/ou à l'évolution individuelle et la sélection dans les conditions de culture en laboratoire. Enfin, la présence remarquable d'échinénone, modulée par la lumière en condition de réplétion en N, exclut l'influence seule des nutriments sur sa synthèse chez *T. lutea*.

## 5. Article : Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: evidence for different photoprotection strategies.

**Article soumis :** Pajot, A.; Lavaud, J.; Carrier, G.; Lacour, T.; Marchal, L.; Nicolau, E. Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: evidence for different photoprotection strategies., soumis dans le journal *Algal Research* le 26 août 2022, ALGAL-D-22-00647, révisé et re-soumis le 20/10/2022.

Les données supplémentaires citées « Figure S » et « Table S » sont disponibles en annexe (Annexe II).

### 5.1. Abstract

To assess the mechanisms of photoprotection in *T. lutea*, two clonal strains with different basal pigments composition were studied. One synthesized echinenone, while the other did not but showed a high amount of diadinoxanthin and diatoxanthin. We investigated the photosynthetic response of these two clonal strains in turbidostat, at different growth culture irradiances from 50 to 550  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . To this end, variable chlorophyll *a* fluorescence, pigment composition and transcription level of specific genes were monitored. In addition to the genes coding for the Fucoxanthin Chlorophyll *a*, *c* binding Protein (FCP), we followed the expression of several putative genes coding for the diadinoxanthin de-epoxidase, the violaxanthin de-epoxidase and the zeaxanthin epoxidase enzymes. It was the first time that these genes were characterized in *T. lutea*. Both clonal strains decreased their photosynthetic pigments with increasing irradiance. Nevertheless, the two clonal strains had different photoprotection strategies illustrated with the extent of the dissipation of excess light energy. It was accompanied by the synthesis of photoprotective pigments to different extents: T-5c16 increased its pool of diadinoxanthin-diatoxanthin with increasing irradiance, while T 4c13 preferentially synthesized echinenone above a certain level of irradiance. These diverging phenotypes were correlated with variations in the expression of *lhcx*, *lhcr*, and of the putative genes of the enzymes involved in the xanthophyll pigment cycles.

### 5.2. Introduction

Chromista is a well-known clade responsible for 25% of the primary production on Earth [417], composed of brown seaweeds and microalgae, including diatoms and haptophytes. These

latter groups are ubiquitous in oceans, and are able to cope with fluctuating light conditions. While performing photosynthesis for their growth, cells have to avoid the photodamages caused by an excess of light energy absorption, generating various reactive oxygen species (ROS) [450,451]. The achievement of an efficient balance between photosynthesis and photoprotection explains part of the worldwide expansion of diatoms and haptophytes [75,452,453], and they developed several strategies to achieve it. The major player of this very dynamic equilibrium is the light-harvesting antenna, also called the light-harvesting complex (LHC) [420].

The LHC of diatoms and haptophytes, common to all Chromista, is composed of photosynthetic and photoprotective pigments, and of the Fucoxanthin Chlorophyll *a,c* binding Protein (FCP) [420]. The FCP is a thylakoid transmembrane protein complex composed of three main protein families. The Lhcf and Lhcr are protein sequences binding mostly photosynthetic pigments such as fucoxanthin (Fx) and chlorophylls (Chl *a* and *c*). The Lhcx bind mostly photoprotective pigments such as diadinoxanthin (Ddx), diatoxanthin (Dtx) [118–120]. It is therefore assumed that Lhcf and Lhcr are related to photosynthesis and Lhcx to photoprotection. However, Lhcf can also bind Ddx, for instance in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* [105], highlighting the more complex role of Lhcf within the light-harvesting antenna. Currently in the literature, there is an abundance of studies on the FCP of diatoms [101,454], whereas only a few exist for haptophytes [128,415].

We selected *Tisochrysis lutea* as a representative of haptophyte microalgae, and determined the composition of its FCP in a previous study [415]. 28 Lhcf, 12 Lhcr and 12 Lhcx protein sequences constitute the FCP of *T. lutea*, and at least five Fx molecules and nine Chl *a* and *c* molecules are bound to a majority of Lhcf monomers in this species [415]. In diatoms and haptophytes, a correlation was already established between the expression of the FCP and the concentration of pigments in cells. Especially, a clear correlation between the Lhcx and the photoprotective xanthophyll cycle Ddx-Dtx was observed in diatoms and haptophytes. In the diatom *Thalassiosira pseudonana*, both Dtx content and Lhcx proteins increased under high-light [119]. In *Phaeodactylum tricorutum*, the same correlation was observed between the Ddx-Dtx pool, three *lhcx* genes [120], and the Lhcx2 and Lhcx3 proteins [116,440]. In *T. lutea*, the increase in Dtx was also correlated with the increase in *lhcx* genes expression under high light during a day:night cycle experiment [415].

Under high light conditions, Ddx and violaxanthin (Vx) are de-epoxidized into Dtx and Zx respectively. These reactions are driven by the diadinoxanthin de-epoxidase (DDE) and the violaxanthin de-epoxidase (VDE). Reverse reactions of epoxidation imply epoxidases, and take place at low light [164]. These enzymes are activated by the development of a light-driven proton gradient across the thylakoid membrane and an acidification of the thylakoid lumen [455]. Contrary to the Ddx-Dtx cycle, well-known and well-described in diatoms and haptophytes, the Vx-Zx cycle is usually associated to higher plants and green algae only [149,456,457]. However, this cycle is also present in brown algae, in diatoms, where it prevents photoinhibition [94,458], and haptophytes such as *T. lutea*, as a secondary xanthophyll cycle [79,89]. Together with Lhcx proteins, both Ddx-Dtx and Vx-Zx cycles participate in the non-photochemical quenching (NPQ), more precisely the fast energy-dependent quenching (qE), which allows the dissipation, as heat, of excess excitation energy, induced by high irradiance [166]. In Chromista, models for NPQ measurement were established mainly for diatoms, and are not perfectly adapted to haptophytes, including *T. lutea* [442]. Indeed, the NPQ of *T. lutea* is sustained, which means NPQ is still present in darkness, *i.e.* its relaxation kinetics is not minutes but hours [447,459]. Therefore, the usual NPQ measure is not reliable for *T. lutea*. To overcome this problem, and in order to evaluate the dynamics between photochemistry and photoprotection, the measurement of the dark relaxation of the maximum quantum yield of the PSII ( $F_v/F_m$ ) on steady-state photoacclimated microalgal cultures is required [447]. In these specific conditions, and as shown in diatoms,  $F_v/F_m$  is related to the NPQ extent and to the Dtx amount [447]

In this work, two clonal strains of *T. lutea* were selected for their different pigment composition. Indeed, it was previously observed that T-5cl6 accumulated more Dtx and Vx than T-4cl3, and that T-4cl3 produced 19 times more echinenone than T-5cl6 under N-deprivation condition (Pajot *et al.*, in prep.). The overall objective of this study was to understand how potentially different photoprotection strategies would be expressed in these two strains. Using turbidostat cultures, we examined in both strains the photoacclimative response (pigments and transcriptomics) and the extent of the dissipation of the excess light (dark  $F_v/F_m$  as a proxy for NPQ) as a function of increasing irradiance. The genes of interest we investigated were the genes coding for the light-harvesting antenna proteins (*lhcf*, *lhcx* and *lhcl*), and for the de-epoxidases and epoxidases involved in the xanthophyll pigment cycles (DDE, VDE, ZE).

### 5.3. Materials and methods

#### 5.3.1. Culture conditions

Experiments were performed with two *Tisochrysis lutea* clonal strains, T-5cl6 and T-4cl3, respectively clone 6 from strain Ifremer-Argenton, isolated in Atlantic Ocean near Argenton, France and clone 3 from strain RCC1344, isolated in Atlantic Ocean at the level of the Spanish coast. These strains were polyclonal and the different clones have been isolated by flow cytometry (platform Cytocell, University of Nantes, France). Current analyses performed in the laboratory are demonstrating genetic polymorphism between the two strains, resulting in phenotypic differences at the pigments and lipids content level.

We set up an experiment to observe the physiological response of the two strains with varying growth irradiances. Inoculum were maintained in Walne's medium (Walne, 1966) at  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (or PPF: Photosynthetic Photon Flux). The effect of different light irradiances ( $50, 150, 300$  and  $550 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was determined for each strain in continuous 3.5 L photobioreactors (PBR). These PBR were made of two transparent polymethylmetacrylate (PMMA) columns (60 mm diameter) connected by two flanges (for design reference, see the single module in Loubière et al., 2009 [37]). Light was delivered by six dimmable fluorescent white tubes. It was measured outside the PBR, at middle height between the two columns, using a spherical quantum sensor (LI-250 light meter, LI-COR, 3mm diameter).

Cultures were constantly aerated and thermoregulated at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  by air conditioning and water circuit. pH was maintained constant at 8.2 with automatic injections of  $\text{CO}_2$ , measured with a pH measurement loop (electrode Inpro 4800/225/PT1000, Mettler Toledo and HPT 63, LTH electronics Ltd). Walne's medium enriched sea water ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ) was provided automatically by a metering pump (Simdos<sup>®</sup>) in order to maintain the culture at constant turbidity, *i.e.* at constant cell concentration. The excess culture was eliminated through an overflow pipe into a container. Cultures were monitored by a sensor to be maintained at low turbidity, between  $1.5$  and  $2.5 \cdot 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  (Fig. S4) in order to reduce self-shading and therefore keep the optical properties of the cultures stable. Each experiment was conducted in triplicate. Small error bars confirm the relevance of the three replicates in validating the biological data (Fig. S4). Cultures were maintained seven to ten days at each light irradiance before sampling, in order for cells to acclimate and cultures to be at the equilibrium, *i.e.* at a steady-state. Cultures were assumed

to be at steady-state when Chl *a* content was stable for at least three consecutive days with less than 10 % variation (Fig. S5, S6). In total, the experiment lasted four to five weeks per clonal strain.

#### 5.3.2. Chl *a* cell concentration monitoring and growth rate

To measure the Chl *a* content, cells were harvested daily from 10 mL of culture on a 0.2 µm fiberglass filter, and immediately immersed in 1.5 mL 95% acetone, during 24 hours. Absorbance was measured at 665 and 750 nm, before and after acidification with HCl 0.3 M.

The number of cells per mL of culture (cell concentration, Fig. S4) was measured on a Multisizer Counter Coulter (Beckman Coulter®). Growth rate ( $\mu$ ) was measured daily by weighing the excess culture in the overflow container, which represented the daily dilution rate of the culture (Fig. S4).

#### 5.3.3. Pigment extraction and HPLC analysis

Cell pigment content (Chl *a* in pg cell<sup>-1</sup>, Fx, Ddx, Dtx and echinenone in mol(100 mol Chl *a*)<sup>-1</sup>) was measured after seven to ten days at each light irradiance (50, 150, 300 and 550 PPF). Cells were harvested on a 0.2 µm fiberglass filter (GF/F, Whatman™) and immediately stored at -80°C. Four weeks later, they were immersed in 2 mL of 95% acetone, subjected to an ultrasonic bath for 10 minutes, and placed at -20°C overnight. The acetone extracts were filtered on a 0.2 µm fiberglass filter prior to injection in HPLC. The filtered acetone extracts were analyzed by HPLC-UV-DAD (Agilent Technologies series 1200 HPLC-UV-DAD) using an Eclipse XDB-C8 reverse phase column (150 x 4.6 mm, 3.5 µm particle size, Agilent) following the method described by Van Heukelem & Thomas (2001) [430] with slight modifications. Briefly, solvent A was 70:30 MeOH: H<sub>2</sub>O 28 mM ammonium acetate and solvent B was pure MeOH (Merck France). Gradient elution was the same as described in Van Heukelem & Thomas (2001) [430]. Quantification was carried out using external calibration against pigment standards (DHI, Denmark).

#### 5.3.4. Chlorophyll fluorescence measurement

At steady-state, the triplicate culture subsamples acclimated to each growth irradiance were harvested. In parallel with pigment content, the chlorophyll fluorescence was measured with a PHYTO-PAM (WALZ). The effective PSII quantum yield in the dark ( $F_v/F_m$ ) was measured



immediately after sampling, and following 15 min, 1 h and 2 h of dark acclimation, and calculated as:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

With  $F_0$  and  $F_m$  the minimal and maximal fluorescence respectively.

### 5.3.5. RNAseq

At the steady-state, 50 mL of triplicate cultures acclimated to each growth irradiance were sampled for transcriptomic analysis. After centrifugation (10 min, 8000 g), total RNA was extracted from each strain (T-5cl6 and T-4cl3) using the TRIZOL reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. DNase treatment (DNase RQ1, Promega) was used to remove residual genomic DNA. The quantity of purified total RNA was determined by a Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen, USA) using the AccuBlue<sup>®</sup> Broad Range RNA Quantitation Kit (Biotium, USA). The quality of purified total RNA was determined by measurement of absorbance (260 nm/280 nm) using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (LabTech, USA). Poly(A) mRNA were selected, libraries of RNAseq were built using bare code according to Illumina's protocol. Sequencing was performed using the paired-ends method with an Illumina NovaSeq sequencer by the GenoToul platform (INRAE, Toulouse, France). The read length was 260 bases. Transcripts were normalized according to the median of ratio method proposed by the DESeq2 package in R: counts were divided by sample-specific size factors determined by the median ratio. The median ratio is the ratio of gene counts relative to geometric mean per gene. Table 1 shows the average number of normalized transcripts for each strain at each growth irradiance.

**Table 1:** Number of normalized reads for all growth irradiances for T-5cl6 and T-4cl3

	T-5cl6	T-4cl3
50 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	3.3E+07	2.6E+07
150 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	3.0E+07	2.5E+07
300 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	3.2E+07	3.7E+07
550 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	2.5E+07	2.8E+07

Raw reads of each sample were filtered using TrimGalore to remove known Illumina adapter sequences. Low quality reads were excluded using a quality score threshold of 30 and a minimal length of 75 or 150 bases. The quality of reads was assessed using FastQC. Then, sequenced reads for each sample were aligned using HISAT2. Each gene within the alignment was counted using the Rsubread package in R with the function featureCounts, based on *T. lutea* reference genome [426]. Gene counts were obtained for each sample and normalized with DESeq2.

### 5.3.6. Similarity research

We performed a similarity research using BLAST [460] between the annotated DDE, VDE, VDL (violaxanthin de-epoxidase like) and VDR (violaxanthin de-epoxidase related) of several diatoms and haptophytes and *T. lutea* genome (Table S1, S2). All targets were selected and the best BLAST scores were selected as putative genes in *T. lutea*. For diatoms, there were one DDE from *Thalassiosira pseudonana*, nine VDE domain-containing proteins from *Fistulifera solaris*, *Thalassiosira oceanica* and *Thalassiosira pseudonana*, six VDE from *Fragilariopsis cylindrus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *F. solaris*, two VDL precursors from *P. tricornutum*, two VDL from *T. pseudonana*, one VDR from *P. tricornutum*. For haptophytes, there were five VDE from *Chrysochromulina tobinii* and *Emiliania huxleyi*, four VDE domain-containing proteins from *E. huxleyi*, and one VDL from *C. tobinii*. We also considered the reverse reaction of epoxidation. We found several zeaxanthin epoxidases (ZE and ZE like: ZEL) but no diatoxanthin epoxidase was recorded in UniprotKB databases. In diatoms, there were nine ZE from *T. pseudonana*, *F. solaris*, *F. cylindrus*, *P. tricornutum* and one ZEL from *P. tricornutum*. In haptophytes, there were seven ZE from *C. tobinii* and *E. huxleyi*.

### 5.3.7. Statistics

For each average measure of the culture triplicates (pigment content and normalized transcript counts), we used a confidence interval, characterized by error bars on graphics, calculated at a 95% confidence level:

$$\text{Confidence interval} = Z_{\alpha/2} * \frac{sd}{\sqrt{(n)}}$$

With  $Z_{\alpha/2} = 1,96$ ,  $sd$  = standard deviation,  $n = 3$  (number of triplicates)

Statistical differences were calculated between T-5cl6 and T-4cl3. The p-values indicated in each figure is therefore representative of the difference between the two strains (except in Fig. 6). At each irradiance, the dataset was made of three values, corresponding to the three culture replicates of T-5cl6 or T-4cl3. Therefore, a Student test was carried out first, and then an ANOVA test.

## 5.4. Results

### 5.4.1. Photosynthetic pigments and photochemical properties

Chl *a* content per cells gradually decreased with growth irradiance for both strains (Figure 40 A). In both strains, Fx normalized by Chl *a* gradually decreased with growth irradiance (Figure 40 B). At 50 PPF, T-5cl6 contained more Chl *a* than T-4cl3, and more Fx, as the Fx per Chl *a* ratio was similar in both strains. At 550 PPF it was the contrary, T-5cl6 contained less Chl *a* than T-4cl3.

In both strains,  $F_v/F_m$  decreased with the increase of growth irradiance (Figure 40 C). For all growth irradiances,  $F_v/F_m$  in T-5cl6 was lower than in T-4cl3. The difference between the two strains was the most significant at 150 PPF (pvalue < 0.01).

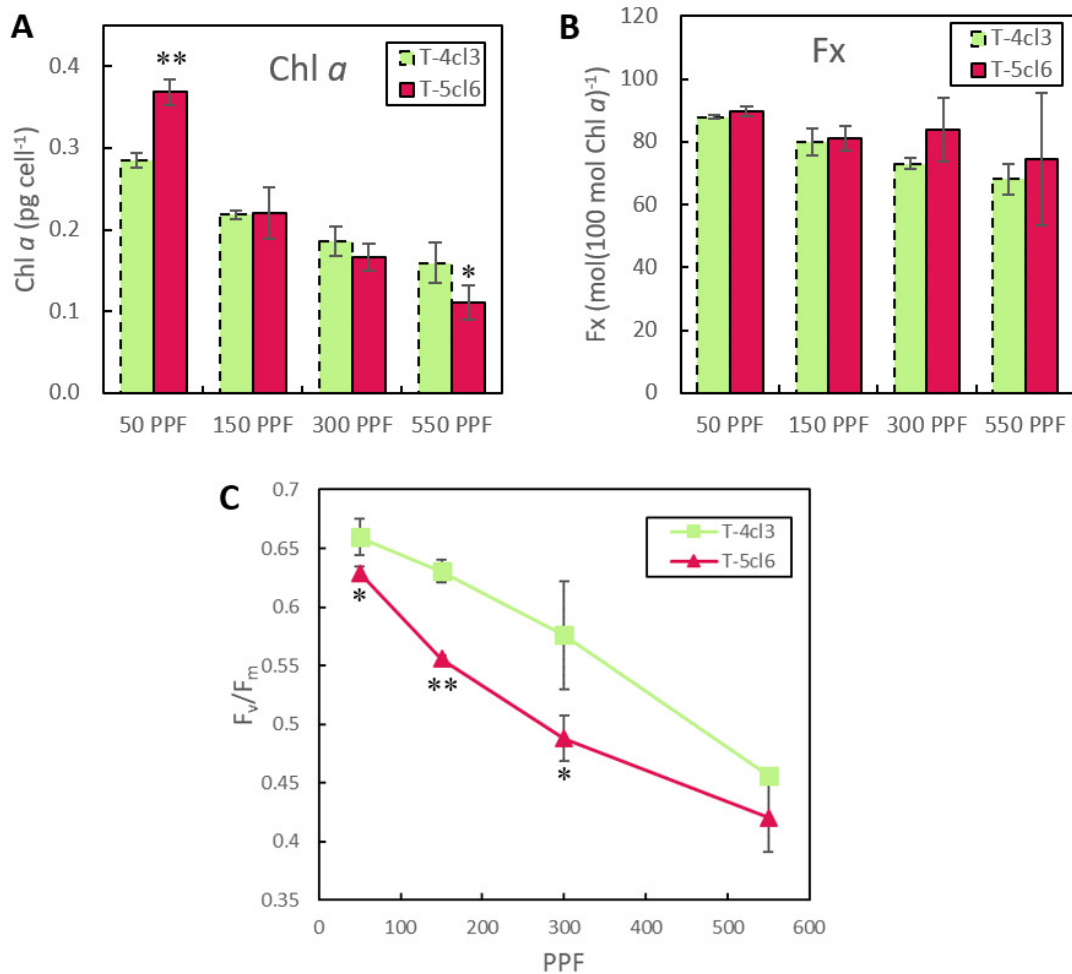


Figure 40. Evolution of the Chl a content (average  $\pm$  the confidence interval,  $\text{pg cell}^{-1}$ ) (A), of the Fx content normalized by Chl a (average  $\pm$  the confidence interval,  $\text{mol}(100 \text{ mol Chl a})^{-1}$ ) (B), of the maximum PSII quantum yield  $F_v/F_m$  (average  $\pm$  the confidence interval) (C), relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*:  $p$ value < 0.05, \*\*:  $p$ value < 0.01. \*:  $p$ value < 0.05, \*\*:  $p$ value < 0.01.

#### 5.4.2. Photoprotective pigments and $F_v/F_m$

With increasing growth irradiance, the Ddx+Dtx pool size increased 4-fold in T-5cl6 and 2.75-fold in T-4cl3 (Figure 41 A). The difference between the two strains was mainly explained by the highly variable values of Dtx amount (Figure 41 B) which increased 30.5-fold in T-5cl6 and 25.5-fold in T-4cl3 between 50 and 550 PPF. Furthermore, at 50, 150, 300 and 550 PPF, there was respectively 2, 4, 3 and 2.5 more Dtx in T-5cl6 than in T-4cl3. In parallel, the de-epoxidation state of Ddx to Dtx (DES-DD), expressing the conversion of Ddx into Dtx as a photoprotection mechanism, was calculated (Figure 41 C). At the lowest irradiance of 50 PPF, the DES-DD was 4% for T-4cl3 and significantly higher for T-5cl6, 9%. For both strains the DES-DD increased

with increasing growth irradiance, and values were higher for T-5cl6 at all four growth irradiances. At the highest irradiance, 550 PPF, the DES-DD reached 66% for T-5cl6 and 40% for T-4cl3 (Figure 41 C).

The maximum PSII quantum yield ( $F_v/F_m$ ) was expressed as a function of the normalized amount of Dtx to Chl *a* (Figure 41 D). Trend lines of both strains have a  $R^2 > 0.97$ , which demonstrated a solid correlation between  $F_v/F_m$  and Dtx (Figure 41 D). The slope of the T-4cl3 trend line was higher than the one of T-5cl6.

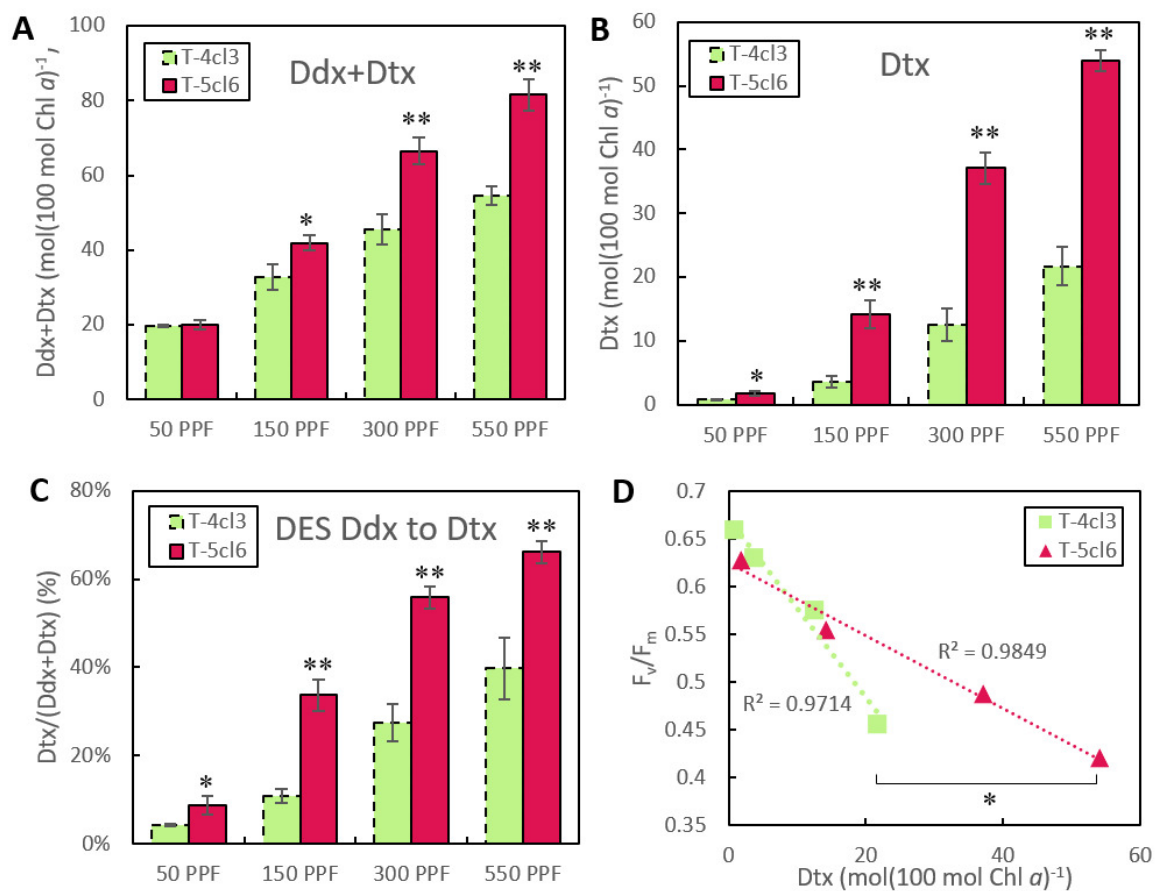


Figure 41. Evolution of the Ddx+Dtx pool (A) and of the Dtx (B) normalized by Chl *a* (average  $\pm$  the confidence interval, mol(100 mol Chl a)<sup>-1</sup>), of the de-epoxidation state (DES) from Ddx into Dtx (C) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). (D) presents the  $F_v/F_m$  relatively to Dtx content and the significant difference between the two slopes. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

The Vx+Zx pool size increased with increasing growth irradiance, and values for T-5cl6 were significantly higher than for T-4cl3 (Figure 42 A). As for Dtx, Zx was significantly higher in T-5cl6 from 150 to 550 PPF than in T-4cl3 where Zx was synthesized in small amounts at 550 PPF only (Figure 42 B). Values of the de-epoxidation state from Vx to Zx (DES-VZ) showed that in T-5cl6, Vx was converted into Zx gradually with increasing growth irradiance, and reached 50% at 550 PPF (Figure 42 C). In T-4cl3, only 9% of Vx was converted into Zx at 550 PPF.  $F_v/F_m$  was expressed relatively to the photoprotective pigment Zx (Figure 42 D). The slope of T-4cl3 was higher than the one of T-5cl6, it was associated with 6.5-fold less Zx than in T-5cl6.

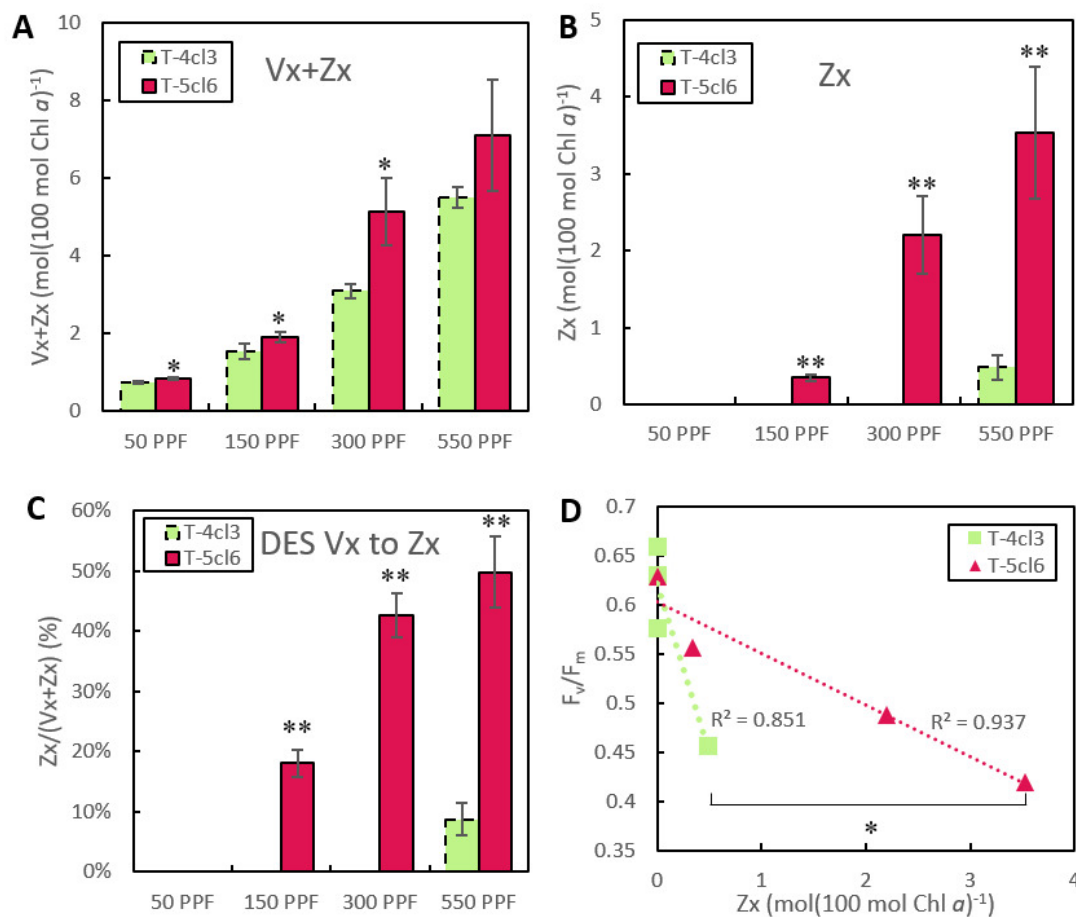
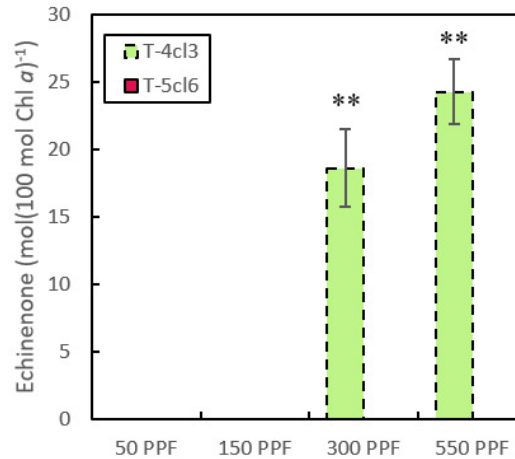


Figure 42. Evolution of the Vx+Zx pool (A) and of the Zx (B) normalized by Chl a (average  $\pm$  the confidence interval, mol(100 mol Chl a)<sup>-1</sup>), of the de-epoxidation state from Vx into Zx (C) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (D) presents the  $F_v/F_m$  relatively to Zx content and the significant difference between the two slopes. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

In our growth conditions, the pigment echinenone was found only in T-4cl3 strain at 300 PPF and 550 PPF, and was increasing with growth irradiance (Figure 43). At 550 PPF, echinenone represented 17% of the total carotenoids in T-4cl3 and 24% of the Chl *a* amount.



**Figure 43.** Evolution of the echinenone normalized by Chl *a* (average  $\pm$  the confidence interval, mol(100 mol Chl *a*)<sup>-1</sup>) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*\*: *p*value < 0.01.

In order to observe the dynamic balance between photosynthesis and photoprotection, we measured the  $F_v/F_m$  and the pigment content of cultures after 0 min, 15 min, 1 hour and 2 hours of darkness for each growth irradiance (Figure 44 A). For all conditions,  $F_v/F_m$  was lower in T-5cl6 than in T-4cl3. For all growth irradiances,  $F_v/F_m$  strongly increased after 20 min of darkness and kept increasing after 60 and 120 min. In parallel, Dtx content gradually decreased while Ddx content gradually increased as Dtx was re-epoxidized into Ddx (Figure 44 B, C). Both pigments were higher in T-5cl6 than in T-4cl3. At 550 and 300 PPF, Ddx and Dtx contents respectively doubled and halved after 120 min of darkness in T-5cl6. Proportions were lower in T-4cl3. After 120 min of darkness, there was still Dtx left in the culture samples of both strains which increased with growth irradiance.

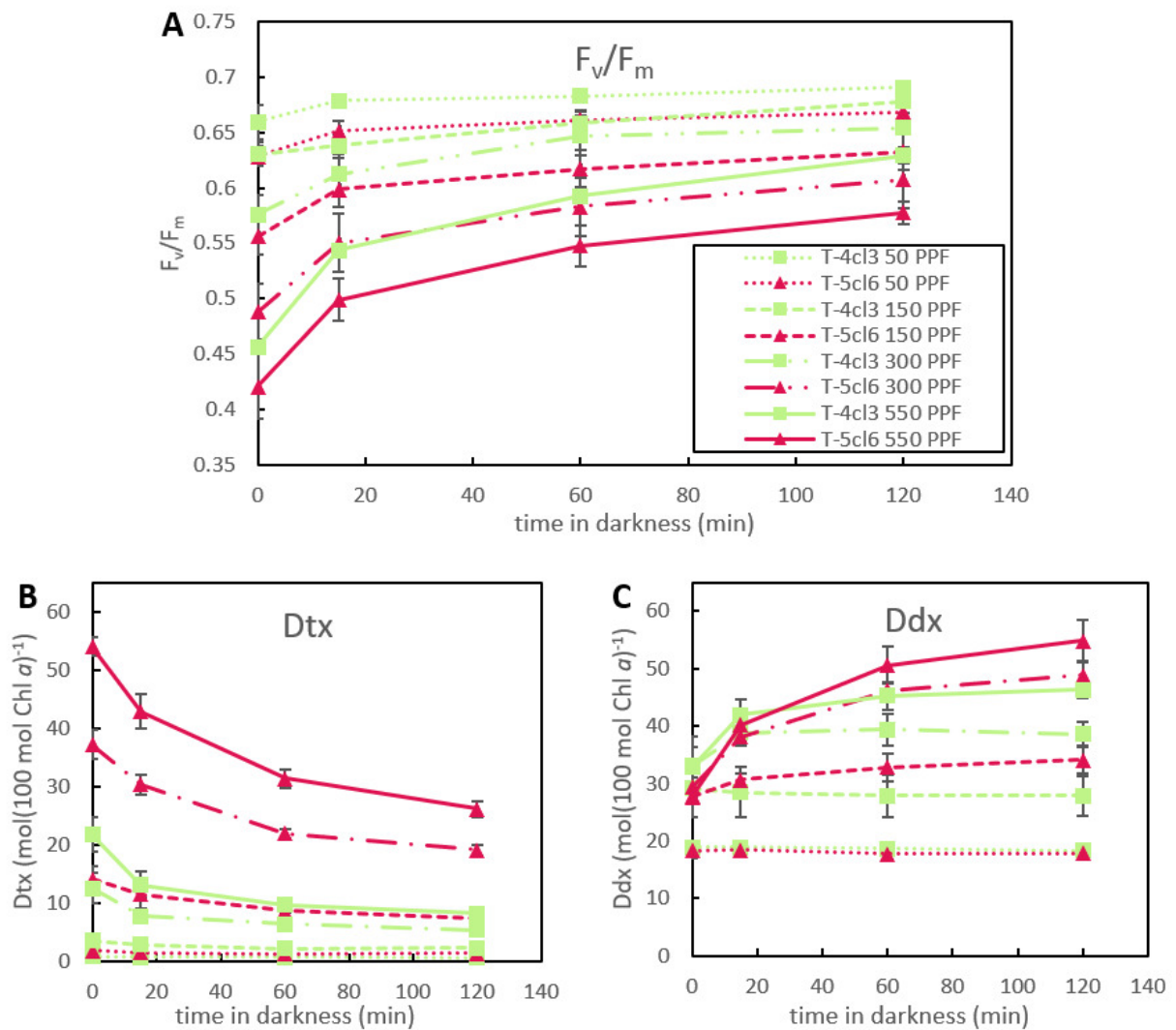


Figure 44. Evolution of  $F_v/F_m$  (A), of Dtx content (B) and of Ddx content (C) normalized by Chl a (average  $\pm$  the confidence interval, mol(100 mol Chl a)<sup>-1</sup>) relatively to the time in darkness.

#### 5.4.3. Expression of *lhc* genes

We observed the evolution of the *lhc* expression in both strains under the four growth irradiances (Figure 45, Fig. S1). The heatmap in Figure 45 shows the expression level of *lhc* genes and the significant difference between the four growth irradiances for both strains. Transcripts amounts of *lhc2* were by far the highest especially at 50 PPF in T-4cl3, followed by *lhc1* transcripts accounts. In T-4cl3, 8 *lhc* upon 12 were remarkably and significantly upregulated at 150 PPF (*lhc1*, *lhc3*, *lhc4*, *lhc8*, *lhc9*, *lhc10*, *lhc11*, *lhc12*).



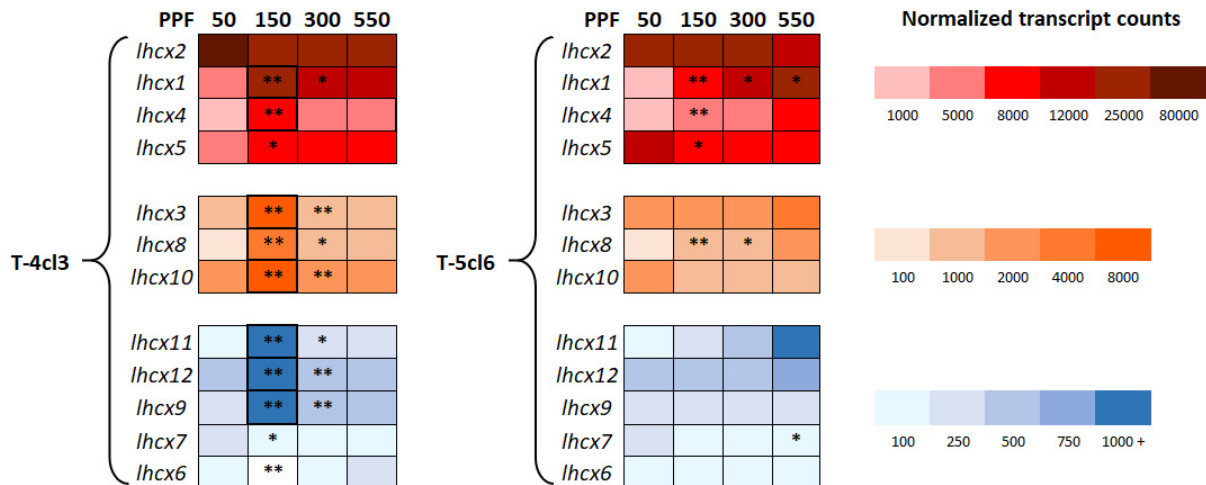


Figure 45. Heatmap of the *lhcx* transcripts counts. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01. Thick borders correspond to the highly upregulated *lhcx* genes at 150 PPF in T-4cl3.

Overlooking the upregulation at 150 PPF, *lhcx1*, *lhcx3*, *lhcx4*, *lhcx8* and *lhcx11* were gradually upregulated with increasing growth irradiance in both strains, up to five to ten-fold. At the highest growth irradiance (550 PPF), these genes were more expressed in T-5cl6 than in T-4cl3. In T-4cl3, *lhcx2* and *lhcx7* were upregulated at 50 PPF and *lhcx5* was downregulated at 50 PPF. On the contrary, *lhcx2*, *lhcx5* and *lhcx7* were gradually downregulated with increasing growth irradiance in T-5cl6.

In T-4cl3 among the 12 *lhc*, 10 were downregulated from 150 PPF to 550 PPF (Fig. S2), their expression was minimum at 50 PPF (Fig. S2). In T-5cl6, a similar pattern was observed, 10 *lhc* were downregulated with increasing growth irradiance from 50 to 550 PPF (all but *lhc5* and *lhc6*) (Fig. S2). In T-4cl3, *lhc5* and *lhc6* were upregulated only under 150 PPF (Fig. S2), like the majority of *lhc* (Figure 45), while in T-5cl6 they were upregulated with increasing growth irradiance. None of the *lhc* genes were remarkably upregulated at 150 PPF (Fig. S3). In T-4cl3, the decreasing pattern with increasing growth irradiance from 50 to 550 PPF was only obvious for *lhc13*, *lhc21*, *lhc24*, *lhc26* and *lhc27*. In T-5cl6, all 28 *lhc* were downregulated with increasing growth irradiance (Fig. S3). The expression of other genes in T-4cl3 was either relatively stable without significant variations, either slightly decreased from 150 PPF to 300 and 550 PPF. Indeed, in T-4cl3, 15 *lhc* among 28 were the least expressed at 50 PPF compared with other irradiances (*lhc1*, *lhc2*, *lhc3*, *lhc4*, *lhc5*, *lhc6*, *lhc7*, *lhc8*, *lhc17*, *lhc18*, *lhc19*, *lhc20*, *lhc22*, *lhc25*, *lhc28*). At 50 PPF, except for *lhc22* and *lhc23*, all *lhc* were more

expressed in T-5cl6 than in T-4cl3. Under the other growth irradiances, almost half of *lhcf* (12 among 28) were more expressed in T-5cl6 than in T-4cl3.

#### 5.4.4. Expression of de-epoxidase and epoxidase genes

##### **Diadinoxanthin de-epoxidase, DDE**

The similarity research with the DDE of *T. pseudonana* as a query resulted in four *T. lutea* genes, with the best similarity score for TISO\_37047 (259) (Table S1). Furthermore, TISO\_37047 had lower similarity scores with all other VDE, VDL (violaxanthin de-epoxidase like) or VDR (violaxanthin de-epoxidase related) of diatoms than with the DDE of *T. pseudonana*, although it had higher scores with a VDE domain-containing protein of the haptophyte *E. huxleyi*. Considering the fact that no DDE was annotated yet for haptophytes, and that VDE and DDE domains might resemble, TISO\_37047 was the best candidate as a putative DDE enzyme. We decided to annotate this gene as DDE\_L (DDE\_like) in *T. lutea*. According to the Interproscan analysis of this sequence, DDE\_L possesses several VDE domains (Table S5). We noticed that in all Interproscan database, there was no DDE domain referenced. We monitored the evolution of DDE\_L expression as a function of growth irradiance (Figure 46). DDE\_L expression in T-5cl6 was higher than in T-4cl3 under all four growth irradiances, and significantly at 50, 300 and 550 PPF. At 50 and 550 PPF, DDE\_L was 3.5 times more expressed in T-5cl6 (p-value < 0.01), and transcripts accounts at these two irradiances were similar in both strains respectively. More generally, in T-5cl6, DDE\_L expression increased gradually from 150 to 550 PPF while in T-4cl3 transcripts accounts were similar at 50, 300 and 550 PPF and maximum at 150 PPF (Figure 46). No Dtx-epoxidase were found in the UniprotKB database.

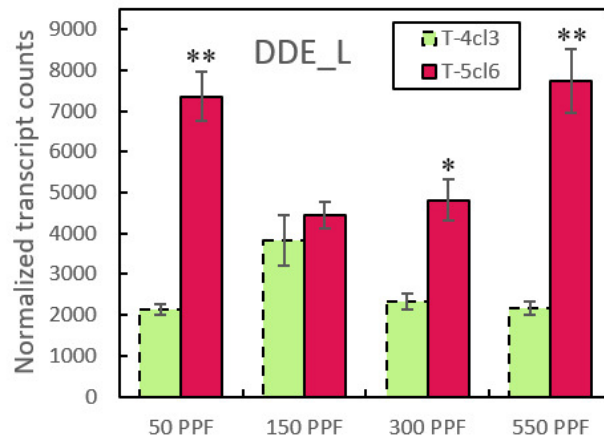


Figure 46. Evolution of normalized transcript counts of DDE\_L (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

#### Violaxanthin de-epoxidase, VDE and zeaxanthin epoxidase, ZE

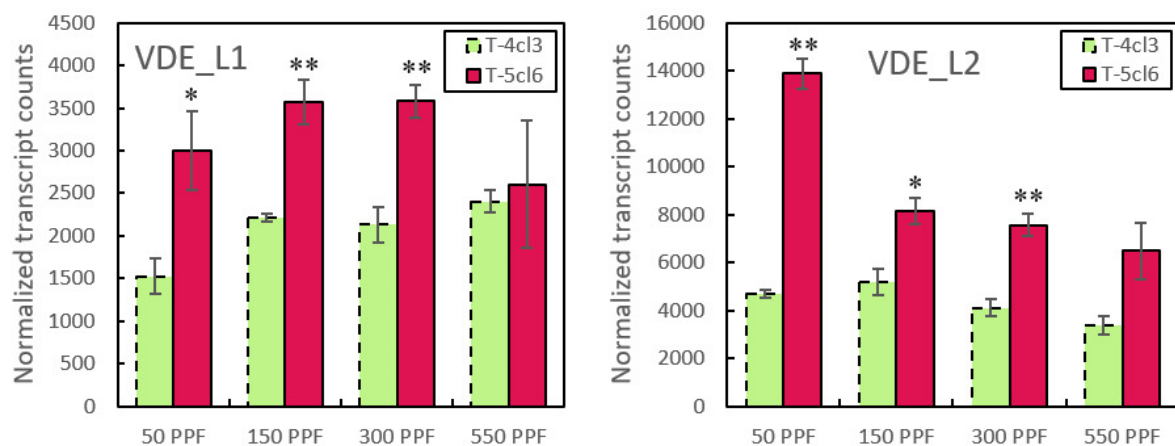
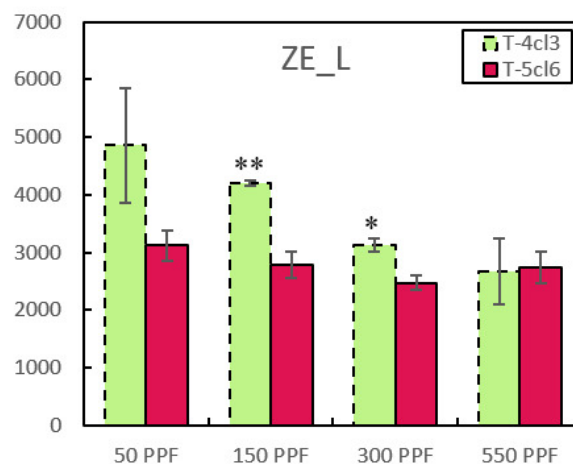


Figure 47. Evolution of TISO\_01606 (VDE\_L1) and TISO\_02731 (VDE\_L2) normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

The similarity research with the VDE, VDL and VDR of diatoms and haptophytes as a query resulted in five *T. lutea* genes. The same five genes were found throughout the similarity research with diatoms and the one with haptophytes. According to Interproscan analysis of the molecular function, all five genes possess a VDE activity (Table S5). The best similarity scores were obtained with haptophyte sequences. TISO\_01606 especially obtained the highest similarity score of all sequences, with the VDE2 sequence of *E. huxleyi* (600, Table S2).

TISO\_01606 was named VDE\_L1 (VDE\_Like1) and considered as coding for a putative VDE enzyme. The alignment of VDE\_L1 of *T. lutea* and VDE2 of *E. huxleyi* resulted in 67.4% similarity. Interestingly, VDE\_L1 expression was significantly higher in T-5cl6 than in T-4cl3 at 50, 150 and 300 PPF but not at 550 PPF (Figure 47). In T-5cl6, VDE\_L1 increased from 50 to 150 PPF then stabilized at 300 PPF and decreased at 550 PPF. TISO\_02731 showed high similarity score with the VDE of *C. tobinii* and a VDE domain-containing protein of *E. huxleyi* (respectively 418 and 400) (Table S2), and as such was considered as coding for a putative VDE enzyme. TISO\_02731 was named VDE\_L2 (for VDE\_Like2). VDE\_L2 expression was higher in T-5cl6 than in T-4cl3 under all growth irradiances, and significantly at 50, 150 and 300 PPF (Figure 47). In both strains, but especially in T-5cl6, its expression decreased with increasing irradiance. According to Interproscan analysis (Table S5), VDE\_L2 was associated with two biological processes, potassium ion transport and transmembrane transport, and two molecular functions, voltage-gated potassium channel activity and VDE activity. VDE\_L2 was the only gene which was not exclusively associated to VDE activity among the five genes found with the similarity research.



**Figure 48.** Evolution of TISO\_33049 (ZE\_L) normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

The similarity research with the ZE of diatoms and haptophytes as a query resulted in eleven *T. lutea* genes (Table S3, S4). Among them, TISO\_30349 had the highest similarity score with a ZE in *E. huxleyi* (578) (Table S4). TISO\_30349 was therefore considered as coding for a putative ZE

enzyme and named ZE\_L (for ZE\_Like). With increasing growth irradiance, the expression of ZE\_L decreased in both strains (Figure 48). At 150 and 300 PPF, ZE\_L was significantly more expressed in T-4cl3.

## 5.5. Discussion

### 5.5.1. Different photoprotection strategies in *T. lutea* T-5cl6 and T-4cl3 strains

#### The Ddx-Dtx and Vx-Zx xanthophyll cycles

As cells maintained growth efficiency under light stress, as shown with the increasing growth rate in Fig. S4, the observed molecular events such as photoprotective pigments synthesis really protected the cells from damage. The two *T. lutea* clonal strains, T-5cl6 and T-4cl3, were grown in the exact same conditions of irradiance, temperature, pH, nutrients, and at the same cell concentration. The ratio of Fx/Chl *a* was lower in T-4cl3 than in T-5cl6, suggesting that the light-harvesting capacity under high light was lower in T-4cl3. Using the darkness relaxation of  $F_v/F_m$  as a proxy for NPQ [447], we monitored a strong correlation with the Dtx content, pointing out to an implication of Dtx in the photoprotective dissipation of excess light energy in both strains. The decrease of photochemistry in T-4cl3 was associated to 2.5-fold less amount of Dtx than in T-5cl6, suggesting differences in quenching efficiency of Dtx between the two strains. Moreover, as in diatoms, Ddx was not entirely de-epoxidized in Dtx (*i.e.* maximum DES was about 60%), highlighting the double role of Ddx as a photosynthetic pigment and as a precursor of Dtx [150]. The same hold true for the photoprotective couple pigment Vx and Zx, as previously reported in diatoms [90]. In T-5cl6, photoprotection was associated with a higher Dtx and Zx content than in T-4cl3, with Zx only accumulated at 550 PPF in T-4cl3. Instead, T-4cl3 produced echinenone at 300 and 550 PPF while T-5cl6 did not. In summary, T-5cl6 used the two xanthophyll cycles Ddx-Dtx and Vx-Zx, and associated NPQ, as major photoprotective mechanisms, similarly as in diatoms [440]. Both cycles were used to a lower extent and more sequentially by T-4cl3. In addition, T-4cl3 cells strengthened their photoprotective pigment panel by producing echinenone at a certain threshold between 150 and 300 PPF. At 550 PPF, Dtx and echinenone were probably not sufficient to endorse the excess light energy in T-4cl3 cells and they started de-epoxidizing Vx into Zx. It is likely that at higher irradiances above 550 PPF, the Zx and echinenone concentrations would increase even more.

### The remarkable presence of echinenone in T-4cl3

The most noteworthy result of this study was the appearance of echinenone in T-4cl3 cells at 300 PPF. The presence of echinenone was previously demonstrated in *T. lutea* strain CCAP 927/14 [4] and in a close species, *Isochrysis galbana*, under N-deprivation [4,461]. In addition, we observed that T-4cl3 also synthesized echinenone under N-deprivation (Pajot *et al.* in prep). In *T. lutea* strain CCAP 927/14, it was reported that echinenone represented 25% of total carotenoids under N-deprivation [4]. Our results showed that echinenone represented a similar high amount of 17% of total carotenoids under N-replete condition at high irradiance. Echinenone is usually found in cyanobacteria, it scavenges the ROS [462] under high irradiance, and as such participates to photoprotection. In cyanobacteria, under high irradiance, the thermal dissipation of the light energy absorbed in excess by the phycobilisome (the light-harvesting antenna of cyanobacteria) is also mediated by a NPQ mechanism, which regulatory partners are different from haptophytes and diatoms [463]. Cyanobacteria NPQ occurs when the echinenone is bound to the Orange Carotenoid Protein (OCP) [464,465]. For instance, in *Synechocystis sp.*, NPQ is only activated when the 3'-hydroxyechinenone is bound to the OCP [445]. Our work is a first report of the presence of echinenone in a haptophyte under high light. According to several similarity researches we performed, no OCP was found in *T. lutea*. However, our results support that in the strain T-4cl3, the echinenone played a role in the response to high light as a support to the xanthophyll cycles-mediated NPQ, likely through direct ROS scavenging [466], *i.e.* by free-echinenone molecules in the thylakoid membrane, similarly as some Dtx molecules [467]. Nevertheless, we cannot exclude that a different form of the OCP is present in *T. lutea*, and further search is required.

#### 5.5.2. Xanthophyll de-epoxidases and epoxidases in *T. lutea*

This is the first time that several DDE and VDE candidate genes were characterized in *T. lutea*. The monitoring of their expression as a function of growth irradiance enabled to correlate the transcription of these genes to the different light-response strategies shown by T-5cl6 and T-4cl3. No Dtx-epoxidase was found in the UniprotKB database. However, the two Dtx-epoxidases of *Thalassiosira pseudonana* are usually annotated as ZE in the literature [121]. Therefore, the seven sequences in *T. lutea* resulting from the research similarity with the query sequence "ZE *Thalassiosira pseudonana* THAPSDRAFT 261390" (Table S3) might be good candidates as Dtx-epoxidase.

As pointed out before in the diatom *P. tricornutum*, the zeaxanthin-epoxidase (ZE) can play an equivalent role, i.e. ZE can trigger the epoxidation of both Dtx and Zx [30,43].

### **The diadinoxanthin de-epoxidase**

With increasing growth irradiance, Ddx was de-epoxidized into Dtx as illustrated by the progressive increase in DES-DD in both strains. Ddx de-epoxidation was stronger in T-5cl6 than in T-4cl3. We found a DDE gene candidate we named DDE\_L, whose associated protein could be responsible of the Ddx de-epoxidation in *T. lutea*. As for Dtx content and DES-DD, DDE\_L expression was higher in T-5cl6 than in T-4cl3 under all four irradiances, which was consistent with a stronger Ddx de-epoxidation activity in T-5cl6. Interestingly, in T-5cl6, the expression of DDE\_L was close to its maximum already at 50 PPF. In parallel, we did not observe a particular Dtx accumulation that could have been induced by chlororespiratory electron flow, as it was reported in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [469]. This result might suggest that T-5cl6 cells produce a maximum of DDE\_L transcripts regardless of the irradiance, without translating them into protein unless it is necessary. Or, the associated protein of DDE\_L has a more complex role than the putative de-epoxidation of Ddx. In *P. tricornutum*, the inactivation of the DDE enzyme under low light was shown not to be the factor triggering the inactivation of Dtx synthesis and NPQ maintenance [468]. Instead, they were due to an increase in Dtx epoxidation, which was therefore proposed to be the main actor in the Ddx-Dtx xanthophyll cycle regulation.

### **The violaxanthin de-epoxidase and the zeaxanthin epoxidase**

The difference between the two clonal strains was also witnessed by the expression level of the Vx-Zx cycle associated genes. Among them, the expression of TISO\_01606, we named VDE\_L1, was significantly higher in T-5cl6 at almost all growth irradiances, and it increased with increasing growth irradiance. A second putative candidate, TISO\_02731, we named VDE\_L2, was found to be associated to both a VDE activity and a voltage-gated potassium channel protein. A voltage-gated potassium channel protein is a complex forming a transmembrane channel through which potassium ions may cross a cell membrane in response to changes in membrane potential [470]. It is noteworthy that VDE\_L2 could regulate in parallel both the de-epoxidation of Vx and the pH lumen which is itself pH-dependent [456,471]. Such potential dual role would need further investigation, ideally with targeted knock-out mutagenesis, as in diatoms [472]. Furthermore, VDE\_L1 in *T. lutea* had the best similarity score with the VDL2 gene

of *P. tricornutum* (gene identification: PHATRDRAFT\_45846), which encodes for an enzyme that has recently been demonstrated to be central in the Fx biosynthetic pathway in a study by Bai *et al.* (2022) [174]. This study suggested that Ddx would also be a substrate for the VDL2 enzyme, in addition to Vx. VDL2 would indeed be able to catalyze the tautomerization reaction (isomerization of a molecular function) of Ddx to allenoxanthin, these two pigments being key precursors of the Fx synthesis [174]. In addition, it is specified that the VDL2 enzyme in *P. tricornutum* is most likely subject to strict regulation in diatoms and haptophytes, so that Ddx can play both its role as a precursor of the major photosynthetic pigment that is Fx, and its role in photoprotection within the Ddx-Dtx cycle.

In the diatom *P. tricornutum*, NPQ results from the early inhibition of ZE rather than from an activation of DDE/VDE, which increases the amount of Dtx and, under certain light conditions, of Zx [468]. The epoxidation is the reverse reaction of the Ddx-Dtx and Vx-Zx cycles and it usually corresponds to a decrease in light intensity. In *T. lutea*, ZE\_L gene seems to be a strong candidate to code for a zeaxanthin epoxidase. In both strains, the ZE-L transcript level was similar to the ones of DDE and VDE, it was the highest at 50PPF, and its expression decreased with increasing growth irradiance, and might correspond to a lower synthesis of the ZE\_L associated protein. This pattern is usual and might be interpreted as the need of cells for keeping the right balance between light-harvesting (Ddx and Vx) and photoprotective (Dtx and Zx) pigments as a function of the growth irradiance. In the study by Bai *et al.*, (2022) [174], the ZEP1 (zeaxanthin epoxidase) gene in *P. tricornutum* (gene identification: PHATRDRAFT\_45845) has been shown, as VDL2, to code for a central enzyme in the Fx biosynthetic pathway [174]. Since ZE\_L in *T. lutea* had a high similarity score with ZEP1, it is assumed that its role, in addition to the epoxidation of Zx, is also central in the biosynthesis of Fx in *T. lutea* and in haptophytes in general.

### 5.5.3. A sustained NPQ in *T. lutea*

Culture samples were exposed to darkness in order to observe the relaxation dynamics from photoprotection back to photochemistry. Surprisingly, after two hours of darkness exposure, there was still Dtx present in cells of both strains, indicating that the epoxidation reaction from Dtx to Ddx was not complete. It has been determined that in algae using the Ddx-Dtx cycle as a photoprotective mechanism, the switch of the light-harvesting antenna from the NPQ mode to the light-harvesting mode at lower irradiance can only be realized by an efficient removal



of Dtx [200]. Nevertheless, under some harsh conditions (very high light, low temperature), the presence of Dtx, even after prolonged darkness, *i.e.* several hours and days, can be 'constitutive' and can generate a sustained form of NPQ [442,447]. This form of NPQ is complementary to the main NPQ component, qE [121,442,473], which is usually turned off in a few tens of seconds to some minutes when the cells are transferred from excess light to lower light or darkness [120]. In *T. lutea*, the retention of Dtx under prolonged darkness was especially strong in T-5cl6 under the highest irradiances. It was correlated with a partial relaxation on  $F_v/F_m$  likely illustrating a strong sustained NPQ [447]. It is noteworthy that T-5cl6 is the strain which relies the most on xanthophyll cycles. A stronger sustained NPQ is likely to be part of its photoprotective strategy, allowing the cells to promptly respond to an anticipated increase in irradiance after the darkness period [447].

#### 5.5.4. The role of *lhcx* in *T. lutea*

##### **lhcx1, lhcx4, lhcx8 and lhcx11 as major actors in regulating NPQ?**

The increase of photoprotective pigments such as Dtx and Zx does not necessarily lead to higher effective NPQ. Indeed in diatoms, it is the binding of photoprotective pigments to Lhc proteins, especially Lhcx, that effectively involves these pigments in NPQ [120]. Dtx molecules can be freely present in the thylakoid membrane to directly scavenge ROS species [467]. In both *T. lutea* strains, *lhcx1*, *lhcx4*, *lhcx8* and *lhcx11* were gradually upregulated with increasing growth irradiance together with Dtx synthesis. It suggests that *lhcx1*, *lhcx4*, *lhcx8* and *lhcx11* could be Dtx binders and potentially major actors in regulating NPQ in *T. lutea*. Interestingly, the transcript level of these genes was not particularly different between both strains (but for 150 PPF, see below) although NPQ was significantly stronger in T-5cl6, with the only exception of *lhcx11* at 550 PPF for which there was no difference in NPQ. Therefore, the NPQ difference can only be explained by the highest transcription of *lhcx* genes in corresponding proteins in T-5cl6 for providing the necessary binding sites to the significantly higher amount of Dtx molecules in this strain. Western-blot analysis will be needed to further confirm this hypothesis [116,117]. Besides *lhcx*, two *lhcr* genes, *lhcr5* and *lhcr6*, were upregulated with increasing growth irradiance in both strains. Interestingly, *lhcr5* and *lhcr6* form, together with *lhcr10*, a subclade of the *lhcr* family in *T. lutea* [415]. Moreover, *lhcr5* and *lhcr6* are similar to *lhcr6* and *lhcr8* in *P. tricornutum*, which were proposed to play a role in photoprotection [414,415]. It is

therefore consistent that *lhcr5* and *lhcr6* were expressed similarly to the majority of *lhcx* in T-4cl3. This result confirmed their supposed function in photoprotection, and possibly in NPQ.

#### **Lhcx2 and Lhcx5 prevent an increase in irradiance?**

Among *lhcx* genes, *lhcx2*, *lhcx5* and *lhcx7* were the only genes downregulated with increasing growth irradiance. In particular, *lhcx2* was highly expressed at 50 PPF in T-4cl3. Similarly, in our previous study on *T. lutea* strain CCAP 927/14, *lhcx2* was the only gene upregulated at low light, and during the night [415]. The hypothesis was that the associated Lhcx2 protein could protect from the return of light at any time after prolonged darkness exposure, as proposed for Lhcx4 in the diatom *P. tricornutum* [115]. The function of *lhcx2* in *T. lutea* strain CCAP 927/14 and T-4cl3 might therefore be extended to respond to a potential increase of irradiance during a low light period acclimation. In T-5cl6, this role might be undertaken by *lhcx5* which was also highly expressed at 50 PPF compared with T-4cl3. Transcript accounts of *lhcx2* and *lhcx5*, as well as the high light upregulated *lhcx1* and *lhcx4*, were the highest in both strains. Thus, corresponding proteins, if translation would be paralleled, might play an important role in light-response and possibly be predominant in the structure of the FCP in *T. lutea*.

#### **Lhcx participate in the balance between photochemistry and photoprotection?**

We observed a significant spike of expression for eight *lhcx* and two *lhcr* (*lhcr5* and *lhcr6*) at 150 PPF in T-4cl3. It was not paralleled with photoprotective pigments. The increase of *lhcx* and *lhcr* expression at 150 PPF was therefore not considered as inherent to photoprotection mechanisms under to the highest irradiances. In a previous experiment, the same 8 *lhcx* of *T. lutea* strain CCAP 927/14, cultivated with a day:night cycle, were significantly upregulated at the beginning of the day, corresponding to 225 PPF, compared to midday, corresponding to 900 PPF [415]. The hypothesis was that cells overexpressed *lhcx* at the beginning of the day to endorse light onset without risking photodamage. With our results in this work, the explanation could finally be different. We hypothesize that 150 PPF is a threshold between photochemistry and photoprotection for T-4cl3, *i.e.* that 150 PPF would be close to  $E_K$ , the light saturation parameter for growth. This possibility is supported by the sharper decrease in  $F_v/F_m$  beyond 150 PPF in T-4cl3. Another possibly, not exclusive, and depending on transcript translation, is the need for specific Lhcx and/or Lhcr FCP subunits in the light-harvesting antenna, in order to

perform the best adjustment between photochemistry and photoprotection at 150 PPF and beyond.

## 5.6. Conclusion

This study investigated the differences of photoprotection strategies between two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*. Overall, our results showed that with increasing growth irradiance, the expression of the *lhcx* genes increased and it was correlated with a gradual increase of the content in photoprotective pigments and of the dissipation of light energy in excess. Both strains differed with their photoprotective pigment (Table 2). T-5cl6 strain strategy was predominantly based on the Ddx-Dtx and the Vx-Zx xanthophyll cycles, while T-4cl3 strain strategy was also based on the Ddx-Dtx cycle, but to a lesser extent, and on the parallel echinenone accumulation. At higher irradiances, when both Dtx and echinenone appeared to be insufficient to endorse the excess light energy, the photoprotective pigment content was completed with the Vx-Zx cycle.

In both strains, the fine balance between photosynthesis and photoprotection was performed by the combination of (Table 10) (1) the FCP structuration with *lhcx*, *lhcr* and *lhcf*, (2) the modulation of the photosynthetic pigments chlorophylls and fucoxanthin, (3) the synthesis of photoprotective pigments of the Ddx-Dtx and the Vx-Zx xanthophyll cycles, alongside with the transcription of de-epoxidases and epoxidases, and of the echinenone in T-4cl3 specifically. The differences between the two clonal strains highlighted precise correlations between these regulatory partners. We propose these differences are likely due to their adaptation to the light climate of the natural environment from where they were isolated [153,474,475], and/or to the individual evolution and selection in the laboratory growing conditions. Finally, the remarkable presence of echinenone, which content was modulated by light under N-replete condition, excludes the influence of nutrients alone on its biosynthesis.

Table 10. Summary of the pigment content,  $F_v/F_m$ , *lhcx* and *lhcr* gene expression in T-5cl6 and T-4cl3 cells under the four growth irradiances. Legend for levels: +++ (highest), ++ (high), + (moderately high), - (moderately low), -- (low), 0 (absence).

		Photophysiology	Pigments				<i>lhcx</i> gene expression			
		Dissipation of the light energy in excess	Photosynthetic pigments		Photoprotective pigments			Actors of NPQ	Prevent an increase in irradiance	
Strain	Light		Fx	Chl <i>a</i>	Dtx	Zx	Echinenone	<i>lhcx1, lhcx4, lhcx8, lhcx11, lhcr5, lhcr6</i>	<i>lhcx2</i>	<i>lhcx5</i>
T-5cl6	50 PPF	--	+++	+++	-	0	0	--	+	+++
T-4cl3		0	+++	+++	--	0	0	--	+++	-
T-5cl6	150 PPF	-	++	++	+	+	0	-	+	+
T-4cl3		--	++	++	-	0	0	+++	+	++
T-5cl6	300 PPF	+	++	+	++	++	0	+	-	-
T-4cl3		-	+	+	+	0	+	+	-	+
T-5cl6	550 PPF	++	-	-	+++	+++	0	++	--	-
T-4cl3		++	-	-	++	+	++	++	-	+



---

# CHAPITRE 4

---

La production de fucoxanthine par

*Tisochrysis lutea*



## Chapitre 4 – La production de fucoxanthine par *Tisochrysis lutea*

### 1. Contexte et objectifs

Dans le Chapitre 3, les souches clonales T-4cl3 et T-5cl6 de *T. lutea* ont été étudiées pour leurs stratégies de photoprotection différentes. Lors des cultures en continu, les deux souches clonales présentaient une différence de contenu en pigments photoprotecteurs mais pas de différence de contenu en pigments photosynthétiques. Il n'y avait donc pas de différence significative de contenu en Fx entre T-5cl6 et T-4cl3. Cependant, les résultats du projet DynAlgue mené au sein du laboratoire ont montré que lorsque ces deux souches étaient cultivées en mode discontinu (mode batch), elles présentaient au contraire une différence notable du contenu en Fx pour un même taux de croissance des cellules (Figure 49). Plus précisément, la souche T-5cl6 présentait le plus haut taux de Fx par C ( $3.5 \text{ mg.g}^{-1}$  de C intracellulaire), en condition de carence en P, parmi les 100 souches clonales testées, tandis que la souche T-4cl3 présentait un des taux les plus faibles en condition de carence en N ( $0.5 \text{ mg.g}^{-1}$  de C intracellulaire). La normalisation de la quantité d'un métabolite par la quantité de C intracellulaire est souvent utilisée dans la littérature afin d'étudier la physiologie des cellules [38,421]. Le C intracellulaire est supposé représenter un biovolume constant dans les cellules, proportionnellement à leur taille. La Fx peut également être exprimée par cellule (en  $\text{fg.cell}^{-1}$ ). Cependant, pour un même nombre de cellules, deux échantillons seront difficilement comparables si la taille des cellules et, donc le biovolume de chaque échantillon, sont différents [476].



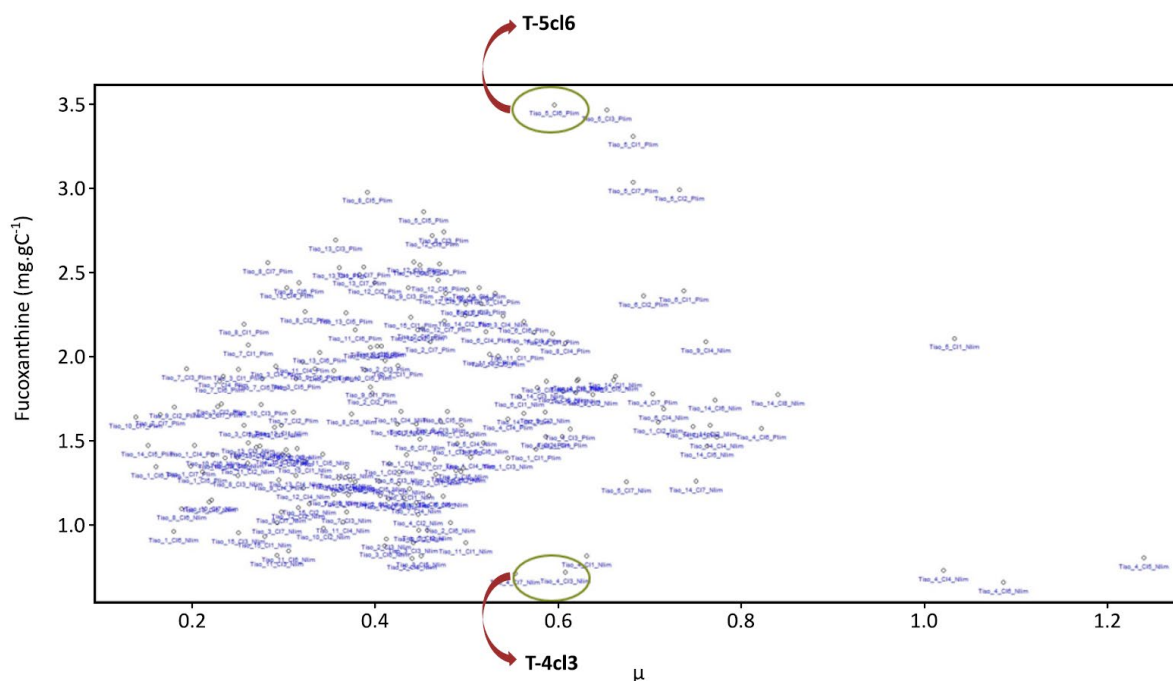


Figure 49. Graphique issu des résultats du projet DynAlgue représentant la concentration en fucoxanthine (en mg.g<sup>-1</sup> de C) chez les 100 souches clonales de *Tisochrysis lutea* en fonction de leur taux de croissance ( $\mu$ )

Dans le domaine de la recherche en aquaculture, la différence de contenu en Fx est intéressante car elle permettrait d'étudier l'influence de l'apport en Fx sur la reproduction, la survie et la croissance de mollusques bivalves. Comme décrit dans le Chapitre 1 (section 1.4), *T. lutea* est d'ores-et-déjà utilisée en aquaculture et plus précisément en conchyliculture. La présente thèse est adossée au projet de recherche TINAQUA, pour *Tisochrysis lutea* en Nutrition Aquacole, financé par la Région Pays de la Loire dans le cadre de l'appel à projet du SMIDAP (Syndicat Mixte pour le développement de l'aquaculture et de la pêche en Pays de la Loire). Le projet est réalisé en lien avec la Station IFREMER PMMB située à Bouin, sur la côte Atlantique, qui étudie la croissance des huîtres et l'influence de différents facteurs sur leur croissance et leur développement. La souche *T. lutea* CCAP 927/14 y est cultivée continuellement pour les nourrir.

L'objectif général de ce projet est de comparer la capacité de reproduction des huîtres génitrices puis le développement larvaire entre des huîtres ayant été nourries soit avec une culture de *T. lutea* enrichie en Fx, soit avec une culture de *T. lutea* appauvrie en Fx. Notre travail de thèse s'est articulé autour des objectifs intermédiaires du projet, qui seront détaillés dans ce chapitre, et consistent à augmenter l'écart de production de fucoxanthine par les souches

clonales de *Tisochrysis lutea* tout en procédant à un changement d'échelle de production : de 350 mL à 300 L.

Le choix des souches clonales T-4cl3 et T-5cl6 pour ce projet a été fait en considérant la valeur de Fx par C intracellulaire (soit en  $\text{mg.g}^{-1}$  de C). Nous avons ensuite étudié la différence d'accumulation de Fx dans les cellules de T-4cl3 et T-5cl6, exprimée en  $\text{fg.cellule}^{-1}$  et non en  $\text{mg.g}^{-1}$  de C car, au fur et à mesure des expériences, cette mesure s'est avérée non fiable. Ce dernier point sera explicité dans la section 3. Résultats et Discussion. En parallèle, nous avons gardé une condition témoin, avec la souche de référence *T. lutea* CCAP 927/14. La station de Bouin cultive communément *T. lutea* dans des scobalites de 300 L pendant 6 à 7 jours avant de prélever un volume fixe de culture, représentant une même concentration cellulaire, pour nourrir les huîtres. Nous nous basons sur leur protocole pour mettre en place les conditions de culture avec les souches clonales de *T. lutea*.

Les souches T-4cl3 et T-5cl6 avaient, jusqu'ici, été maintenues en mode batch dans des Erlenmeyers pour être cultivées en mode continu dans des PBRs de 3.5L (voir section 2.1. du Chapitre 3). Aussi, les objectifs du projet auxquels cette thèse a contribué sont les suivants :

1. Comprendre l'influence des nutriments N et P et de la lumière sur la production de Fx chez ces souches clonales.
2. Augmenter l'échelle de culture des souches T-4cl3 et T-5cl6 depuis l'Erlenmeyer de 150 mL au scobalite de 300 L.

L'étude de ces deux points permettra de trouver les conditions de cultures en mode batch qui permettent de creuser l'écart de production de Fx entre les souches clonales pour une application aquacole à la station Ifremer de Bouin.

L'amélioration de la production de Fx par *T. lutea* en grand volume nous permettra aussi, par la suite, de récolter suffisamment de biomasse pour tester différentes conditions d'extraction et de purification de Fx (Chapitre 5).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Conditions de culture à différentes échelles

Dans le cadre du projet TINAQUA, quatre expériences ont été menées à différents volumes de culture : 350 mL, 1 L, 6 L et 300 L (Figure 50). Le détail de la mise en place de chaque système de culture sont décrits dans les sections suivantes.

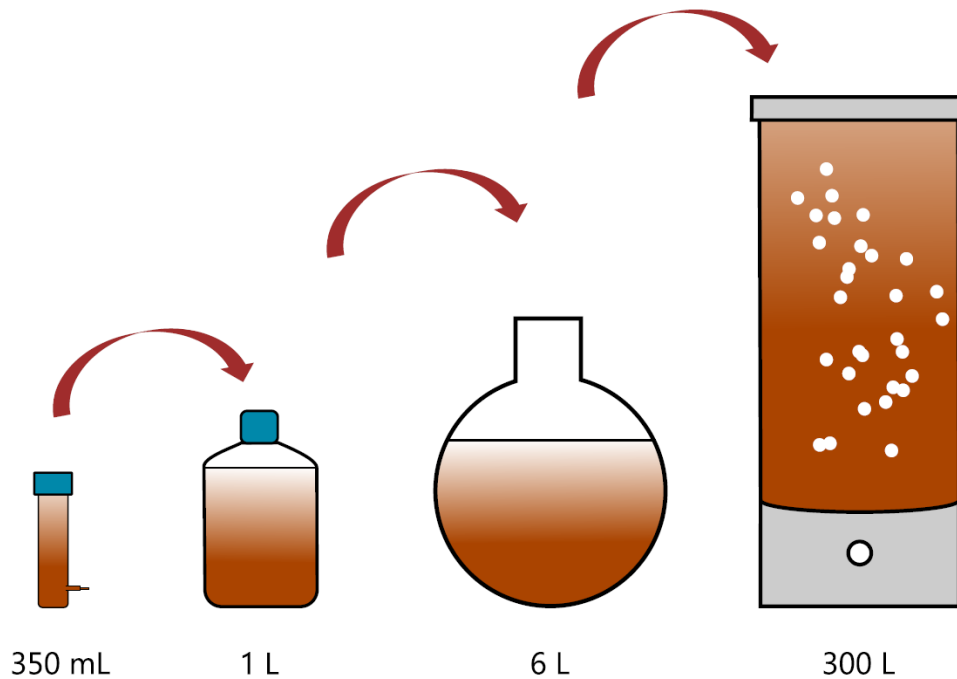


Figure 50. Montée en échelle de cultures de *T. lutea*

#### 2.1.1. Banc de phénotypage : cultures de 350 mL

Les trois souches T-4cl3, T-5cl6, CCAP 927/14 ont été cultivées en duplicat de culture à quatre ratio N/P différents (Tableau 11). Un système de culture nommé « banc de phénotypage » développé et breveté par IFREMER (EP3825396) a été utilisé. Ce système est composé de 24 PBRs tubulaires de 500 mL répartis en 4 modules de 6 PBRs (Figure 51). Il permet de comparer des cultures en plusieurs réplicats dans un environnement contrôlé et homogène (contrôle du pH, de la température, du bullage et de l'intensité lumineuse). Pour cette première expérience, plusieurs paramètres ont été fixés à une valeur constante, se rapprochant des conditions de culture optimales de *T. lutea* : le pH (7.5), la température (23°C), le bullage et l'intensité lumineuse (350  $\mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ). Le pH était régulé par l'apport de  $\text{CO}_2$  et constamment

contrôlé par une sonde. La température était contrôlée par thermostat directement dans la salle de culture et mesurée par la même sonde dans les PBRs. La lumière blanche était fournie de manière homogène par une plaque LED située en amont des PBRs, et vérifiée par une sonde LI-COR<sup>®</sup> en mesurant manuellement l'intensité au niveau de la paroi externe des PBRs. Les 4 modules de 6 PBRs représentent les 4 ratio N/P testés : 4.5, 9, 90 et 140 (de gauche à droite). Le choix de ces ratios est expliqué dans la section 3. Résultats et Discussion de ce chapitre. Au sein de chaque module, les trois souches sont cultivées en duplicats.



**Figure 51. Photo du banc de phénotypage des cultures de T-4cl3, T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14 dans des PBRs de 350 mL après 7 jours de culture en duplicats.**

L'eau de mer utilisée pour le milieu de culture provenait de la station de Bouin, qui est plus riche en  $\text{NH}_4$  ( $6.31 \mu\text{M}$ ) que l'eau de mer de la réserve de Nantes ( $0.44 \mu\text{M}$ ). Or, le  $\text{NH}_4$  est une source de N particulièrement assimilable par les cellules [44]. Chaque PBR a été rempli avec 300 mL d'eau de mer de Bouin ultrafiltrée (sur  $0.2 \mu\text{m}$ ). Les PBRs ont ensuite été autoclavés 20 min à  $121^\circ\text{C}$ . Afin de contrôler l'apport exact en N et en P, du milieu d'enrichissement Conway sans N ni P filtré sur  $0.2 \mu\text{m}$  a été ajouté aux PBRs. La disponibilité en N impactant fortement la croissance des microalgues, il a été décidé que chaque PBR aurait la même concentration initiale ( $1200 \mu\text{M}$ ), assurée par une solution de  $\text{NaNO}_3$  à  $100\text{g.L}^{-1}$ , complétée par une solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à  $20\text{g.L}^{-1}$  à différents volumes, puis ajustés à l'eau de mer autoclavée pour atteindre 350 mL.

**Tableau 11. Ratio N/P et concentration en N et en P pour les cultures de 350 mL.**

Ratio N/P	4.5	9	90	140
Concentration en N ( $\mu\text{M}$ )	1200	1200	1200	1200
Concentration en P ( $\mu\text{M}$ )	267	131	13	8
Volume total (mL)	350	350	350	350

A partir de cultures en batch maintenues à  $300 \mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  en milieu de Conway classique (soit un ratio N/P de 9) pendant deux semaines, les PBRs sont respectivement inoculés en duplicat pour obtenir une concentration initiale de  $250\,000$  cellules. $\text{mL}^{-1}$ . L'évolution de la biomasse est suivie par densité optique à  $680 \text{ nm}$  au TECAN<sup>®</sup> et par comptage cellulaire au Counter Multisizer (Beckman Coulter<sup>®</sup>), qui permet également d'analyser le diamètre moyen des cellules. Les pigments ont été analysés aux jours 6, 8 et 10 de culture. Le C intracellulaire a été analysé par analyseur élémentaire de particules (Flash 2000, Thermofisher).

### 2.1.2. Bouteilles : cultures de 1 L

Pour la deuxième expérience, les trois souches T-4cl3, T-5cl6, CCAP 927/14 ont été cultivées en duplicat de culture dans des bouteilles de 1 L (Figure 52). Le milieu d'enrichissement a été composé similairement à l'expérience sur le banc de phénotypage, avec un ratio N/P de 4.5 qui a été défini comme le plus adapté pour les cultures des trois souches de *T. lutea*. Afin de creuser l'écart d'accumulation de Fx entre les deux souches, T-4cl3 et T-5cl6 ont été cultivées à une intensité lumineuse de  $250$  et  $500 \mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  respectivement. Une diminution de l'intensité lumineuse favorise en effet la synthèse pigments photosynthétiques, dont la Fx par les cellules. À l'inverse, une augmentation de l'intensité lumineuse diminue la synthèse de pigments photosynthétiques. La souche CCAP 927/14 a été cultivée aux deux intensités afin de pouvoir comparer les résultats. La lumière blanche était fournie de manière homogène par 6 tubes fluorescents situés en amont de chaque PBR (Figure 52), et mesurée par une sonde LI-COR<sup>®</sup> en mesurant manuellement l'intensité au niveau de la paroi externe des PBRs. Les bouteilles de 1 L sont équipées d'une cane de bullage avec, en amont, un filtre  $0.2 \mu\text{m}$ , d'une cane de sortie d'air également dotée d'un filtre  $0.2 \mu\text{m}$ , et d'une seringue pour prélever de la culture afin d'effectuer les différentes analyses.



**Figure 52. Photo des duplicats de culture de T-4cl3 dans des bouteilles de 1 L après 7 jours de culture. Le même système a été mis en place pour les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14.**

Les bouteilles ont été inoculées en duplicat pour obtenir une concentration initiale de  $250\,000\text{ cellules.mL}^{-1}$ , à partir de cultures en batch maintenues à  $300\ \mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$  en milieu de Conway classique pendant deux semaines. Dans ces PBRs, ni le pH ni la température n'ont pu être monitorés. Le thermostat de la salle de culture a cependant été réglé de sorte à se rapprocher des conditions de l'expérience précédente. Le suivi de la culture et de la composition pigmentaire a été effectué du jour 2 au jour 8. Le nombre et le diamètre moyens des cellules ont été suivis au Counter Multisizer (Beckman Coulter<sup>®</sup>). Le C intracellulaire a été analysé par analyseur élémentaire de particules (Flash 2000, Thermofisher). Les pigments ont été analysés par HPLC (voir section 2.2. Extraction et analyse HPLC des pigments).

### 2.1.3. Ballons : cultures de 6 L

Pour la troisième expérience, des ballons de 6 L ont été utilisés pour cultiver T-4cl3, T-5cl6, et la souche CCAP 927/14 en triplicats de culture (Figure 53). Ce système de culture est couramment utilisé à la station Ifremer de Bouin pour ensemercer les scobalites de 300 L. Ainsi, les cultures issues de nos expériences serviront également à inoculer les scobalites lors d'une quatrième expérience de changement d'échelle. Les ballons de 6 L sont équipés, comme pour les bouteilles de 1 L, d'une cane de bullage avec, en amont, un filtre  $0.2\ \mu\text{m}$ , et d'une cane de sortie d'air également dotée d'un filtre  $0.2\ \mu\text{m}$ . Les ballons ne sont pas équipés de seringue, le prélèvement de culture pour analyses se fait sous hotte à flux laminaire.



**Figure 53. Photo des duplicats de culture de T-4cl3 dans des ballons de 6 L après 7 jours de culture. Le même système a été mis en place pour les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14.**

Comme pour la précédente expérience, les ballons sont inoculés pour obtenir une concentration initiale de  $250\,000\text{ cellules.mL}^{-1}$ , à partir de cultures en batch maintenues à  $300\ \mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$  en milieu de Conway classique pendant deux semaines. Suite à une erreur de manipulation au cours de laquelle les souches ont été échangées, T-4cl3 et T-5cl6 ont été cultivées chacune aux deux intensités de  $250$  et  $500\ \mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Nous avons donc obtenu des données supplémentaires. Dans ces PBRs, ni le pH ni la température n'ont pu être contrôlés. Le thermostat de la salle de culture a cependant été réglé de sorte à se rapprocher des conditions de l'expérience du banc de phénotypage, et 2% de  $\text{CO}_2$  est injecté continuellement dans les cultures (similaire au taux de  $\text{CO}_2$  dans les productions de microalgues de la station de Bouin). Les analyses du C intracellulaire, par analyseur élémentaire de particules (Flash 2000, Thermofisher), et des pigments, par HPLC, sont effectuées au jour 7 de culture.

#### 2.1.4. Scobalites : cultures de 300 L

Pour la dernière étape de la montée en échelle des cultures, les scobalites de la station IFREMER de Bouin ont été utilisés afin de cultiver les souches T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 en triplicats de culture. Les scobalites sont des colonnes de 300 L de 60 cm de diamètre. À leur base, un robinet permet la récolte de la culture. Contrairement aux trois précédents systèmes de culture en batch, les scobalites possèdent des couvercles et ne sont donc pas des systèmes totalement

clos et étanches. Avant le lancement des cultures, ils ont été stérilisés avec de l'eau de javel diluée (ClNaONaClO) pendant 24 heures et rincés plusieurs fois avant une première mise en eau de mer ultrafiltrée (0.2  $\mu\text{m}$ ). La pression positive qu'exerce le bullage réduit théoriquement les risques de contamination extérieure par le couvercle. Les scobalites ont ensuite été vidés puis remplis d'eau de mer ultrafiltrée jusqu'à 295 L. Les mêmes proportions de N et de P ont été utilisées pour le milieu d'enrichissement et ajoutées dans les scobalites, qui ont ensuite étéensemencés à hauteur de 250 000 cellules.mL<sup>-1</sup> à partir des ballons de l'expérience précédente. Leur volume total a atteint 300 L.



**Figure 54. Photo des triplicats de culture de T-4cl3 dans des scobalites de 300 L après 3 jours (à gauche) et 7 jours (à droite) de culture. Le même système a été mis en place pour les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14.**

La disposition et le matériel de la salle nous ont permis d'avoir, au maximum, une lumière incidente de 320  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour les cultures de T-5cl6 et non 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> comme dans les autres expériences. La puissance des néons ne nous permettait pas d'atteindre une intensité lumineuse de 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Afin d'appliquer tout de même une différence d'intensité lumineuse, la souche T-4cl3 a été cultivée à 200  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et non 250  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. La souche CCAP 927/14 a été cultivée à 320  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour comparer l'accumulation et la production de Fx avec les deux souches clonales et également afin d'obtenir de la biomasse pour les futures expériences



d'extraction (Chapitre 5). La lumière blanche était fournie de manière homogène par quatre tubes fluorescents situés en amont de chaque scobalite, et monitorée par une sonde LI-COR® en mesurant manuellement l'intensité au niveau de la paroi externe des scobalites. Les analyses pigmentaires sont effectuées après 7 jours de culture.

La biomasse de chaque PBR a été récoltée en acheminant la culture jusqu'à une centrifugeuse à assiette grâce à une pompe péristaltique (Figure 55). La récolte d'un scobalite s'est effectuée en trois heures, environ. La biomasse humide récoltée a ensuite été stockée à -80°C avant d'être lyophilisée.



Figure 55. Centrifugeuse à assiette (à gauche) et pompe péristaltique (à droite) permettant d'acheminer la culture.

## 2.2. Extraction et analyse HPLC des pigments

Selon la concentration cellulaire déterminée au Counter Multisizer (Beckman Coulter®), entre 1 et 5 mL de culture de T-4cl3 et de T-5cl6 ont été filtrés sur un filtre en fibre de verre de 0.7  $\mu\text{m}$  (GF/F, Whatman®) afin de récupérer la biomasse. Le filtre a été immédiatement stocké à -80 °C. A la fin de chaque expérience, tous les filtres ont été décongelés, immergés dans 2 mL

d'acétone à 95%, soumis à un bain à ultrasons pendant 10 minutes, et laissés à macérer pendant une nuit à -20 °C. Le lendemain, les extraits à l'acétone 95% ont été filtrés sur un filtre PTFE (polytétrafluoréthylène) de 0.2 µm avant d'être injectés sur la colonne de chromatographie. L'appareil utilisé était une HPLC-UV-DAD (Agilent Technologies series 1200 HPLC-UV-DAD), composée d'une colonne C8 en phase inverse (Eclipse XDB-C8, 150 x 4,6 mm, granulométrie 3,5 µm, Agilent) suivant la méthode décrite par Van Heukelem & Thomas (2001) [430] légèrement modifiée. Brièvement, le solvant A était composé de MeOH :H<sub>2</sub>O en proportions 70 :30 avec 28mM d'acétate d'ammonium et le solvant B était composé de MeOH pur (Merck France) Le gradient d'élution était le même que celui décrit dans Van Heukelem & Thomas (2001) [430]. La quantification des pigments a été réalisée à l'aide d'un étalonnage externe effectué avec des gammes de différentes concentrations de standards de pigments (DHI, Danemark).

### 2.3. Traitement statistique

Pour les analyses de densité cellulaire, de taille de cellule et de contenu en Fx, la moyenne des duplicats ou triplicats biologiques de culture a été calculée. La valeur obtenue a été nuancée par le calcul de l'écart-type, caractérisé par des barres d'erreur sur les graphiques.

## 3. Résultats et Discussion

### 3.1. Influence du N et du P : cultures de 350 mL

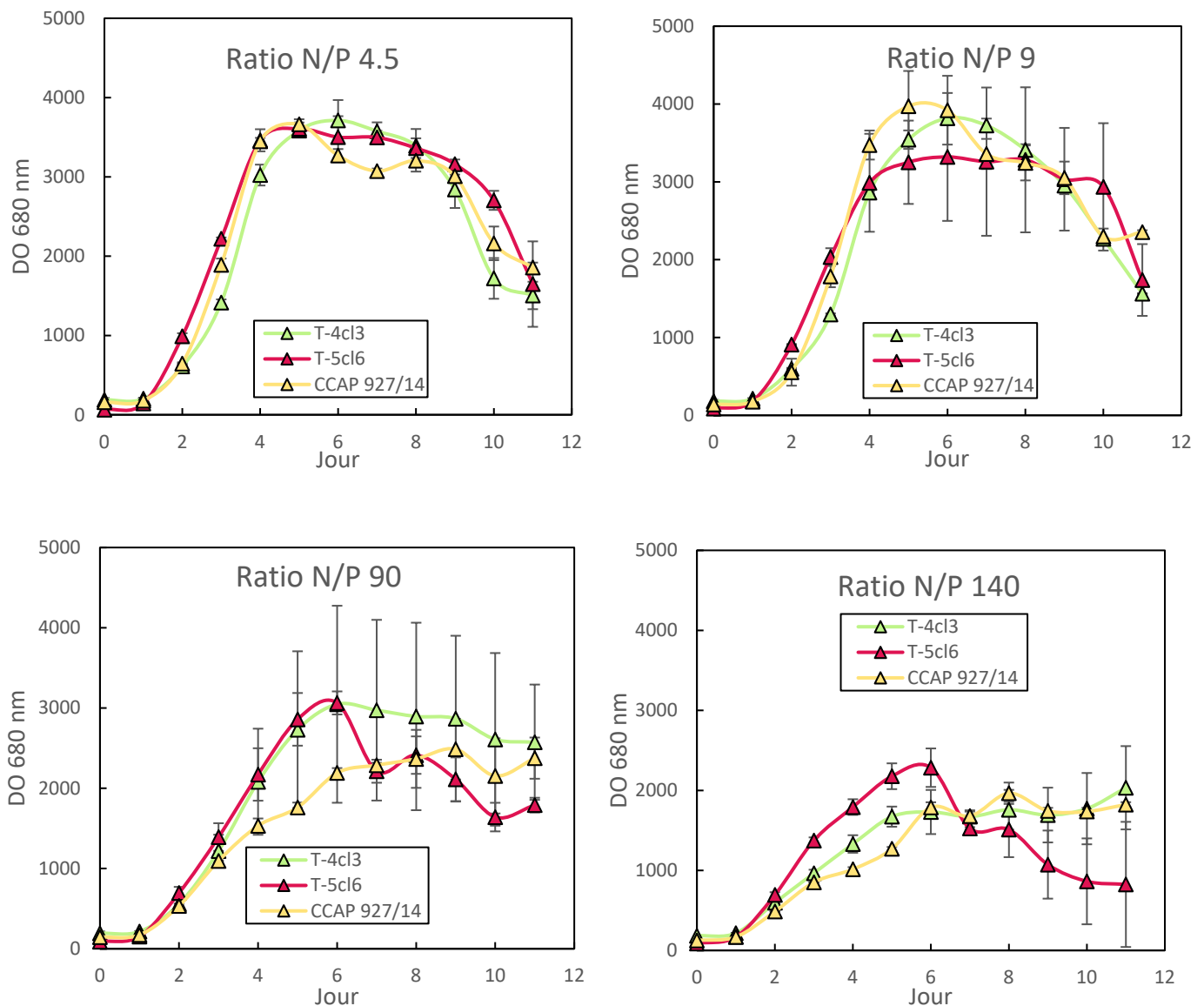
#### 3.1.1. Le choix des ratios N/P

Les souches clonales T-4cl3 et T-5cl6 ont été choisies pour leur différence d'accumulation de Fx dans des conditions de limitation en azote ou en phosphore. Aussi, l'objectif est de vérifier s'il est possible d'avoir une différence significative d'accumulation de Fx entre les deux souches clonales dans une seule et même condition de limitation (N ou P). En effet, la préparation d'un seul et même milieu d'enrichissement faciliterait la mise en place des futures cultures à grande échelle.

Quatre ratios N/P ont été testés (4.5, 9, 90 et 140) pour chacune des trois souches de *T. lutea*. Le ratio N/P de 9 correspond au ratio du milieu de Conway classique, habituellement utilisé pour cultiver *T. lutea*. Il induit une légère limitation en N car il est inférieur au ratio de Redfield qui est de 16 [46]. Le ratio de 4.5 correspond donc à une proportion plus importante de P, et

une limitation plus importante du N pour les cellules. Le ratio de 90 correspond à dix fois le ratio du milieu de Conway classique, il induit une forte limitation en P car il est plus de cinq fois supérieur au ratio de Redfield [46]. Enfin, le ratio de 140 correspond à une concentration minimale en P et induit donc une très forte limitation en P. Il a été testé suite aux résultats obtenus durant la thèse de Gaël Bougaran [42], qui avait observé une forte sécrétion de N organique dans ces conditions. *T. lutea* (souche CCAP 927/14) adapte sa réponse physiologique lorsque sa culture est limitée en P. Cette adaptation est corroborée par une intense coloration orange vif des cultures de *T. lutea* (souche CCAP 927/14) au ratio 140. L'analyse des pigments n'avait pas été effectuée, mais cette observation suggérait la présence d'un caroténoïde en plus grande concentration, probablement la Fx.

### 3.1.2. Le suivi de la biomasse et l'assimilation de N



**Figure 56. Suivi de la densité optique (DO) à 680 nm en fonction du temps des cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées aux ratios N/P 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage.**

Tout au long des 11 jours de culture, la turbidité de la biomasse (mesurée par densité optique) a évolué de manière similaire chez les trois souches de *T. lutea* (Figure 56) respectivement pour chaque ratio testé. Les cultures aux ratios N/P de 4.5 et de 9 ont par ailleurs atteint un niveau similaire de densité optique, alors que les cultures ne contenaient pas la même concentration cellulaire (Tableau 12). On remarque que les cellules de T-4cl3 présentaient un diamètre plus important et donc un volume plus important que les cellules de T-5cl6 (Tableau 12). Ainsi, malgré leur différence de taille et de concentration, les cellules ont atteint une même fraction volumique de la biomasse dans les cultures aux ratios 4.5 et 9 (Tableau 12). De plus, les cultures aux deux ratios N/P de 4.5 et 9 ont connu les mêmes phases de croissance, soit une phase de latence de 24 heures, puis une phase exponentielle de croissance jusqu'au jour 4, une phase stationnaire jusqu'au jour 8, puis une phase de déclin jusqu'au jour 11. Ces résultats suggèrent que les trois souches ont utilisé les nutriments disponibles (et notamment le N et le P) dans les mêmes proportions relatives à leur taille.

**Tableau 12. Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 aux ratios N/P de 4.5, 9, 90 et 140 au jour 6 de culture. Fraction volumique ( $\text{mm}^3$  de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ ) =  $4/3 \cdot \pi \cdot (\text{diamètre}/2)^3 \cdot \text{Concentration cellulaire}$ .**

	Diamètre moyen d'une cellule			Concentration cellulaire			Fraction volumique		
	( $\mu\text{m}$ )			(cellules. $\text{mL}^{-1}$ )			( $\text{mm}^3$ de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ )		
	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14
<b>4.5</b>	4.20	3.61	3.90	$1.55^{\text{E}+07}$	$2.68^{\text{E}+07}$	$2.08^{\text{E}+07}$	0.60	0.66	0.65
<b>9</b>	4.23	3.59	3.82	$1.70^{\text{E}+07}$	$2.57^{\text{E}+07}$	$2.23^{\text{E}+07}$	0.67	0.62	0.65
<b>90</b>	5.22	3.88	4.84	$9.21^{\text{E}+06}$	$4.34^{\text{E}+06}$	$8.85^{\text{E}+06}$	0.50	0.13	0.53
<b>140</b>	5.42	3.69	4.79	$3.12^{\text{E}+06}$	$5.90^{\text{E}+06}$	$5.35^{\text{E}+06}$	0.26	0.16	0.31

Les cultures correspondant aux ratios N/P de 90 et 140 ont atteint une concentration de biomasse moins élevée qu'aux ratios de 4.5 et 9. Une phase stationnaire de croissance a semblé se dessiner au jour 6 pour les deux ratios, soit deux jours plus tard que les cultures aux ratios de 4.5 et 9. Comme la concentration initiale en N était similaire pour les quatre ratios, cela signifie que le développement de la biomasse a été limité par le P. Un apport insuffisant en P dans les cellules a pu avoir limité la synthèse d'ATP, ce qui a ralenti l'action des canaux membranaires permettant l'assimilation de N dans les cellules [42,477]. Sur la Figure 57, on observe en effet qu'après cinq jours de culture, l'assimilation de N est presque totale dans les cultures aux ratios de 4.5 et 9. De 390  $\mu\text{mol}$  initialement il ne reste que 40  $\mu\text{mol}$  de N dans le milieu de culture. En revanche, au ratio 90 il reste entre 250 et 330  $\mu\text{mol}$  de N après cinq jours et il reste pratiquement la totalité de N initial dans le milieu des cultures au ratio de 140.

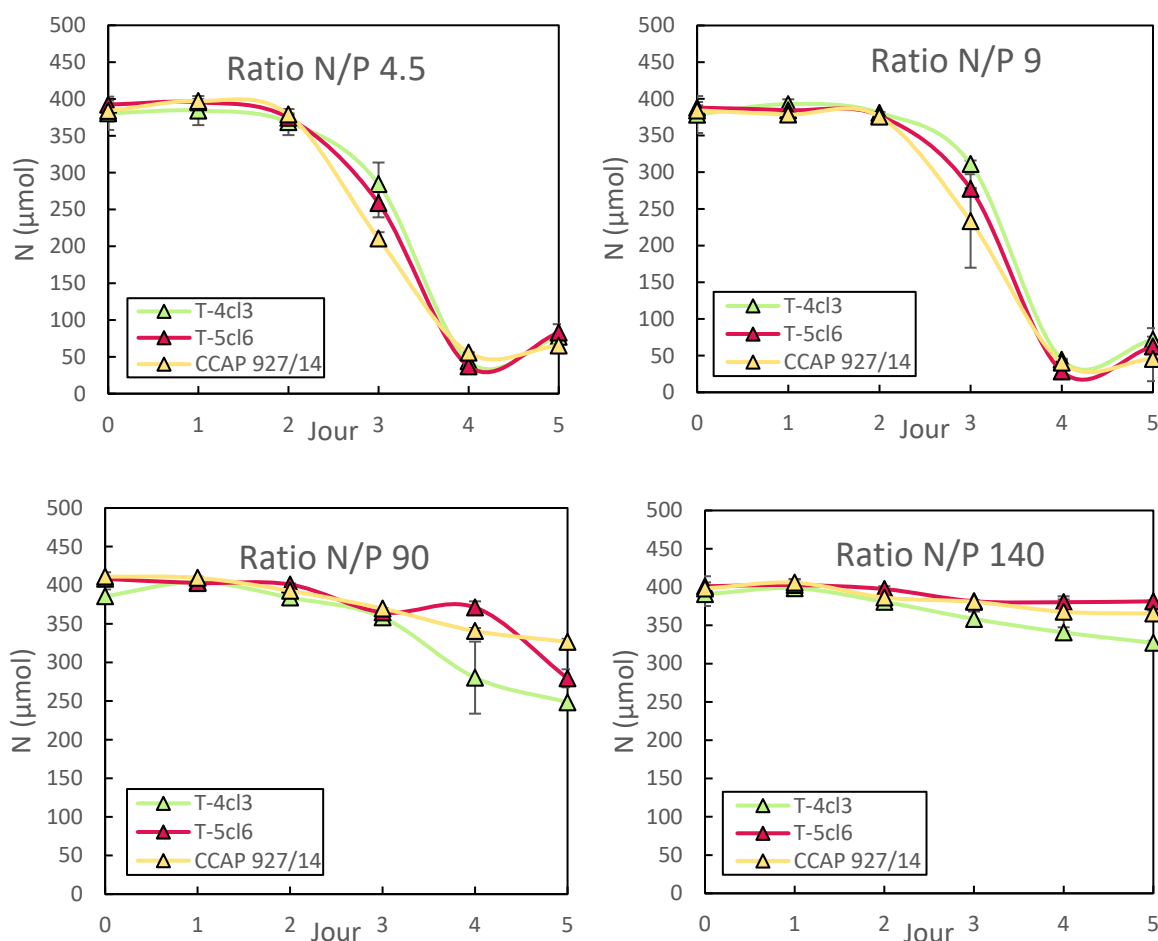


Figure 57. Évolution sur cinq jours de la quantité d'azote (N) dans le milieu de culture de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées aux ratios N/P 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage.

### 3.1.3. L'accumulation de fucoxanthine dans les cellules

De la biomasse a été prélevée aux jours 6, 8 et 10 pour l'analyse des pigments intracellulaires. Pour les quatre ratios N/P, et pour les trois souches, on observe que la quantité de Fx par cellule était plus élevée au jour 6 de culture qu'aux jours 8 et 10 (Figure 58). Le jour 6 coïncide également avec le maximum de densité cellulaire des cultures. Dans le cadre du projet TINAQUA, le début de la phase stationnaire semble donc être une période idéale pour optimiser l'apport de biomasse et de Fx en nutrition aquacole.

Parmi les trois souches, c'est la souche clonale T-4cl3 qui a présenté les valeurs les plus élevées de Fx par cellule pour les quatre ratios N/P (Figure 58). À l'inverse, la souche clonale T-5cl6 a présenté les valeurs les plus faibles. La valeur maximale de Fx par cellule a été observée dans les cultures de T-4cl3 au ratio N/P de 140 ( $76 \text{ fg.cell}^{-1}$ ). Les valeurs obtenues pour T-4cl3 aux ratios N/P de 4.5 et 90 étaient relativement proches ( $65$  et  $66 \text{ fg.cell}^{-1}$  de Fx respectivement). Par ailleurs, la densité cellulaire au jour 6 était cinq fois supérieure au ratio N/P de 4.5 par rapport au ratio 140 (Tableau 12). Le ratio 4.5 était également celui où avec le plus grand écart de Fx par cellule entre les deux souches clonales T-4cl3 et T-5cl6, soit le double (Figure 58). La souche témoin CCAP 927/14 a présenté des valeurs intermédiaires de Fx par cellule à ce ratio.

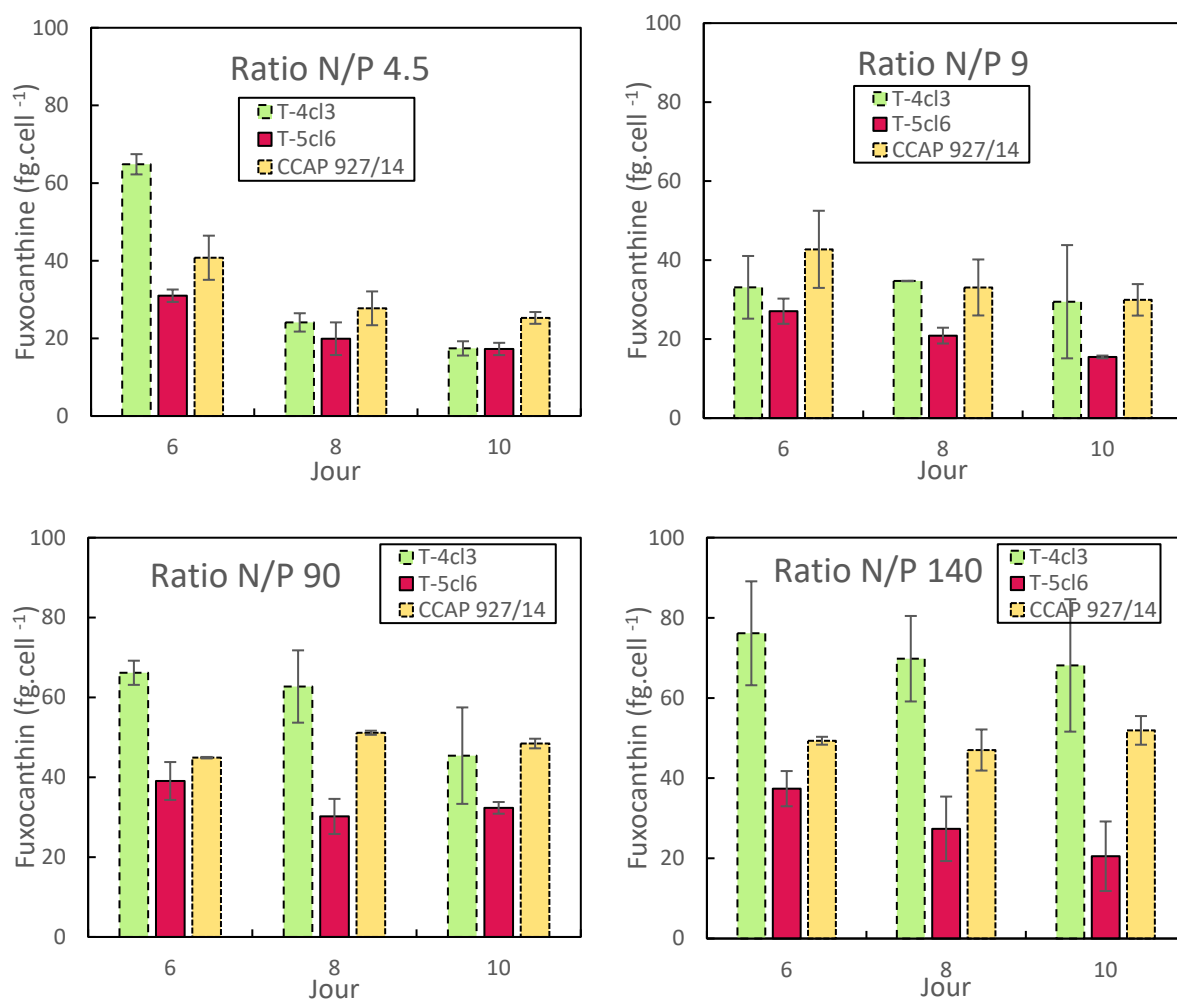


Figure 58. Concentration de fucoxanthine par cellule ( $\text{fg}\cdot\text{cell}^{-1}$ ) dans les cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées aux ratios N/P 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage.

En conclusion, les cellules de T-4cl3 ont accumulé plus de Fx lorsqu'elles étaient fortement limitées en P (ratio N/P de 140), mais cette condition impacte fortement leur croissance en comparaison à une proportion supérieure de P. Il n'était donc pas envisageable de cultiver T-4cl3 au ratio N/P de 140 à plus grande échelle pour la nutrition aquacole. Le ratio de 4.5 et les concentrations de N et de P associées ( $1200 \mu\text{M}$  et  $267 \mu\text{M}$  respectivement), a semblé au contraire être le plus adapté pour (i) obtenir une culture riche en Fx avec T-4cl3 et une culture pauvre en Fx avec T-5cl6, (ii) obtenir une quantité de biomasse importante en quelques jours de culture afin de nourrir les huîtres et naissains d'huîtres dans le cadre d'une production aquacole.

Nous avons choisi la souche T-5cl6 pour sa capacité à accumuler plus de Fx en limitation en P, contrairement à la souche T-4cl3. Cependant, nos résultats ont montré l'inverse. Cela est

surtout dû au fait que nous avons considéré les mesures de Fx en  $\text{fg}\cdot\text{cellule}^{-1}$  et non en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de C intracellulaire. En réalité, nous avons observé au cours de l'expérience que la souche T-4cl3 sécrétait une grande quantité de ce que nous avons supposé être des exopolysaccharides (EPS). Un mucus visqueux s'accumulait effectivement au fond des PBRs de T-4cl3 à partir de la phase stationnaire de culture. Ainsi, il est probable que des EPS aient été retenus sur les filtres ayant servis aux mesures de C intracellulaire, faussant ainsi les valeurs obtenues. Par exemple, en condition de limitation en P, soit au ratio N/P de 140, si l'on considère les mesures de Fx de notre expérience en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de C intracellulaire, on obtient une valeur plus élevée pour la souche T-5cl6 par rapport à T-4cl3 (4.31 et 2.03  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de C respectivement, Figure 59). On remarque alors que la concentration de C intracellulaire était jusqu'à deux fois plus élevée pour les cultures de T-4cl3, probablement pour les raisons décrites précédemment, expliquant alors cet écart.

La mesure de l'accumulation de Fx dans les cellules en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de C intracellulaire ne peut donc pas être fiable dans ces conditions, soit pour nos expériences, contrairement à la mesure en  $\text{fg}\cdot\text{cellule}^{-1}$  combinée à la densité cellulaire.

La souche T-4cl3 a donc été considérée comme la souche sur-productrice de Fx et la souche T-5cl6 comme la souche sous-productrice de Fx.

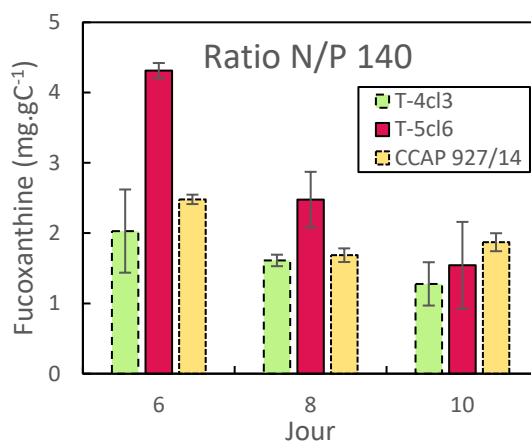


Figure 59. Concentration de fucoxanthine par C intracellulaire ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de C) dans les cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) cultivées au ratio N/P 140 sur le banc de phénotypage.



### 3.2. Influence de l'intensité lumineuse : cultures de 1 L

Suite à l'expérience en cultures de 350 mL sur le banc de phénotypage, le ratio N/P de 4.5 avec des concentrations de 1200  $\mu\text{M}$  en N et 267  $\mu\text{M}$  en P a été choisi pour la suite des expériences du projet TINAQUA. Le double objectif de l'expérience suivante était de cultiver T-4cl3 et T-5cl6 (et la souche témoin CCAP 927/14) en augmentant le volume de culture et en accentuant l'écart d'accumulation de Fx des cellules entre les deux souches clonales. Comme expliqué dans le Chapitre 1, section 3.6.2 (la fucoxanthine ; les paramètres de culture ; la lumière), l'intensité lumineuse joue un rôle primordial dans la synthèse et l'accumulation de Fx dans les cellules. Une intensité plus faible favorise la production de pigments photosynthétiques, comme la Fx. Ainsi, T-4cl3 a été cultivée à 250  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  tandis que T-5cl6 a été cultivée à une intensité deux fois plus élevée soit 500  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ . Nous avons constaté que les cultures de T-4cl3 étaient plus orangées que les cultures de T-5cl6 qui étaient verdâtres jusqu'au jour 3 puis jaune foncé jusqu'au jour 7 (Figure 60). La souche CCAP 927/14 a été cultivée aux deux intensités lumineuses pour pouvoir comparer les résultats.

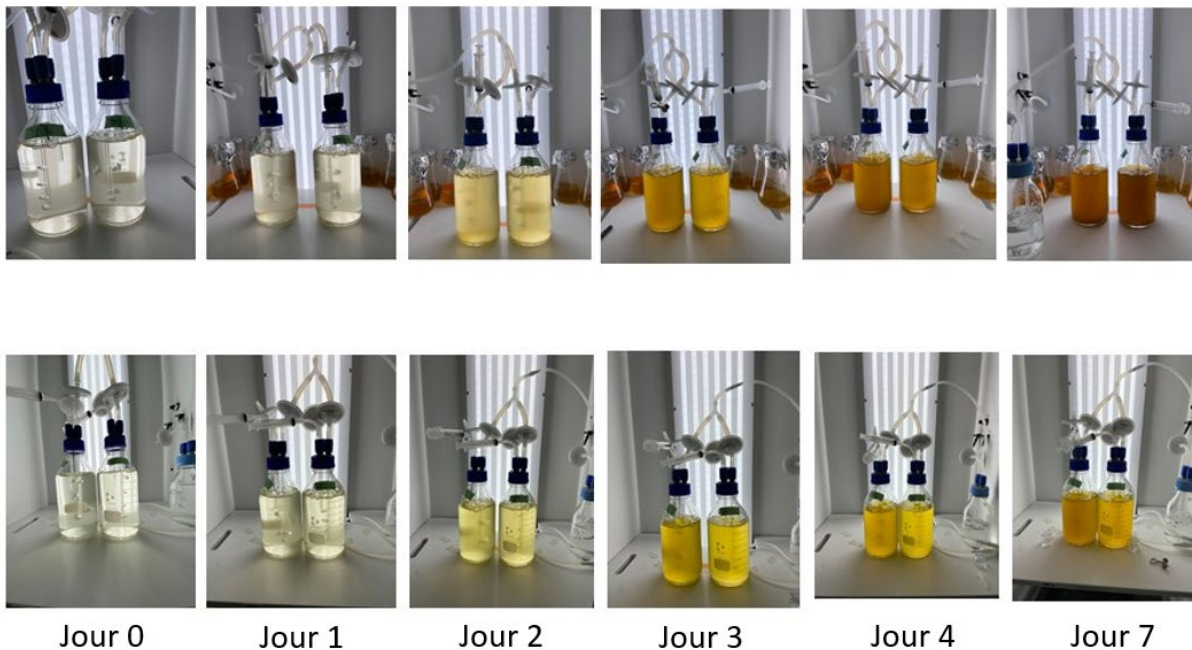
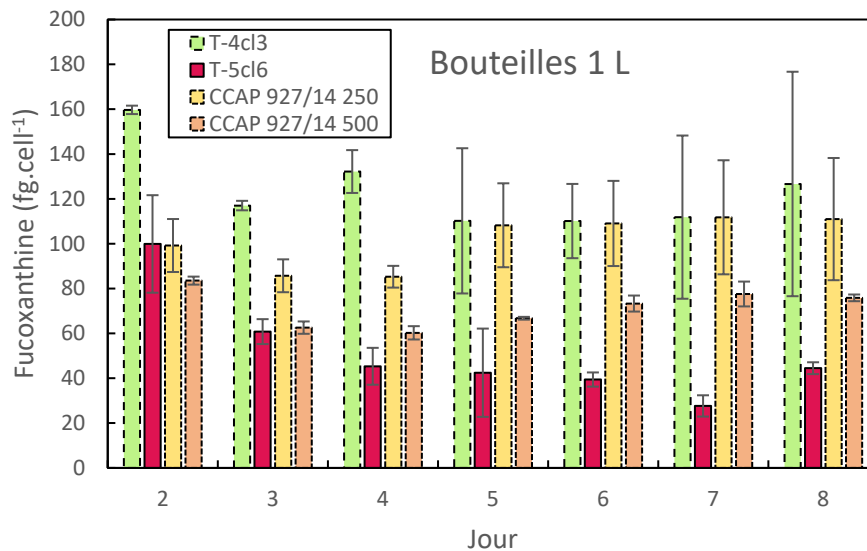


Figure 60. Photo des cultures en bouteilles de 1 L des souches T-4cl3 (photos supérieures) et T-5cl6 (photos inférieures) entre le jour 0 et le jour 7.

En premier lieu, nous avons observé que les valeurs de Fx par cellule de la souche CCAP 927/14 cultivée à 250 et 500  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  étaient respectivement plus faibles et plus élevées que celles des souches T-4cl3 et T-5cl6 après trois jours de culture, et ce jusqu'au jour 8 (Figure

61). La souche CCAP 927/14 ne s'est donc pas substituée aux deux autres souches clonales en tant que sur-productrice ou sous-productrice de Fx.



**Figure 61.** Concentration de fucoxanthine par cellule ( $\text{fg}\cdot\text{cell}^{-1}$ ) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de  $250 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ), T-5cl6 (rouge : intensité de  $500 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) et CCAP 927/14 (jaune : intensité de  $250 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ; orange : intensité de  $500 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ). Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en bouteilles de 1 L.

Au deuxième jour de culture, les cellules de T-4cl3 contenaient  $160 \text{ fg}\cdot\text{cellule}^{-1}$  de Fx tandis que les cellules de T-5cl6 en contenaient  $100 \text{ fg}\cdot\text{cellule}^{-1}$ . T-4cl3 a donc accumulé 1.6 fois plus de Fx que T-5cl6 au jour 2. Après 8 jours de culture, cet écart s'est creusé, T-4cl3 a accumulé  $127 \text{ fg}\cdot\text{cellule}^{-1}$  de Fx soit 2.9 fois plus que T-5cl6 qui en a accumulé  $44 \text{ fg}\cdot\text{cellule}^{-1}$ . Cependant, ce résultat est contrasté par une forte variabilité biologique traduite par un écart-type de la valeur de Fx par cellule chez T-4cl3 au jour 8 plus élevé. De manière générale, les deux souches clonales ont accumulé plus de Fx dans les cultures en bouteille de 1 L que dans les cultures de 350 mL du banc de phénotypage. Si ce résultat est cohérent pour la souche T-4cl3, qui a été cultivée à une intensité moins élevée, il est plus étonnant pour T-5cl6 ayant été cultivée à une intensité plus élevée que celle du banc de phénotypage. Cela peut s'expliquer par le fait que le diamètre des bouteilles de 1 L était plus élevé que celui des PBRs du banc de phénotypage, ce qui a pu limiter l'accès à la lumière des cellules malgré l'agitation par bullage. Au final, le fait de cultiver les souches à des intensités lumineuses différentes a donc bien permis d'accentuer la sur-production de Fx chez T-4cl3.

L'écart entre la concentration cellulaire des deux souches clonales T-4cl3 et T-5cl6 était réduit par rapport aux cultures du banc de phénotypage (Tableau 13), tandis que la différence de diamètre moyen d'une cellule était toujours importante (Tableau 13). Par conséquent, la fraction volumique de la biomasse dans les bouteilles de culture était différente entre les deux souches (Tableau 13) contrairement à l'expérience précédente où elle était similaire.

**Tableau 13. Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3 et T-5cl6 au ratio N/P de 4.5 dans des bouteilles de 1 L aux jours 6, 7 et 8. Fraction volumique ( $\text{mm}^3$  de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ ) =  $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (\text{diamètre}_{r/2})^3 \cdot \text{Concentration cellulaire}$ .**

Jour	Diamètre moyen d'une cellule ( $\mu\text{m}$ )		Concentration cellulaire (cellules. $\text{mL}^{-1}$ )		Fraction volumique ( $\text{mm}^3$ de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ )	
	T-4cl3	T-5cl6	T-4cl3	T-5cl6	T-4cl3	T-5cl6
6	4.22	3.52	$1.37^{\text{E}+07}$	$1.54^{\text{E}+07}$	0.54	0.35
7	4.32	3.67	$1.40^{\text{E}+07}$	$1.52^{\text{E}+07}$	0.59	0.39
8	4.35	3.69	$1.40^{\text{E}+07}$	$1.53^{\text{E}+07}$	0.60	0.40

Pour le projet TINAQUA, il était donc également intéressant de considérer, dans le cas de cultures en plus grand volume, la différence de production de Fx en mg par litre de culture ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) entre les deux souches (Figure 62). On observe que la concentration en Fx a progressivement augmenté dans les culture de la souche T-4cl3 entre le jour 2 et le jour 8, passant de de  $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $1,75 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dans les cultures de la souche T-5cl6 l'augmentation a été moins importante, avec  $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$  de Fx au jour 2 à  $0,67 \text{ mg.L}^{-1}$  au jour 8. Ces données ont confirmé la pertinence dans le choix de la souche T-4cl3 en tant que sur-productrice de Fx et de la souche T-5cl6 en tant que sous-productrice de Fx.

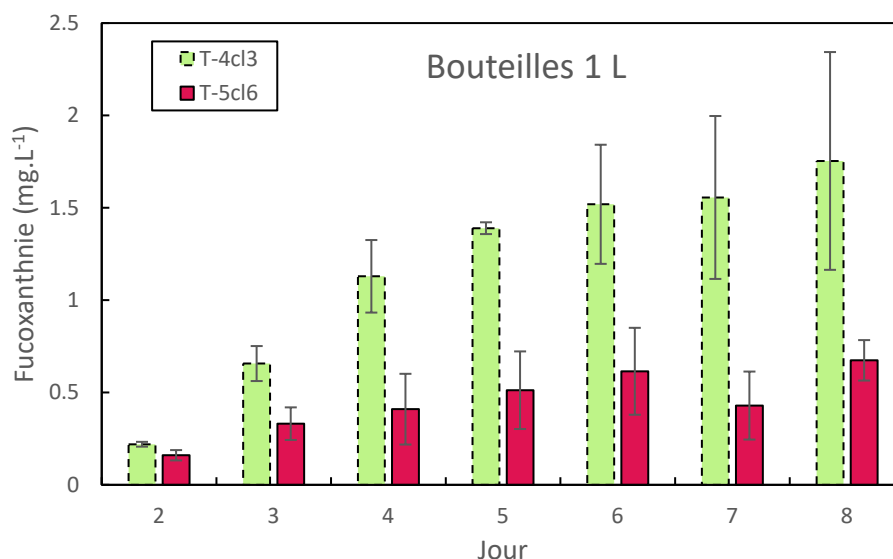


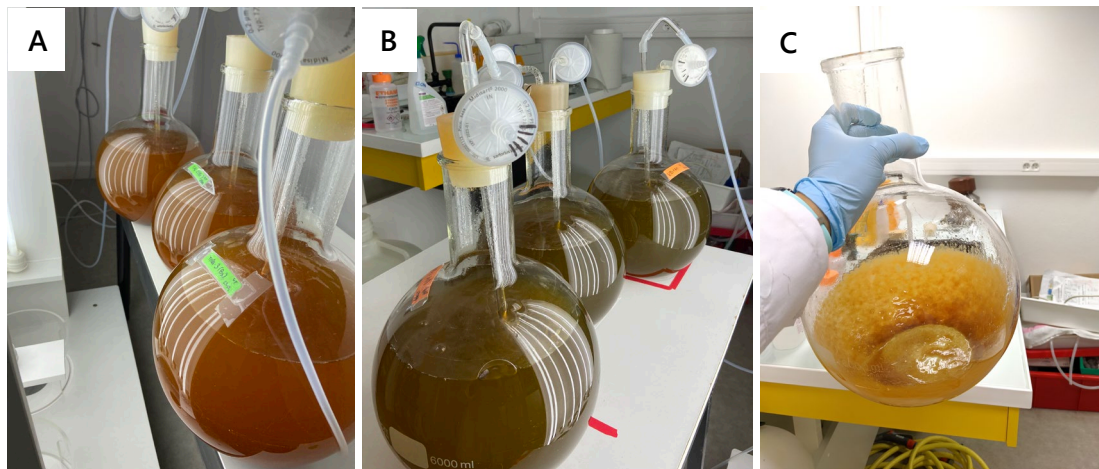
Figure 62. Concentration de fucoxanthine (mg.L<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 250  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en bouteilles de 1 L.

### 3.3. Une plus grande échelle pour la production de fucoxanthine : cultures de 6 L

La culture des souches T-4cl3 et T-5cl6 en volume de 1 L a montré qu'accentuer respectivement la sur-production ou la sous-production de Fx était possible en ajustant l'intensité lumineuse. L'objectif était ensuite de cultiver ces deux souches en volume plus élevé, en conservant les différentes intensités lumineuses incidentes définies dans l'expérience précédente. Considérant les méthodes de culture de la station IFREMER de Bouin, il a été décidé de cultiver les microalgues dans des ballons de culture de 6 L. Ces mêmes ballons ont été utilisés par la suite à ensemencer des scobalites de 300 L prélevés pour nourrir les huîtres. Pour des raisons pratiques, la souche CCAP 927/14 a été cultivée en ballons de 6 L à 350  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> dans le seul but d'ensemencer des scobalites pour obtenir de la biomasse utilisée dans la suite de la thèse (Chapitre 5). Les résultats obtenus pour cette souche seront tout de même présentés en parallèle de T-4cl3 et T-5cl6 et pourront être discutés.

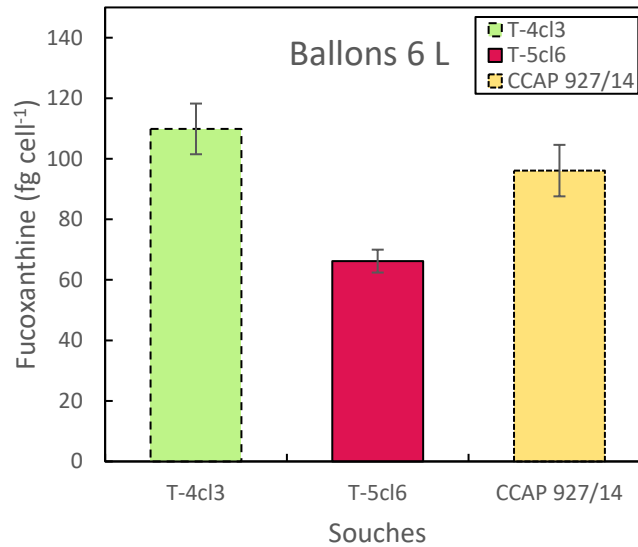
Une nette différence de coloration est observée entre les deux souches en fin de culture, au jour 7 (Figure 63). Les cultures de T-4cl3 apparaissaient orange tandis que les cultures de T-5cl6 étaient verdâtres. De plus, en fin de culture, le fond des ballons de T-4cl3 était tapissé d'un

mucus visqueux, supposé être des EPS comme dans les deux expériences précédentes (Figure 63).



**Figure 63.** Photo des triplicats de culture en ballons de 6 L de T-4cl3 (A, intensité de 250  $\mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) et de T-5cl6 (B, intensité de 500  $\mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ), après 7 jours de culture. Photo d'un ballon de 6 L de T-4cl3 vidé en fin de culture, et contenant un épais mucus visqueux probablement composé d'EPS (C).

Les analyses pigmentaires ont indiqué qu'il y avait 1.7 fois plus de Fx dans les cultures de T-4cl3 à 250  $\mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$  par rapport aux cultures de T-5cl6 à 500  $\mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$  (Figure 64). C'est le même rapport que lors de la première expérience en banc de phénotypage dans les cultures de 350 mL, lorsque l'intensité lumineuse était similaire pour les deux souches (350  $\mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ). Par conséquent, la différence d'intensité lumineuse incidente ne semble pas avoir accentué la différence d'accumulation de Fx entre les deux souches clonales dans les cultures en ballons de 6 L. Elle n'a pas permis de compenser l'effet du diamètre important des ballons, qui a pu limiter l'accès à la lumière des cellules et qui a probablement réduit l'écart d'accumulation de Fx entre les deux souches.



**Figure 64.** Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 250  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et CCAP 927/14 (jaune : intensité de 350  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) après 7 jours de culture. Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en ballons de 6 L.

La concentration cellulaire des cultures des souches T-4cl3 et CCAP 927/14 au jour 7 était similaire aux deux précédentes expériences en plus faible volume de culture, tandis que celle de la souche T-5cl6 était plus faible (Tableau 14). Le taux de croissance de la souche T-5cl6 a donc diminué dans les cultures en ballon de 6 L. Nous avons remarqué par ailleurs que le diamètre des cellules de T-5cl6 (4.50  $\mu\text{m}$ , Tableau 14) était beaucoup plus élevé que dans l'expérience précédente en bouteille de 1 L (3.67  $\mu\text{m}$ , Tableau 13). Il est connu que lorsque la lumière est transmise uniformément à travers une culture de microalgues, la taille de l'antenne collectrice de lumière diminue tandis que lorsque la lumière devient moins accessible par les cellules, elle augmente [478]. La taille élevée des cellules de T-5cl6 pourrait donc être une conséquence de la limitation par la lumière, qui aurait généré une augmentation de la taille des chloroplastes. Ce phénomène entraîne ainsi l'augmentation de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-5cl6 (0.48 mm<sup>3</sup>.mL<sup>-1</sup>, Tableau 14), pourtant moins concentrées en cellules par rapport à l'expérience précédente (fraction volumique de 0.40 mm<sup>3</sup>.mL<sup>-1</sup>, Tableau 13). Ces résultats amènent à s'interroger sur le fait que la disponibilité de la lumière pourrait être un facteur plus impactant que la variabilité intra-spécifique des souches sur l'accumulation de Fx dans les cellules.

**Tableau 14.** Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 dans les ballons de 6 L au jour 7 de culture. Fraction volumique ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) =  $4/3 \cdot \pi \cdot (\text{diamètre}/2)^3 \cdot \text{Concentration cellulaire}$ .

Diamètre moyen d'une cellule ( $\mu\text{m}$ )			Concentration cellulaire (cellules.mL <sup>-1</sup> )			Fraction volumique (mm <sup>3</sup> de biomasse.mL <sup>-1</sup> )		
T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14
4.24	4.50	4.01	1.89 <sup>E</sup> +07	9.97 <sup>E</sup> +06	2.05 <sup>E</sup> +07	0.75	0.48	0.69

Lors d'une erreur de manipulation avec d'autres ballons de culture de 6 L, les deux souches clonales T-4cl3 et T-5cl6 ont été échangées. Ainsi, la souche T-4cl3 a été cultivée à l'intensité la plus faible soit 250  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et la souche T-5cl6 a été cultivée à l'intensité la plus forte soit 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Pour cette expérience, un suivi quotidien de l'accumulation de Fx a été effectué (Figure 65) dont les résultats ont montré une quasi-absence de différence d'accumulation de Fx entre les deux souches. À partir du jour 6 de culture, la tendance s'est même inversée par rapport aux résultats des expériences précédentes, l'accumulation de Fx dans les cellules de T-5cl6 était devenue supérieure à celle dans les cellules T-4cl3 (Figure 65). Au jour 7 de cette expérience (Figure 65), T-5cl6 a accumulé autant de Fx que T-4cl3 au jour 7 de l'expérience précédente (Figure 64), soit 110 fg.cell<sup>-1</sup>. L'écart entre les deux souches n'était cependant pas aussi marqué que dans l'expérience précédente, lorsque T-4cl3 était cultivée à la plus faible intensité et T-5cl6 à la plus forte. Au maximum, T-5cl6 accumulait seulement 1.3 fois plus de Fx que T-4cl3 (jour 7). Ce résultat est à nuancer en raison d'une importante variabilité biologique sur la valeur de Fx de T-5cl6.

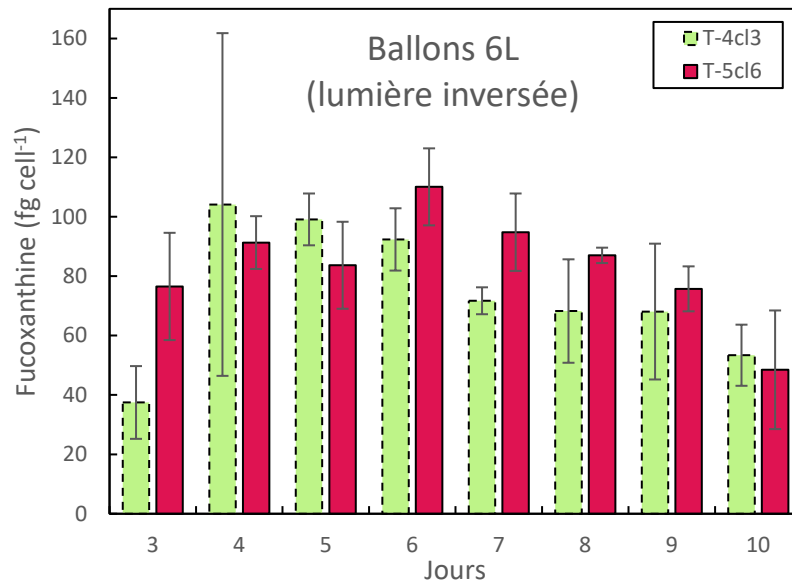


Figure 65. Concentration de fucoxanthine par cellule (fg.cell<sup>-1</sup>) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), T-5cl6 (rouge : intensité de 250  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) après 7 jours de culture. Les deux souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en ballons de 6 L.

Cette expérience menée par erreur aura permis de valider que l'intensité de la lumière incidente, combinée à la disponibilité de la lumière dans la culture, est réellement un facteur majeur pour l'accumulation de Fx dans les cellules, au-delà de la différence entre les souches. La synthèse de Fx est donc favorisée lorsque la lumière incidente est faible et que la géométrie du PBR est telle qu'elle limite fortement l'accès à la lumière des cellules.

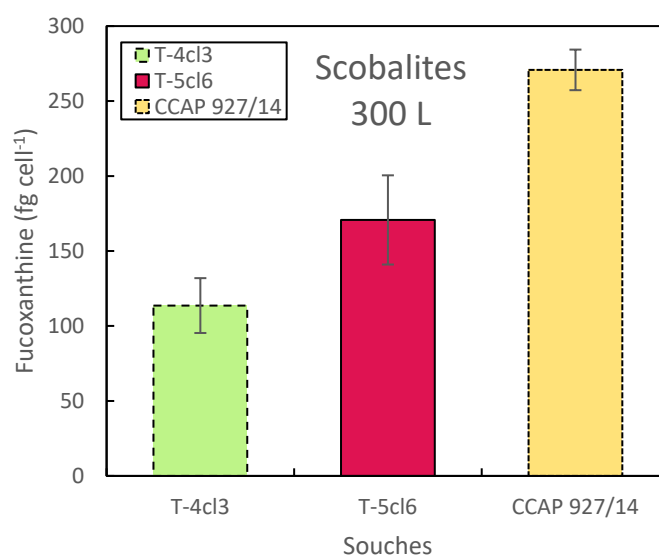
### 3.4. Influence d'un photobioréacteur de type scobalite : cultures de 300 L

Les ballons de culture de l'expérience précédente (avec T-4cl3 cultivée à 250  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et T-5cl6 cultivée à 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) ont été utilisés pour ensemercer les scobalites de 300 L à hauteur de 250 000 cellules.mL<sup>-1</sup>. Pour cette expérience, la souche T-5cl6 a été cultivée à une intensité inférieure par rapport aux deux précédentes expériences, les tubes fluorescents étant au maximum de leurs capacités. Le protocole a donc été adapté en diminuant en parallèle l'intensité lumineuse pour les cultures de T-4cl3.

Étonnamment, on observe que la souche T-4cl3 est celle dont les cellules ont accumulé le moins de Fx soit 113 fg.cellules<sup>-1</sup>(Figure 66), cette valeur étant similaire à celle obtenue en cultures en ballons de 6 L (110 fg.cellules<sup>-1</sup>). La souche T-5cl6, pourtant cultivée à une intensité lumineuse plus élevée, a accumulé 1.5 fois plus de Fx que la souche T-4cl3 cultivée à une



intensité lumineuse plus faible, soit  $170 \text{ fg.cellules}^{-1}$ . De plus, cette valeur est 2.6 fois plus élevée que dans les cultures en ballons de 6 L de T-5cl6. En premier lieu, nous savons que T-5cl6 a été cultivée à une intensité inférieure aux expériences précédentes, il est donc cohérent que les cellules aient synthétisé plus de Fx. En parallèle, on observe également que la souche CCAP 927/14 a accumulé  $271 \text{ fg.cellules}^{-1}$  de Fx dans les cultures en scobalites (Figure 66), ce qui est 2.8 fois plus élevé que dans les cultures en ballons de 6 L. Contrairement à T-5cl6, la souche CCAP 927/14 a été cultivée à une intensité lumineuse similaire à celle appliquée aux ballons de 6 L. Ainsi, d'autres facteurs que l'intensité incidente doivent être pris en compte afin de justifier d'une telle différence entre les cultures en ballons et les cultures en scobalites pour les souches T-5cl6 et CCAP 927/14.



**Figure 66.** Concentration de fucoxanthine par cellule ( $\text{fg.cell}^{-1}$ ) dans les cultures de T-4cl3 (vert : intensité de  $200 \mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ), T-5cl6 (rouge : intensité de  $320 \mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) et CCAP 927/14 (jaune : intensité de  $320 \mu\text{mol de photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) après 7 jours de culture. Toutes les souches ont été cultivées au ratio N/P de 4.5 en scobalites de 300 L.

Il existe plusieurs manières d'obtenir une culture plus concentrée en Fx : (i) Avoir un maximum de biomasse en optimisant l'accès à la lumière. Après quelques jours de culture, l'auto-ombrage des cellules entraîne une augmentation de la synthèse de Fx. Ce phénomène est obtenu, par exemple, dans les PBRs plans [314]. À grande échelle de production cependant, ce système peut être problématique car il nécessite beaucoup d'espace pour peu de volume de culture. (ii) Avoir une faible disponibilité de la lumière incidente dans les cultures. La disponibilité de la lumière étant limitante pour la croissance, la concentration en biomasse est

minimisée [479], mais les cellules synthétisent rapidement plus de Fx. Dans notre expérience, la concentration cellulaire des cultures des trois souches au jour 7 était plus faible que dans les trois expériences précédentes en plus faible volume de culture, le taux de croissance a donc diminué en augmentant le volume de culture (Tableau 15). Le diamètre important du scobalite (60 cm) a limité l'accessibilité de la lumière dans la culture, ce qui a limité la croissance cellulaire. Ce phénomène est par ailleurs visible à l'œil nu car au jour 7, les scobalites ont une couleur très foncée alors qu'ils ne sont que peu concentrés en cellules (Figure 54). De plus, la taille des cellules de T-5cl6 était, contrairement aux deux premières expériences en volume de 350 mL et 1 L, plus importante que celle des cellules de T-4cl3 (Tableau 15). De ce fait, la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-5cl6 et de la souche CCAP 927/14 était supérieure à celle de T-4cl3, ce qui a réduit d'autant plus la disponibilité de la lumière en comparaison. L'accumulation de Fx dans les cultures de T-5cl6 et de CCAP 927/14 correspond donc au cas (ii).

La souche T-4cl3 semble cependant ne pas avoir été affectée par la disponibilité réduite de lumière dans les scobalites. Ce résultat est étonnant, bien que l'expérience précédente en ballons de 6 L ait déjà conduit à reconsidérer la notion de souche sur-productrice et sous-productrice.

**Tableau 15. Calcul de la fraction volumique de la biomasse dans les cultures de T-4cl3, T-5cl6 et CCAP 927/14 dans les scobalites de 300 L au jour 7 de culture. Fraction volumique ( $\text{mm}^3$  de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ ) =  $\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (\text{diamètre}/2)^3 \cdot \text{Concentration cellulaire}$ .**

Diamètre moyen d'une cellule ( $\mu\text{m}$ )			Concentration cellulaire (cellules. $\text{mL}^{-1}$ )			Fraction volumique ( $\text{mm}^3$ de biomasse. $\text{mL}^{-1}$ )		
T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14	T-4cl3	T-5cl6	CCAP 927/14
3.80	4.19	4.43	$8.05^{\text{E}+06}$	$8.29^{\text{E}+06}$	$7.07^{\text{E}+06}$	0.23	0.32	0.32

### 3.5. Présence d'échinénone dans les cultures de T-4cl3

Tout au long des quatre expériences, nous avons remarqué la présence d'échinénone principalement dans les cultures de la souche T-4cl3 tandis que la souche T-5cl6 en a, à l'inverse, accumulé très peu (Figure 67). Dans les cultures du banc de phénotypage, plus les cellules étaient limitées en phosphore, plus la concentration d'échinénone augmentait jusqu'à atteindre  $112 \text{ fg.cellule}^{-1}$  pour T-4cl3 au ratio N/P de 140 au jour 8, soit la valeur maximale des quatre expériences confondues (Figure 67, A). On remarque également que plus le volume de culture augmentait, plus la concentration d'échinénone dans les cellules diminuait. Ces résultats suggèrent qu'avec l'augmentation du diamètre des PBRs engendrant une diminution de la disponibilité de la lumière en plus grand volume de culture, il n'était alors pas nécessaire pour les cellules d'activer leurs mécanismes de photoprotection dont fait partie l'échinénone, comme expliqué au Chapitre 3. De plus, à partir des cultures en bouteilles de 1 L, l'intensité lumineuse incidente était plus faible pour la souche T-4cl3. Ainsi, en scobalite de 300 L, la concentration d'échinénone pour la souche T-4cl3 était de  $1 \text{ fg.cellule}^{-1}$ , soit 50 fois moins qu'en culture de 350 mL au même ratio N/P.

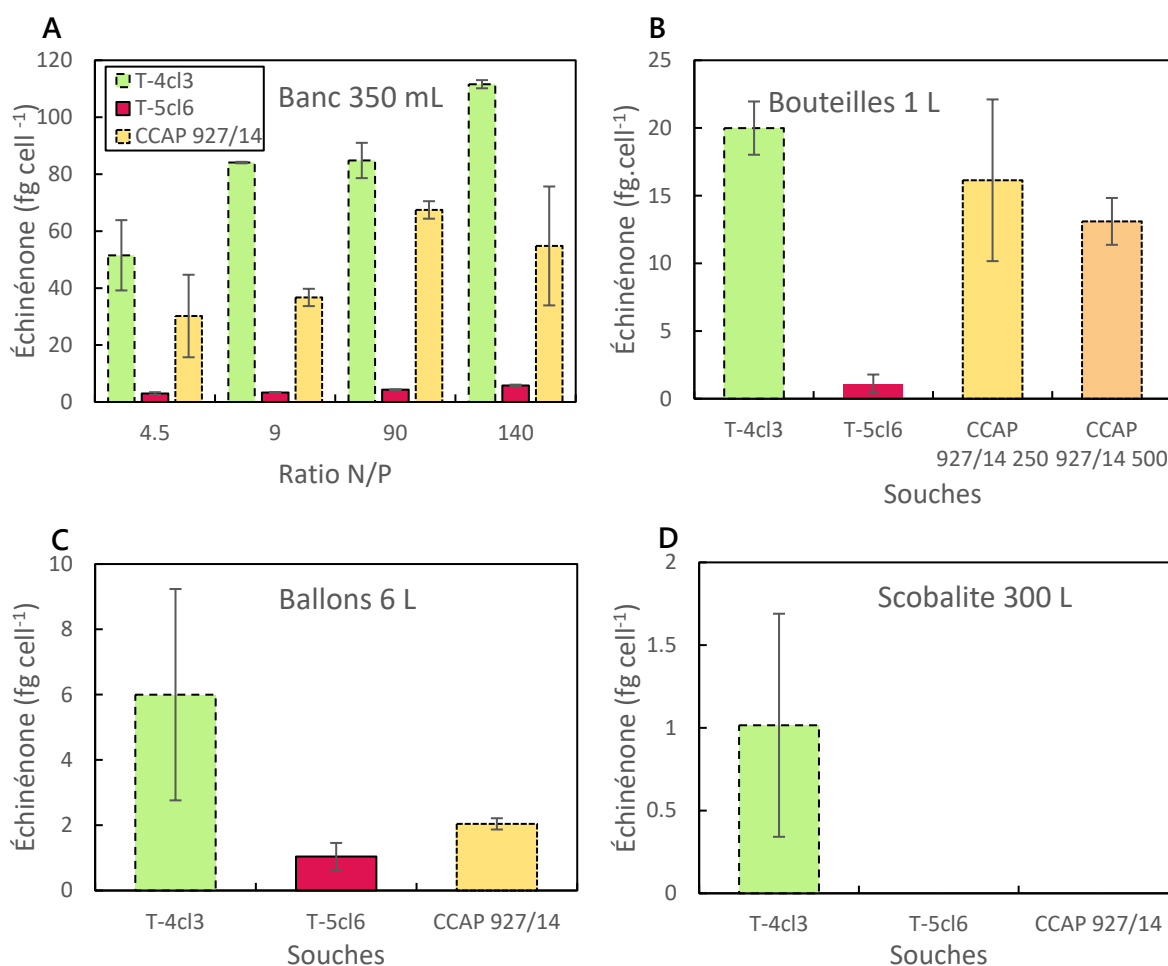


Figure 67. Concentration d'échinénone par cellule ( $\text{fg}\cdot\text{cell}^{-1}$ ) dans les cultures de T-4cl3 (vert), T-5cl6 (rouge) et CCAP 927/14 (jaune) au jour 8. A : cultures de 350 mL aux ratios N/P de 4.5, 9, 90 et 140 sur le banc de phénotypage, à une intensité de  $350 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ . B : cultures en bouteilles de 1 L au ratio N/P de 4.5, avec T-4cl3 cultivée à  $250 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , T-5cl6 cultivée à  $500 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , CCAP 927/14 cultivée aux deux intensités. C : cultures en ballons de 6 L au ratio N/P de 4.5 aux mêmes intensités que les bouteilles (sauf la souche CCAP 927/14, cultivée à  $300 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ). D : cultures en scobalites de 300 L au ratio N/P de 4.5 avec T-4cl3 cultivée à  $200 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , T-5cl6 et CCAP 927/14 cultivées à  $320 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### 4. Conclusion

Après la première expérience sur le banc de phénotypage, nous avons réussi à atteindre un des objectifs du projet TINAQUA qui était de d'augmenter l'échelle de culture jusqu'aux scobalites de 300 L pour la souche T-4cl3, caractérisée comme sur-productrice de Fx, et pour la souche T-5cl6, caractérisée comme sous-productrice de Fx. Au final cependant, la souche ayant accumulé le plus de Fx en conditions de production en scobalites est la souche CCAP 927/14, déjà utilisée et cultivée en routine à Bouin pour nourrir les huîtres. Pour obtenir une

culture pauvre en Fx, il serait nécessaire de cultiver *T. lutea* (souche T-4cl3 ou T-5cl6) avec une lumière incidente beaucoup plus élevée sur les scobalites, ou bien de changer de système de culture afin de réduire l'effet de limitation par la disponibilité en lumière dû au diamètre. Cependant, les résultats de notre expérience en scobalites ont montré un coefficient de 2.4 entre l'accumulation de Fx chez la souche CCAP 927/14 et chez la souche T-4cl3. Il peut donc être intéressant de tester dans un premier temps une nutrition riche en Fx avec la souche CCAP 927/14 par rapport à une nutrition pauvre en Fx avec la souche T-4cl3.

En conclusion, malgré les différences importantes observées en faible volume de culture, le facteur de disponibilité de la lumière semble, dans notre cas, surpasser l'influence de l'utilisation de différentes souches de *T. lutea*. Les quatre expériences menées nous ont ainsi permis de mieux comprendre la réponse physiologique des cellules à leur environnement nutritif et lumineux.

---

# CHAPITRE 5

---

Optimisation d'un procédé d'extraction  
et de purification de la fucoxanthine



## Chapitre 5 – Optimisation d'un procédé d'extraction et de purification de la fucoxanthine

Ce chapitre présente un résumé des résultats valorisés dans l'article « *Improving fucoxanthin extraction and purification from *Tisochysis lutea* using centrifugal partition chromatography* » (en phase finale de révision par les co-auteurs pour une soumission dans le journal *Bioresource Technology*). Il comporte un résumé du matériel et des méthodes utilisés ainsi qu'un résumé des résultats principaux décrits dans l'article in prep., présenté en fin de chapitre.

### 1. Contexte et objectifs

De nombreuses méthodes d'extraction de la Fx et de co-extraction de la Fx et des lipides, à partir d'algues brunes et de microalgues, existent dans la littérature. Ces extraits sont soit réalisés à partir de macroalgues brunes soit à partir de microalgues (Chapitre 1, Tableau 2). L'utilisation de solvants organiques avec macération de la biomasse est très répandue (voir Chapitre 1, section 3.7). En particulier, l'éthanol (EtOH) le méthanol (MeOH) et l'acétone (Ac) permettent d'obtenir des taux d'extraction élevés de pigments dont la Fx. Ils remplacent efficacement un grand nombre de solvants toxiques à la fois pour l'environnement et pour la santé humaine. Dans un but industriel, en pharmaceutique par exemple, la Fx peut devoir être purifiée des autres pigments, métabolites et résidus cellulaires. Plusieurs techniques de séparation et de purification sont décrites dans la littérature, une des plus innovantes étant la chromatographie de partage centrifuge (CPC). Ce procédé est basé sur la différence de partition d'un soluté entre deux phases liquides non miscibles. La CPC est rapide, ne nécessite pas l'utilisation de volumes importants de solvants, se déroule à température ambiante et n'entraîne pas de dégradation des solutés. La CPC est donc considérée comme un procédé efficace et respectueux de l'environnement. Jusqu'ici, seulement deux études ont rapporté l'utilisation de la CPC pour la séparation de la Fx [79,378]. En particulier, Gonçalves de Oliveira-Júnior et al. ont séparé la Fx à partir de biomasse de *T. lutea* [79]. Ils ont conclu que ces premiers résultats étaient très encourageants et nécessitaient d'être optimisés. Notre étude est basée sur leurs travaux et consiste à séparer la Fx par CPC. L'objectif principal est de développer une méthode d'extraction et de séparation de la Fx à partir de biomasse de *T. lutea* qui soit (i) plus respectueuse des principes de la chimie verte parmi les douze qui ont été décrits en 2010 [480], et (ii) qui permette de maintenir ou d'améliorer le rendement et la pureté en Fx. Plusieurs



paramètres ont été sélectionnés pour l'optimisation du procédé, tels que le solvant utilisé pour extraire la totalité des pigments, et le système de solvants de la CPC formant deux phases non-miscibles.

## 2. Matériel et méthodes

La biomasse de *T. lutea* utilisée pour cette étude a été extraite d'une culture de la souche CCAP 927/14 en scobalite de 300 L (voir Chapitre 4, section 2.1.4.). Brièvement, 1 g de biomasse a été extrait dans 250 mL d'Ac ou d'EtOH avec une sonde à ultrasons (US) pendant 30 minutes en mode « pulse » (5 secondes ON / 5 secondes OFF). L'extrait a ensuite été centrifugé et filtré sur 0.2 µm avant d'être évaporé et stocké à -20°C. Puis, 100 mg de l'extrait ont été dilués dans un volume égal de phase stationnaire et de phase mobile, soit les deux phases non-miscibles de la CPC. L'extrait dilué a été injecté dans la CPC en même temps que la phase mobile. Nous avons utilisé une FCPC A 200 (Kromaton) composée d'une colonne de capacité 242 mL contenant 840 cellules de partage *twin-cells* en mode descendant, à 1200 rpm. Dans le système biphasique de solvants, la phase supérieure a été définie comme la phase stationnaire et la phase inférieure comme la phase mobile. La phase mobile a ensuite été éluée en récoltant des fractions de 5 mL contenant les pigments. Puis, la phase stationnaire a été extrudée en récoltant également des fractions de 5 mL. Toutes les fractions ont ensuite été analysées en HPLC et HPTLC pour déterminer leur concentration en pigments et évaluer leur pureté finale en Fx. La phase mobile était constituée soit de MeOH et d'H<sub>2</sub>O soit d'EtOH et d'H<sub>2</sub>O, la phase stationnaire était constituée de cyclohexane.

Au total, quatre expériences principales ont été conduites :

- Expérience A : extrait Ac, système de solvant cyclohexane :MeOH :H<sub>2</sub>O en proportions 6 :6 :1.

Les résultats de l'expérience A ayant été encourageants, l'objectif suivant était de se rapprocher des principes de la chimie verte. Le MeOH de la phase mobile a été remplacé par de l'EtOH, un solvant plus respectueux de l'environnement et possédant une polarité similaire.

- Expérience B : extrait Ac, système de solvant cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O en proportions 6 :6 :1.

L'objectif principal de l'expérience suivante était d'éliminer les impuretés des fractions de Fx, soit les Chl *c*1 et *c*2. Considérant que ces dernières présentaient une polarité supérieure aux molécules de Fx, nous avons augmenté la polarité de la phase mobile en ajoutant de l'eau en plus grande proportion que dans l'expérience B.

- Expérience C : extrait Ac, système de solvant cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O en proportions 2 :2 :1.

Une fois le système de solvants optimisé, l'objectif était de continuer à développer le procédé selon les principes de la chimie verte. Ainsi, un extrait éthanolique de pigments totaux a été testé à la place de l'extrait acétone pour la séparation de la Fx.

- Expérience D : extrait EtOH, système de solvant cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O en proportions 2 :2 :1.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Extraction des pigments totaux

Dans un premier temps, les pigments totaux ont été extraits avec de l'Ac ou de l'EtOH. Pour l'expérience A, un premier extrait à l'Ac à 307 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche a été utilisé, contenant 14,38 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche de Fx. Pour les expériences B et C, un second extrait à l'Ac à 295 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche a été utilisé, contenant 16,17 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche de Fx. Enfin, pour l'expérience D, un extrait EtOH à 387 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche a été utilisé, contenant 13,54 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche de Fx. L'extrait EtOH contenait donc moins de Fx que les extraits Ac et probablement plus de lipides et/ou de débris cellulaires.

#### 3.2. Séparation de la fucoxanthine

Parmi les fractions de 5 mL de phase mobile récoltées de l'expérience A, trois étaient les plus enrichies et les plus pures en fucoxanthine, jusqu'à 79% de pureté HPLC (c'est à dire, de pureté par rapport aux autres pigments mais sans tenir compte des lipides également présents dans la fraction). Ce pourcentage est supérieur au pourcentage de 65,7% des fractions enrichies en Fx de Gonçalves de Oliveira-Júnior et al. [79]. La majorité des impuretés dans ces fractions étaient de la Chl *c* qui a été éluée en même temps que la Fx. Le système cyclohexane :MeOH :H<sub>2</sub>O (6 :6 :1 v :v :v) utilisé était stable, il y eu peu de perte de phase stationnaire et pas d'émulsion de surface dans les fractions. Cependant, dans le but de favoriser

l'utilisation de solvants dits verts, le MeOH a été remplacé par de l'EtOH absolu pour les expériences suivantes. Ce solvant a une polarité similaire au MeOH et n'est pas non plus miscible dans le cyclohexane. Pour l'instant, il n'a pas été possible de trouver un solvant pour remplacer le cyclohexane qui soit plus respectueux de l'environnement et tout aussi apolaire. En effet, l'apolarité du cyclohexane a permis de séparer toute la Chl *a* qui est présente en grande quantité dans l'extrait. Prendre le risque de ne pas la séparer entièrement avec un solvant moins apolaire pourrait impacter la pureté des fractions de Fx.

Dans l'expérience B, avec les mêmes proportions volumiques de solvants dans le nouveau système cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O (6 :6 :1), trois fractions étaient enrichies en Fx, avec une pureté HPLC jusqu'à 87%, ce qui est mieux que l'expérience A. L'élution de la Chl *c* était plus amont de l'élution de la Fx par rapport à l'expérience A. Le système de solvants était également stable, avec peu de perte de phase stationnaire et pas d'émulsion.

Dans l'expérience C, les proportions volumiques du système cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O ont été changées de 6 :6 :1 à 2 :2 :1 afin d'optimiser la polarité du système. Les Chl *c* étant plus polaires que la Fx, augmenter la polarité de la phase mobile en ajoutant de l'H<sub>2</sub>O pourrait permettre aux Chl *c* d'avoir une meilleure affinité avec la phase mobile et ainsi avoir une meilleure séparation de ces pigments. Neuf fractions enrichies en Fx ont été obtenues, avec une pureté HPLC jusqu'à 97%. Les Chl *c* ont été éluées avant la Fx, et la Fx s'est plus partagée entre les deux phases mobile et stationnaire par rapport aux expériences A et B. Le système de solvants était relativement moins stable car une émulsion a été observée en surface des fractions ainsi qu'une perte de phase stationnaire. Cependant après décantation, l'émulsion s'est dissipée.

Dans l'expérience D, l'extrait Ac a été remplacé par un extrait EtOH afin de contribuer à rendre le procédé plus respectueux de l'environnement. Le précédent système cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O (2 :2 :1) a été utilisé. Seize fractions enrichies en Fx ont été obtenues, dont neuf fractions à 100% de pureté HPLC, et toutes les autres entre 92% et 99%. La stabilité du système était similaire à celle de l'expérience C. La combinaison d'un extrait EtOH avec ce système de solvant s'est révélée plus performante que les précédentes expériences. De plus, ces résultats démontrent qu'il n'y a pas besoin d'ajouter d'étape supplémentaire après la CPC pour séparer la Fx efficacement des autres pigments.

### 3.3. Optimisation de la quantité de solvant d'extraction

Jusqu'ici, le volume de solvant d'extraction utilisé était de 250 mL (soit 200 g) pour 1 g de biomasse sèche de *T. lutea*. À l'échelle industrielle, ce volume est très important et serait difficilement réalisable économiquement. De plus, les grandes quantités d'EtOH utilisées (si le procédé d'extraction est effectivement basé sur l'EtOH) pourraient contrebalancer le soin apporté à rendre le procédé plus respectueux de l'environnement. Des quantités plus faibles d'EtOH ont donc été testées pour l'extraction d'1 g de biomasse sèche : 99 g, 49 g, 19 g, 9 g.

La concentration et la proportion de Fx les plus élevées (16,37 mg.g<sup>-1</sup> et 4,9 %) ont été obtenues avec la plus faible quantité d'EtOH (9 g pour 1 g de biomasse sèche). Plus de Fx a donc été obtenue en l'extrayant avec 20 fois moins de solvant. Ce résultat est très prometteur pour une montée en échelle de l'ensemble du procédé, notamment parce qu'aucune autre difficulté supplémentaire n'a été rencontrée lors des différentes étapes d'extraction à cette forte concentration de biomasse.

## 4. Conclusion

Cette étude a montré qu'il était possible d'utiliser la CPC comme méthode fiable pour séparer efficacement et à un grand degré de pureté la Fx d'un extrait de pigments totaux. L'optimisation de la méthode développée par Gonçalves de Oliveira-Júnior et al. [79] s'est révélée très encourageante. Le MeOH dans la phase mobile du système de solvants a pu être remplacé par l'EtOH tout en améliorant la séparation de la Fx des impuretés telles que les Chl *c*. Puis, l'ajout d'H<sub>2</sub>O a permis de rendre plus polaire la phase mobile et ainsi d'obtenir des fractions enrichies en Fx à un haut degré de pureté. L'utilisation d'un extrait EtOH dans le système cyclohexane :EtOH :H<sub>2</sub>O (2 :2 :1) en CPC a permis d'obtenir les meilleurs résultats en termes de quantité de Fx extraite, et en termes de pureté de la Fx par rapport à l'utilisation d'un extrait acétone. Ces résultats sont donc extrêmement prometteurs pour le développement d'un processus industriel d'extraction et de séparation de la Fx.

Par ailleurs, ce travail a permis de développer une méthode respectant plus de principes de la chimie verte, décrits ci-dessous :

- « Prévention » : moins de déchets.

- « Synthèses chimiques moins dangereuses & Solvants et composés auxiliaires plus sûrs » : utilisation de solvants moins toxiques pour l'environnement.
- « Concevoir des produits chimiques plus sûrs » : toxicité minimisée tout en maintenant simultanément la fonction et l'efficacité du procédé.
- « Efficacité énergétique du procédé » : procédé effectué à température et pression ambiantes, courte durée du procédé de CPC.
- « Réduire les dérivés » : peu d'étapes depuis l'obtention de biomasse sèche jusqu'à la séparation de la Fx.

## 5. Article : Improving the extraction and the purification of fucoxanthin from *Tisochrysis lutea* using centrifugal partition chromatography.

Article in prep. : Pajot, A.; Chollet, S.; Nicolau, E.; Marchal, L. Improving the extraction and the purification of fucoxanthin from *Tisochrysis lutea* using centrifugal partition chromatography. *Bioresource Technology*, 2022

### 5.1. Introduction

*Tisochrysis lutea*, or *Isochrysis affinis galbana*, is a well-known golden-brown microalga belonging to the Chromista group and the division of haptophytes. This species was first isolated from Tahiti (French Polynesia), a tropical environment [68]. Because of its high content in polyunsaturated fatty acids, like the docosahexaenoic acid (DHA), and its high amounts of carotenoid pigments, *T. lutea* is of a great value in different application fields. In aquaculture, this species is commonly used to feed the bivalve hatcheries [19,20]. In the field of biotechnologies, the numerous properties of several *T. lutea* compounds are sought after in the nutrition and pharmacological industries [427,428]. Xanthophyll pigments in particular are highly valuable and their production ability is investigated. These carotenoids possess a unique chemical structure distinct from carotenes as they contain oxygen, an epoxide group, and a conjugated carbonyl group, which confer them high anti-oxidant properties [481,482]. In 1990, the molecular structure of fucoxanthin, a xanthophyll, was fully described for the first time [177] and revealed the presence of an unusual allenic bond. This peculiarity is likely to be at the origin of the wide range of nutraceutical and pharmaceutical properties of fucoxanthin which are anti-cancerous, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-obesity, anti-diabetes, anti-Alzheimer [178–183]. More recently, fucoxanthin protective effects against neurodegeneration, heart valve calcification, macular degeneration were also studied [243,248,249].

Currently, the scalable extraction and purification of fucoxanthin is an environmental and economical challenge. The use of conventional methods with hazardous and toxic organic solvents has been shown to be very effective, but is no longer in line with the current need for processes more respectful of green chemistry principles. For instance, a mixture of tetrahydrofuran and dichloromethane was reported to be the best solvent system for fucoxanthin separation from the chloroplast membrane [341], but if these solvents are efficient at lab-scale sample preparation for analysis, they are not recommended for process scale

extraction or purification [483]. Medium polarity solvents like methanol (MeOH) or ethanol (EtOH) are usually preferred especially EtOH that is safer to use, more environmental-friendly and they were demonstrated to have high performance on fucoxanthin extraction [310,337]. Other environmental-friendly methods that efficiently extract fucoxanthin were proposed in the literature [173], such as the use of edible oils [337], ionic liquids [359], natural deep-eutectic solvents [361,362,364], subcritical or supercritical fluids [337,340,341,350].

Following extraction and according to further application, fucoxanthin need to be purified from other pigments and some cell residues co-extracted.

Two methods emerge in the literature for fucoxanthin purification, both of them based on liquid-liquid partitioning, one on highly selective solvent systems and the other one on highly efficient extraction technology. The first one uses alcohol-aqueous two-phases systems for single stages extractions, implying the use of water and non-polluting solvents/salts, with high fucoxanthin recovery and purification yields [377]. The second one uses Centrifugal Partition Chromatography (CPC) column, which is a technique based on the partition difference of solutes such as fucoxanthin between two immiscible liquid phases [79]. This separation process is here convenient as it minimizes the amount of solvents to be effective. CPC is conducted at room temperature and provides a complete sample recovery without any degradation of the separated solutes [79,173]. Two studies reported the use of CPC for fucoxanthin separation so far [79,378]. Gonçalves de Oliveira-Junior *et al.* managed to isolate fucoxanthin from *T. lutea* with a purity superior to 65% with a two steps process: one extraction of total pigments with EtOH and one CPC run with MeOH, H<sub>2</sub>O and cyclohexane [79]. Coupled with flash chromatography, they managed to reach >99% HPLC purity.

Through this paper, we aim to develop a green method of fucoxanthin extraction and purification from *T. lutea*, optimizing recovery and purity. We used solid-liquid extraction and CPC liquid-liquid fractionation for direct fucoxanthin enrichment. We worked especially on the solvent used for the total pigment extraction, the organic solvent composition of the two immiscible phases and the process operating conditions of the CPC.

## 5.2. Material and methods

### 5.2.1. Culture of *Tisochrysis lutea* and biomass harvesting

*T. lutea* strain CCAP 927/14 was cultivated in batch mode in three 300L scobalites enriched with Walne's medium at a continuous irradiance of  $250\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Biomass was harvested when cultures reached  $7\text{E}+06\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$  after seven days of culture, using a disc stack centrifuge (GEA Westfalia Separator Industry) at 10,000rpm during approximately  $300\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  using a peristaltic pump. Biomass was then lyophilized and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use.

### 5.2.2. US-assisted extraction of pigments

According to Gonçalves de Oliveira-Junior et al. [79], 1g of lyophilized biomass was dispersed into 250mL of (i) acetone (95% acetone, 5% absolute ethanol) or (ii) ethanol (absolute ethanol, EtOH). Two acetone extractions and one ethanol extraction were performed for the four conducted experiments.

Usually, the sonication-assisted extraction is used for diatoms possessing a silica frustule [484]. Despite *T. lutea* does not possess one, this species is covered with thin calcified scales forming a dense layer [68]. Furthermore, because fucoxanthin is attached to proteins and other pigments such as chlorophylls, the complex being anchored inside the membrane, the pretreatment of algal biomass can improve the fucoxanthin extraction [301,337,338]. Thus, the sonication is helpful in the pigment extraction process of this species.

Under constant stirring with a magnetic bar, an ultrasonic (US) probe (BIOBLOCK SCIENTIFIC, Vibracell™ 75022) was used at 12MHz, 30W, for 5s pulse cycles during 30min. The US generates heat that can engender the thermal degradation of pigments within the solution. Then, the extraction was entirely performed with ice around the glass-beaker used for extraction. Furthermore, to avoid the light degradation of pigments, the laboratory light was switched off during the entire process. After US extraction, the extract was centrifuged 5min at 8,000g to remove cellular debris (membranes, proteins, etc). The supernatant, containing the pigments and most of the lipids, was filtered using a 0.2mm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter before being transferred into a 500mL distillation flask. The flask was partially immersed into a water bath at  $40^{\circ}\text{C}$ , to favor the evaporation without thermally degrading pigments. The solvent was evaporated using an evaporator (BUCHI Rotavapor RII) during 45 to 120min at 70mbar for the



absolute EtOH and 240mbar for acetone. At the end of the evaporation, 4-5mL of solvent (acetone or EtOH) were used to re-dilute the extract. 5mL of highly concentrated extract were then obtained and transferred into an amber vial to evaporate the remaining solvent under nitrogen during a few hours and then kept at -20°C until further use.

We finally obtained three final extracts, named Ac-extract1, Ac-extract2 and EtOH-extract (acetone or EtOH solvent), representing 30 to 40% of the initial biomass,

### 5.2.3. Centrifugal partition chromatography

Pigments separation was performed on a FCPCA 200 (Kromaton, Annonay, France). The 242mL column consists in 840 twin-cells in series, coupled with a Puriflash 5.250 (Interchim). The CPC method was operated in Descending Mode, *i.e.* the upper phase of the liquid-liquid biphasic system was the stationary phase (SP) and the lower phase was the mobile phase (MP).

The biphasic system was a cyclohexane / alcohol / water one. We compared methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) in different volume proportions with water. Table 16 summarizes the four experiments with the three solvent systems tested in our work.

**Table 16. Type of extract and volume proportions of the three solvent systems used for CPC**

Experiment	Extract	Cyclohexane	MeOH	EtOH	Water
A	Ac-extract1	6	6	-	1
B	Ac-extract2	6	-	6	1
C	Ac-extract2	2	-	2	1
D	EtOH-extract	2	-	2	1

The CPC column was filled with stationary phase first, and then equilibrated with mobile phase at 1,200rpm with a constant flow rate at 10mL.min<sup>-1</sup>. The retention ( $S_r$ ) of the stationary phase (SP) in the column volume ( $V_c$ ) was different for each solvent system and each extract, so it was calculated as follow:

$$S_f\% = \frac{V_{SP}}{V_C}$$

With:

$$V_{SP} = V_C - V_{MP}$$

$V_{MP}$  was directly measured as the flushed volume of stationary phase during equilibrium, minus the dead volume in pipes and pump.

The  $S_f$  of each experiment were:

- A.  $S_f = 81\%$  ( $V_{SP} = 242-45 = 197 \pm 2\text{mL}$ )
- B.  $S_f = 71\%$  ( $V_{SP} = 242-70 = 172 \pm 2\text{mL}$ )
- C.  $S_f = 65\%$  ( $V_{SP} = 242-85 = 157 \pm 2\text{mL}$ )
- D.  $S_f = 76\%$  ( $V_R = 242-59 = 183 \pm 2\text{mL}$ )

100mg of extract were solubilized into 10mL composed of equal volumes of upper stationary phase and lower mobile phase. The solution was manually injected through a 10mL injection loop. At the column outlet, fractions of 5mL were collected during the DM elution until reaching  $V_C$ , *i.e.* approximately 48 fractions. They were numbered from the first fraction containing pigments. Then, the CPC was set up in AM at the same flow rate for the SP extrusion (the stationary phase volume is then recovered without mixing and can be fractionated), fractions were also collected every 5mL.

The equilibrium partitioning coefficient of fucoxanthin ( $K_{D, Fx}$ ) was calculated as follows:

$$V_{R, Fx} = V_M + K_{D, Fx} * V_{SP}$$

$$i.e. K_{D, Fx} = \frac{V_{R, Fx} - V_M}{V_{SP}}$$

With  $V_{R, Fx}$  the retention volume of Fx,  $V_M$  the volume of the mobile phase eluted before the first fraction was collected,  $V_{SP}$  the volume of the stationary phase within the column.

#### 5.2.4. HPLC analyses

Pigments were analysed by HPLC-UV-DAD (Agilent Technologies series 1200 HPLC-UV-DAD) using an Eclipse XDB-C8 reverse phase column (150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  particle size, Agilent) following the method described by Van Heukelem & Thomas (2001). Briefly, solvent A was

70:30 MeOH: H<sub>2</sub>O 28 mM ammonium acetate and solvent B was pure MeOH. Gradient elution was the same as described in Van Heukelem & Thomas (2001). Quantification was carried out using external calibration against pigments standard provided by DHI, Denmark.

Fx content was calculated from HPLC chromatogram after normalization with a calibration curve obtained with a commercial standard of Fx. The purity of Fx in each fraction was calculated considering the other pigments analyzed by HPLC and did not include the lipids.

### 5.3. Results and Discussion

#### 5.3.1. Characterization of the total pigments extract

##### Extraction yield

First, pigments were directly extracted from the lyophilized biomass with acetone. This solvent was tested as a reference one as it is widely used in our laboratory and known to be very efficient in extracting all pigments. The pigment extraction yield of the first acetone extract (Ac-extract1) was 31%, *i.e.* 307mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub>. The pigment extraction yield of the second acetone extract (Ac-extract2) was 30%, *i.e.* 295mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub> showing the reproducibility of the extraction method.

EtOH is evaluated as an environmental-friendly solvent and then a greener substitute to acetone. The pigment extraction yield of the ethanolic extract was 39%, *i.e.* 387mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub>. The global extraction yield was higher with absolute EtOH.

It is known that acetone and ethanol extracts of both *T. lutea* and *P. tricornutum* contain many pigments and lipids, that they are not very selective solvents and that another step would be required to purify the pigments ((Ryckebosch et al., 2014, Delbrut et al., 2018; Fajardo et al., 2007; Kim et al., 2012).

##### Pigment concentration of the extract

HPLC analyses were performed to determine the pigments concentration in each extract (Table 17). In total, pigments represent 4,41% of the biomass in Ac-extract1, 4,21 % in Ac-extract2, and 4,36% in EtOH-extract. Results include the Chl *c* MGDG, which represents Chl *c* residues linked to the sugar moiety of a monohexosyldiacylglycerol (MGDG), as it was already observed in *Emiliania huxleyi*, a haptophyte and close species to *T. lutea* [486]. The EtOH-extract contains the same quantity of pigments than acetone ones (40mg.g<sup>-1</sup> approx). The Fx content is

13,5mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub> (13,8mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub> in the duplicate), slightly lower than Ac-extracts (14,4mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub> and 16,2mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub>). EtOH is as efficient as acetone for pigment extraction but it seems to be less selective (pigments represents 11% of extracted DW, vs 14% for acetone), containing then more impurities.

**Table 17. Concentration of chlorophyll c1 + c2 (Chl c), Fucoxanthinol (FxOH), fucoxanthin (Fx), violaxanthine (Vx), diadinoxanthine (Ddx), diatoxanthine (Dtx), monohexosyldiacylglycerol Chl c (Chl c MGDG), chlorophyll a (Chl a) and  $\beta$ -carotene ( $\beta$  car) in (mg.g<sup>-1</sup> DW) in the three extracts used for the separation experiments.**

Extract	Chl c	FxOH	Fx	Vx	Ddx	Dtx	Chl c MGDG	Chl a	$\beta$ car	Total
(mg.g <sup>-1</sup> DW)										
Ac-extract1	3.45	0.04	14.38	0.02	2.06	0.53	0.72	22.04	0.87	44.1
Ac-extract2	3.35	0.05	16.17	0.02	2.10	0.57	0.74	18.26	0.79	42.1
EtOH- extract	4.82	0.04	13.54	0.03	2.08	0.52	0.75	21.05	0.76	43.6

### 5.3.2. CPC fractionation of acetone extract

#### Experiment A

The first CPC experiment was carried out with cyclohexane:MeOH:H<sub>2</sub>O after acetone extraction (experiment A, table 1). After 100 mL elution of mobile phase ( $V_{MP}$ ), fractions were collected. On the Fig 1.B, fractions from n°1 to 40 correspond to the elution of the mobile phase. Fractions from 1 to 11 contain most of the pigments: Chl c, Fx, Ddx, Dtx, FxOH, Vx, Chl c MGDG. Among them, fractions n°2, 3 and 4 (bold rectangular on Fig 1.A) are the most concentrated in Fx, with the highest purity of 79% for fraction n°3 and 4 (Table 18). They contained impurities such as Chl c1, Chl c2 and Ddx. The process did not allow to separate Chl c1 and c2 (pooled as Chl c) from Fx as the main Chl c fractions were also the n°2, 3 and 4 (Figure 68 B). Fraction n°3 and 4 also contained Ddx (Figure 68 A,B). In comparison, Gonçalves de Oliveira-Júnior et al. (2020) obtained Fx-enriched fractions with a maximum purity of 65.7% after a single CPC run, with Chl c1 and Chl c2 being also the major impurities. In our results, the retention volume of Fx, according to Figure 68 B was 115 mL ( $V_{R,Fx}$ ). The next fractions from n°5 to 40 were dark yellow

to light yellow and were mainly composed of Ddx, Chl *c* MGDG, and traces of Fx. We noticed a very little loss of stationary phase in these fractions n°1 to 40 (visually corresponding to a thin layer of cyclohexane at the surface), and no surface emulsion. The solvent system was thus relatively stable. Fractions n°42 to 51 were collected during the extrusion of the stationary phase and contained  $\beta$ -carotene and Chl *a*. Overall, this first CPC conditions allowed the separation of the most polar pigments from the non-polar ones.

$K_{D,Fx,A}$  was 0.11 (calculated with  $V_{R,Fx} = 115$  mL,  $V_M = 100$  mL,  $V_S = 142$  mL, see 5.2.3), which indicated that Fx was predominantly present in the mobile phase. As all xanthophyll pigments, and contrary to other carotenoids such as  $\beta$ -carotene, Fx is composed of hydroxyl groups (OH). Even if Fx is a relatively non-polar metabolite, this characteristic is however responsible for a higher polarity of this molecule compared with  $\beta$ -carotene and Chl *a*, which are completely non-polar. Thus, Fx was logically eluted in the most polar phase, *i.e.* the mobile phase, containing MeOH.

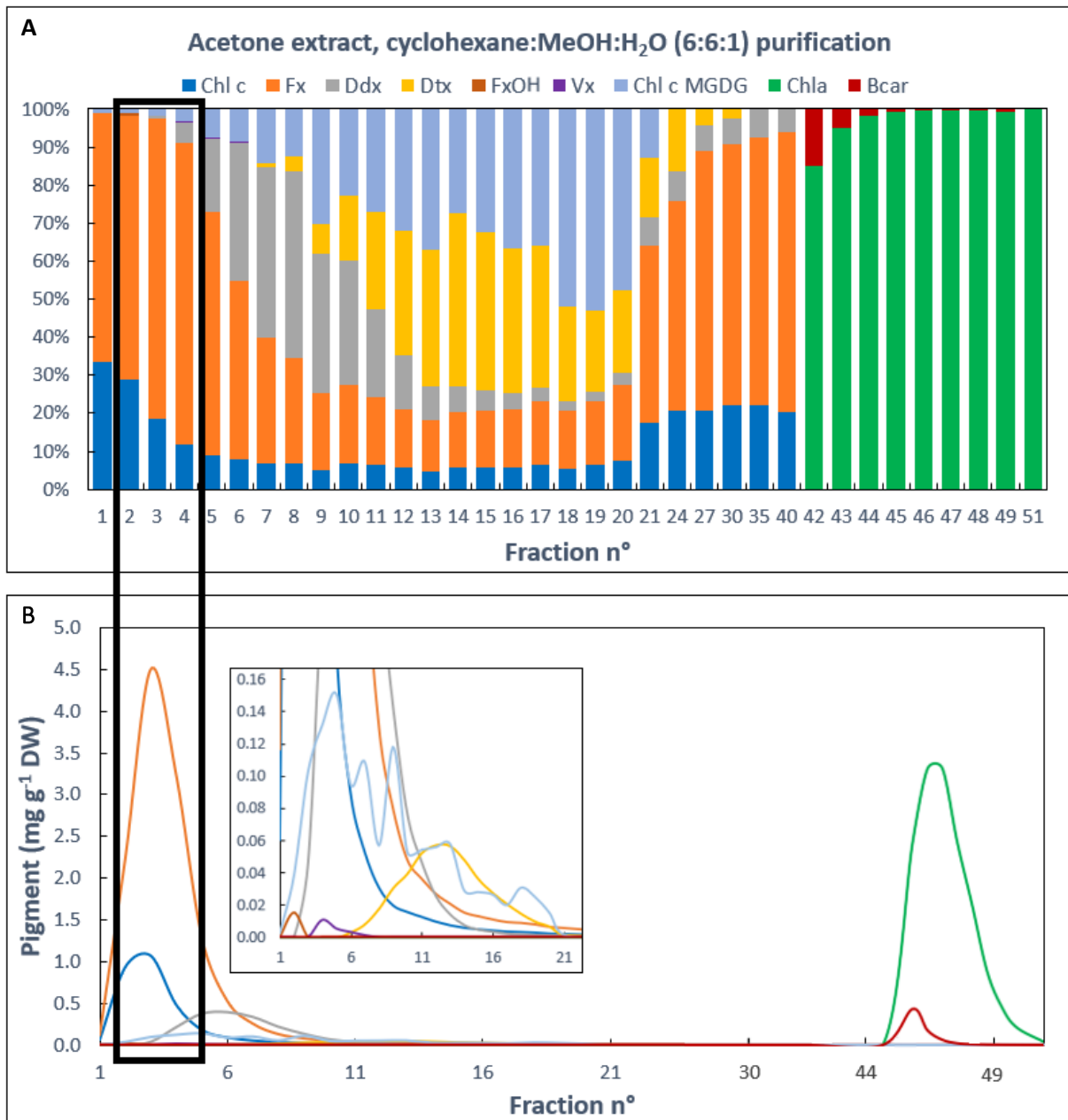


Figure 68. Characterization of the fractions collected from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract1), using the cyclohexane:MeOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment A). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup>DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.

**Table 18. Concentration of pigments in the ten fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}\text{DW}$ ), from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract1), using the cyclohexane:MeOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment A). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.**

Fraction n°	(mg g <sup>-1</sup> DW)									
	Chl <i>c</i>	FxOH	Fx	Vx	Ddx	Dtx	Chl <i>c</i> MGDG	Chl <i>a</i>	βcar	% Fx
1	0.06	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	65 %
2	0.93	0.02	2.22	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	69 %
3	1.07	0.00	4.49	0.00	0.05	0.00	0.10	0.00	0.00	79 %
4	0.48	0.00	3.23	0.01	0.22	0.00	0.13	0.00	0.00	79 %
5	0.18	0.00	1.28	0.01	0.38	0.00	0.15	0.00	0.00	64 %
6	0.09	0.00	0.53	0.00	0.40	0.00	0.09	0.00	0.00	47 %
7	0.05	0.00	0.25	0.00	0.34	0.01	0.11	0.00	0.00	33 %
8	0.03	0.00	0.13	0.00	0.23	0.02	0.06	0.00	0.00	28 %
9	0.02	0.00	0.08	0.00	0.14	0.03	0.12	0.00	0.00	20 %
10	0.02	0.00	0.05	0.00	0.08	0.04	0.05	0.00	0.00	21 %

### Experiment B

Results obtained in experiment A were encouraging, and the next objective was multiple: separate the major impurities Chl *c1* and *c2* in Fx-enriched fractions and develop a greener process (EtOH in spite of MeOH and less solvent consumption).

Several operating conditions were sequentially tested such as modifying the flow rate from 10 to 20 mL.min<sup>-1</sup>, or the ascending mode instead of descending mode. These tests resulted in the destabilization of the system with the appearance of emulsion, the loss of stationary phase, and above all less purity in Fx-enriched fractions.

Solvent substitution: Cyclohexane has a high logP<sub>oct</sub> of 3.44. This property is essential for fractionation as it allowed to efficiently separate the non-polar pigments Chl *a* and β-carotene. However, we did not manage to find a solvent which was more environment-friendly with a close logP<sub>oct</sub>. EtOH replaced MeOH in the mobile phase as it is an environmental-friendly

solvent which is bio-sourced. Despite EtOH is slightly less polar than MeOH, its partitioning between cyclohexane and water is lower ( $\log P_{\text{oct}} \text{EtOH} = 0.32$ ,  $\log P_{\text{oct}} \text{MeOH} = 0.70$ ), leading to a different selectivity of the ternary system. The system was cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O in the same 6:6:1 v:v:v proportions than experiment A.

After 100 mL elution of mobile phase only ( $V_{\text{MP}}$ ), fractions were collected from n°1 to 45. Fractions n°1 to 20 corresponded to the elution of the mobile phase. Despite the replacement of MeOH by EtOH, the whole solvent system seemed stable as no significant loss of stationary phase nor emulsion were observed in these fractions. As for experiment A, mobile phase fractions between 1 and 11 contained most of the pigments (Chl *c*, Fx, Ddx, Dtx, FxOH, Vx, Chl *c* MGDG). 3 interesting Fx-enriched fractions were obtained, n°3, 4 and 5 (Figure 69 A, B). The purity in Fx reached 87% in fraction n°4 (Table 19), which was higher than 79% purity in fractions n°3 and 4 of experiment A. Chl *c*1 and *c*2 were still the major impurities of these fractions. However, we observed in Figure 69 B that the retention time of the Chl *c* pool was slightly shorter than the one of Fx in experiment B compared with experiment A (Figure 69 B). Rare traces of Chl *a* were found in some fractions of the mobile phase (n°1, 2, 7, 8, 9) but not in the Fx-enriched fractions. Fractions n°21 to 45 corresponded to the elution of the stationary phase (cyclohexane). Contrary to experiment A,  $\beta$ -carotene was eluted first and distinctly from Chl *a*.

$K_{\text{D},\text{Fx},\text{B}}$  was 0.19 which indicated that Fx was still predominantly present in the mobile phase but was slightly more partitioned between the two phases than for experiment A ( $K_{\text{D},\text{Fx},\text{A}} = 0.11$ ). However, as observed in the fractions, the selectivity gain was not sufficient to separate the major pigment impurities, Chl *c*1 and *c*2.



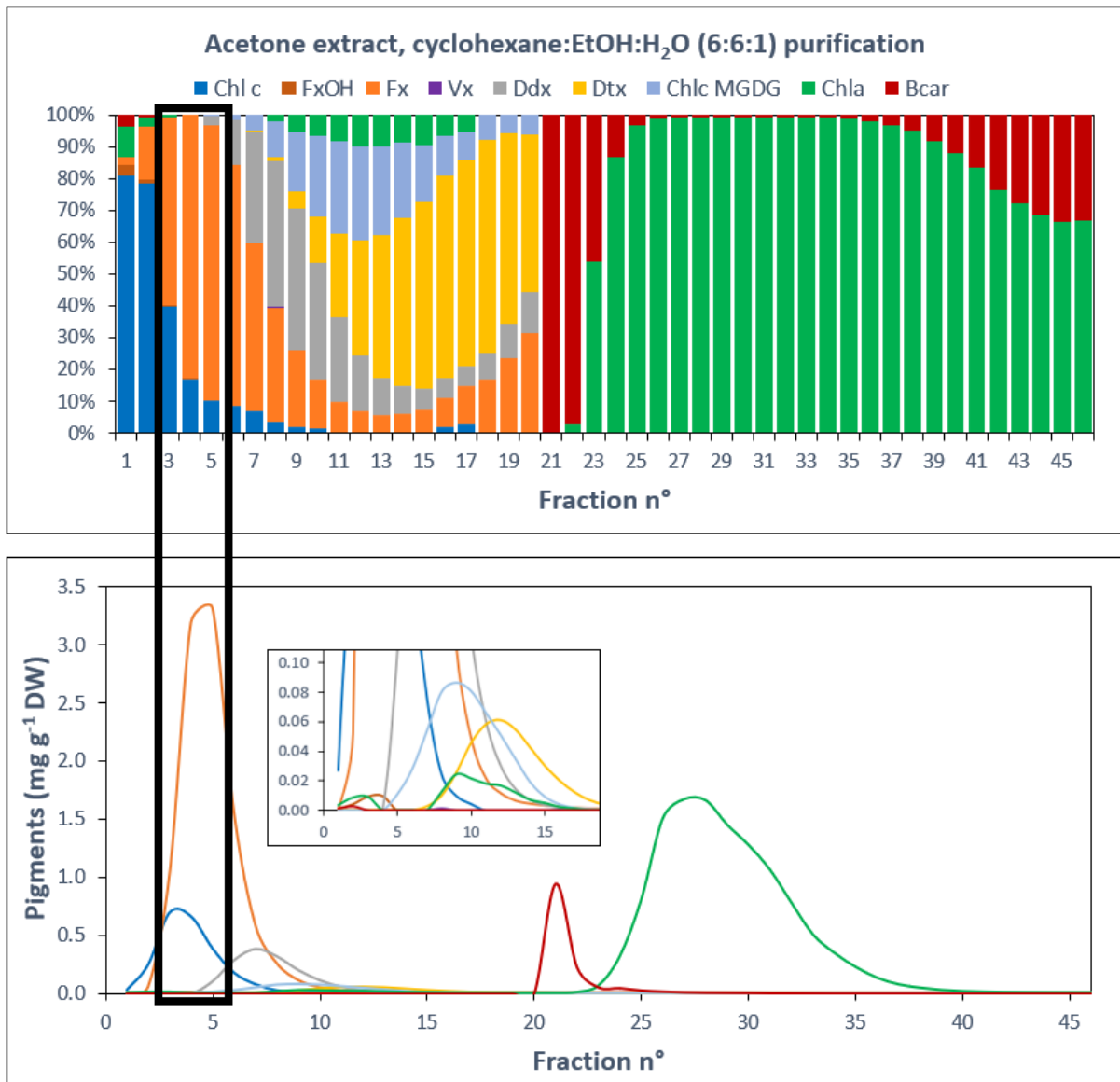


Figure 69. Characterization of the fractions collected from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment B). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup> DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.

**Table 19. Concentration of pigments in the nine fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$  DW), from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 6:6:1 v:v:v proportions (experiment B). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.**

Fraction n°	(mg g <sup>-1</sup> DW)									
	Chl <i>c</i>	FxOH	Fx	Vx	Ddx	Dtx	Chl <i>c</i> MGDG	Chl <i>a</i>	βcar	% Fx
1	0.24	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	17 %
2	0.69	0.01	1.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	59 %
3	0.66	0.01	3.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	83 %
4	0.39	0.00	3.31	0.00	0.11	0.00	0.01	0.00	0.00	87 %
5	0.18	0.00	1.56	0.00	0.29	0.00	0.03	0.00	0.00	76 %
6	0.08	0.00	0.58	0.00	0.39	0.00	0.05	0.00	0.00	53 %
7	0.02	0.00	0.25	0.00	0.32	0.01	0.08	0.01	0.00	36 %
8	0.01	0.00	0.11	0.00	0.21	0.03	0.09	0.02	0.00	24 %
9	0.00	0.00	0.05	0.00	0.12	0.05	0.08	0.02	0.00	15 %

### Experiment C

The solvent combination of cyclohexane, EtOH and H<sub>2</sub>O provided a better synergistic effect on the Fx separation than the combination of cyclohexane, MeOH and H<sub>2</sub>O. To optimize the separation of Fx from other pigments in Ac-extract2, within this new solvent system, the objective was to adjust the polarity. Indeed, Fx and Chl *c1* and *c2* were eluted at the same time in experiment B, whereas Chl *c1* and Chl *c2* are more polar than Fx [487]. With the previous two experiments, we observed that increasing the polarity of the mobile phase resulted in a better Fx separation. Thus, we tested an increase in polarity of the mobile phase by increasing H<sub>2</sub>O proportion from 1:12 (cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O, 6:6:1 v:v:v) to 1:4 (cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O, 2:2:1 v:v:v). The most polar molecules such as Chl *c1* and Chl *c2* might have a better affinity for the mobile phase which will be more polar, while the less polar molecules such as Fx will probably partition more with the non-polar phase.

After 85 mL elution of mobile phase only ( $V_{MP}$ ), fractions were collected from n°1 to 46. Fractions n°1 to 24 corresponded to the elution of the mobile phase and the pigments are present from fraction 1 to 19. In these fractions, an important emulsion was observed with approximately 1mL of stationary phase lost in each 5mL fraction. The solvent system seemed therefore less stable. However, the emulsion is not stable and dissipated after decantation and the two phases present in each fraction became distinct. The stationary phase above was almost colorless, therefore did not contain a high concentration of pigments. Only the mobile phase of each fraction was collected for further analyses. Mobile phase fractions contained less pigments than in experiments A and B. We obtained 9 interesting Fx-enriched fractions, from n°10 to 18 (Figure 70 A, B). The Fx purity reached 100% in fractions n°11 to 14, above 97% in fractions n°10, 15, 16 and 17, and above 90% in fractions n°9 and 18 (Table 20). Chl *c1* and *c2* were eluted before and distinctly from Fx, within fractions n°4 to 9 (Figure 70 A). Their retention time was thus lower than Fx, corresponding to the greater affinity of Chl *c1* and *c2* with the mobile phase. The peak of elution of Fx was broader than the ones of experiment A and B (Figure 70 B), which indicated that Fx partitioned more between the two phases as expected. The partition of solutes was, in this solvent system, precise enough to allow the distinction between the two Chl *c1* and *c2*, with two distinct elution peaks (Figure 70 B).

The first fractions from n°1 to 5 contained a combination of all polar and non-polar pigments. This result was characteristic of the instability of the whole system involving the injected extract and the solvent system. The injected extract formed a blockage into the CPC column at the beginning of the mobile phase elution, resulted into a few fractions containing all pigments. However, the amount of pigments within these fractions was low compared with all other fractions.

Fractions n°25 to 46 corresponded to the elution of the stationary phase. Contrary to experiment B and similar to experiment A,  $\beta$ -carotene was eluted at the same time than Chl *a*. These fractions were also composed of Dtx and Chl *c* MGDG contrary to experiments A and B, where these pigments were eluted in the middle and last fractions of the mobile phase respectively. This result illustrated even more the influence of the polarity of our solvent system on the separation of pigments. Indeed, Dtx is less polar than Fx [488], and did not partition between the two phases as it was entirely eluted with the stationary non-polar phase.

$K_{D,Fx,C}$  was 0.50, which indicated that Fx was still predominantly present in the mobile phase but was more partitioned between the two phases than for experiments A and B ( $K_{D,Fx,A} = 0.11$ ,  $K_{D,Fx,B} = 0.19$ ). These results were consistent with the Fx being mainly present in nine mobile phase fractions contrary to three fractions for experiments A and B. Furthermore,  $K_{D,Chl,c,C}$  was 0.29. Chl *c1* and *c2* partitioned less than Fx between the two phases, the ratio  $K_{D,Fx,C} / K_{D,Chl,c,C}$  being 1.7 and the method much more selective. The polarity increase of the mobile phase by increasing H<sub>2</sub>O proportion was a successful strategy to separate Fx from Chl *c1* and *c2*.

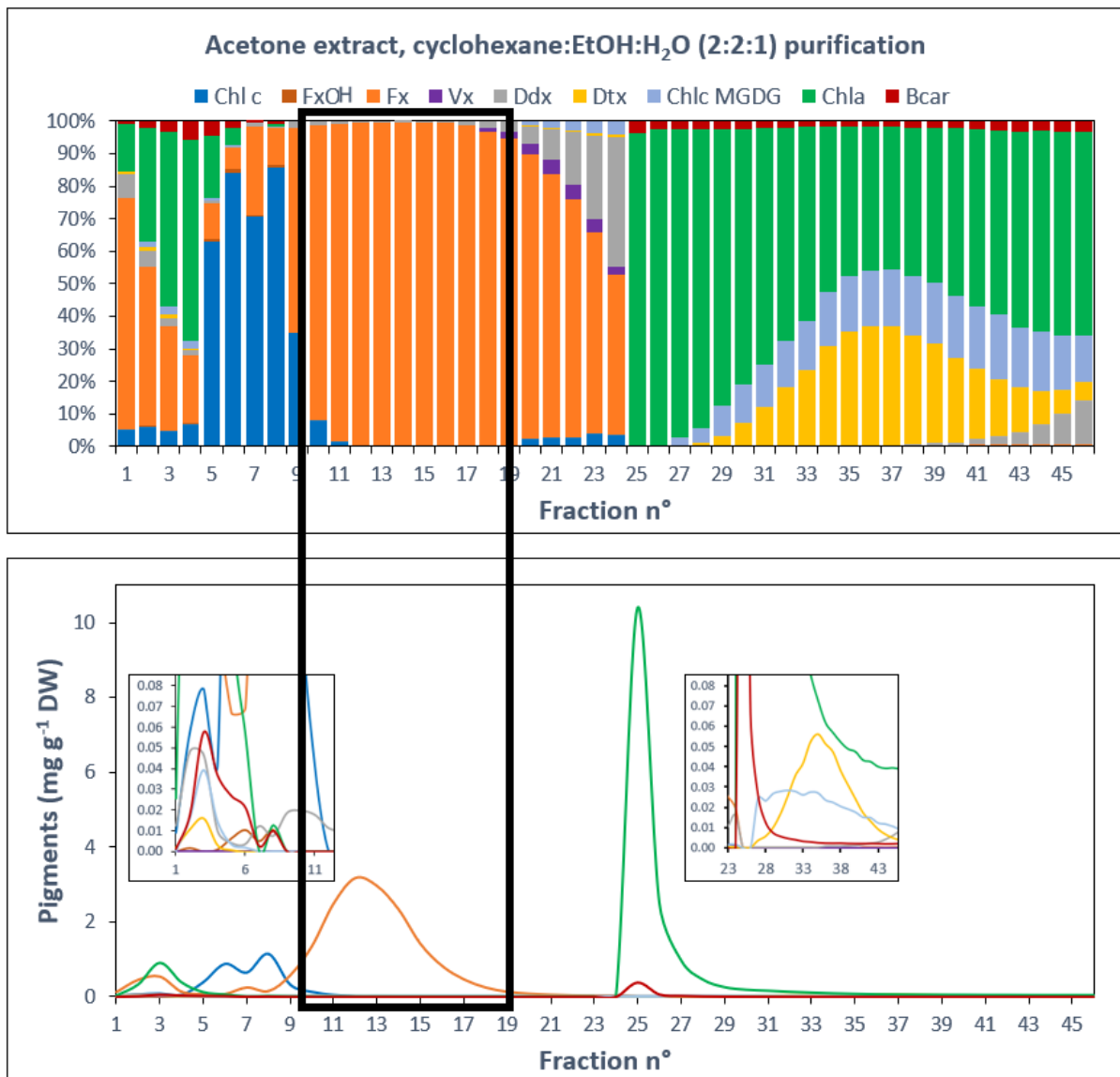


Figure 70. Characterization of the fractions collected from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment C). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup> DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.

Table 20. Concentration of pigments in the ten fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$  DW), from an acetone extract of *T. lutea* (Ac-extract2), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment C). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.

Fraction n°	(mg g <sup>-1</sup> DW)							Chl <i>c</i> MGDG	Chl <i>a</i>	βcar	% Fx
	Chl <i>c</i>	FxOH	Fx	Vx	Ddx	Dtx	Fx				
10	0.12	0.00	1.35	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	90 %
11	0.04	0.00	2.50	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	98 %
12	0.00	0.00	3.19	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	~100 %
13	0.00	0.00	2.97	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	~100 %
14	0.00	0.00	2.34	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	~100 %
15	0.00	0.00	1.42	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	~100 %
16	0.00	0.00	0.82	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99 %
17	0.00	0.00	0.46	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99 %
18	0.00	0.00	0.25	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	97 %
19	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	94 %

### 5.3.3. CPC fractionation of ethanolic extract

#### Experiment D

The solvent system of experiment C allowed the best separation of Fx. It was evaluated for ethanolic extract (EtOH-extract) fractionation (experiment D).

After 80 mL elution of mobile phase only ( $V_{MP}$ ), fractions were collected from n°1 to 45. Fractions n°1 to 33 corresponded to the elution of the mobile phase. As for experiment C, an important emulsion was observed at the surface of these fractions. Between 0.5 and 1 mL of stationary phase lost in each fraction. No significant difference between the Ac-extract and the EtOH-extract. As for experiment C, mobile phase fractions contained Chl *c*, Fx, Ddx, FxOH and Vx. We obtained 16 interesting Fx-enriched fractions, n°9 to 24 (Figure 71 A, B). All these Fx-enriched fractions were even more pure than in experiment C. The purity in Fx was 100% in nine fractions, n°10 to 18 (Figure 72), which were also the most concentrated in Fx (Table 21). In fractions n°19 to 21, purity was 99% and above 92% in fractions n°9, and 22 to 24 (Table 21). The few impurities in these fractions were Vx traces (under quantification limits in Table 21). Chl *c*1 and *c*2 were eluted before and distinctly from Fx, within fractions n°2 to 8 (Figure 71 A). As for experiment C, their retention time was lower than Fx, which validated the reproducibility of the CPC solvent system. Contrary to experiment C, the first mobile phase fractions were not composed of a combination of all pigments, there was no blockage into the CPC column. Thus, the use of an EtOH-extract improved the stability of the whole system at this level. Fractions n°33 to 45 corresponded to the elution of the stationary phase (cyclohexane), and were similar to the ones of experiment C.

$K_{D,Fx,D}$  was 0.40, which confirmed that Fx was partitioned between the two phases, more than experiments A and B, and less than experiment C. However, even with a lower  $K_D$ , Fx-enriched fractions were purer in experiment D than in experiment C. Indeed,  $K_{D,Chl c,D}$  was 0.09 which was lower than in experiment C ( $K_{D,Chl c,C} = 0.29$ ). and the ratio  $K_{D,Fx,D} / K_{D,Chl c,D}$  was therefore 4.4, showing an selectivity increase. Then, experiment D was the best extraction and separation process of Fx from *T. lutea* as we obtained the highest purity of fucoxanthin and a very high final separation efficiency (Table 21).

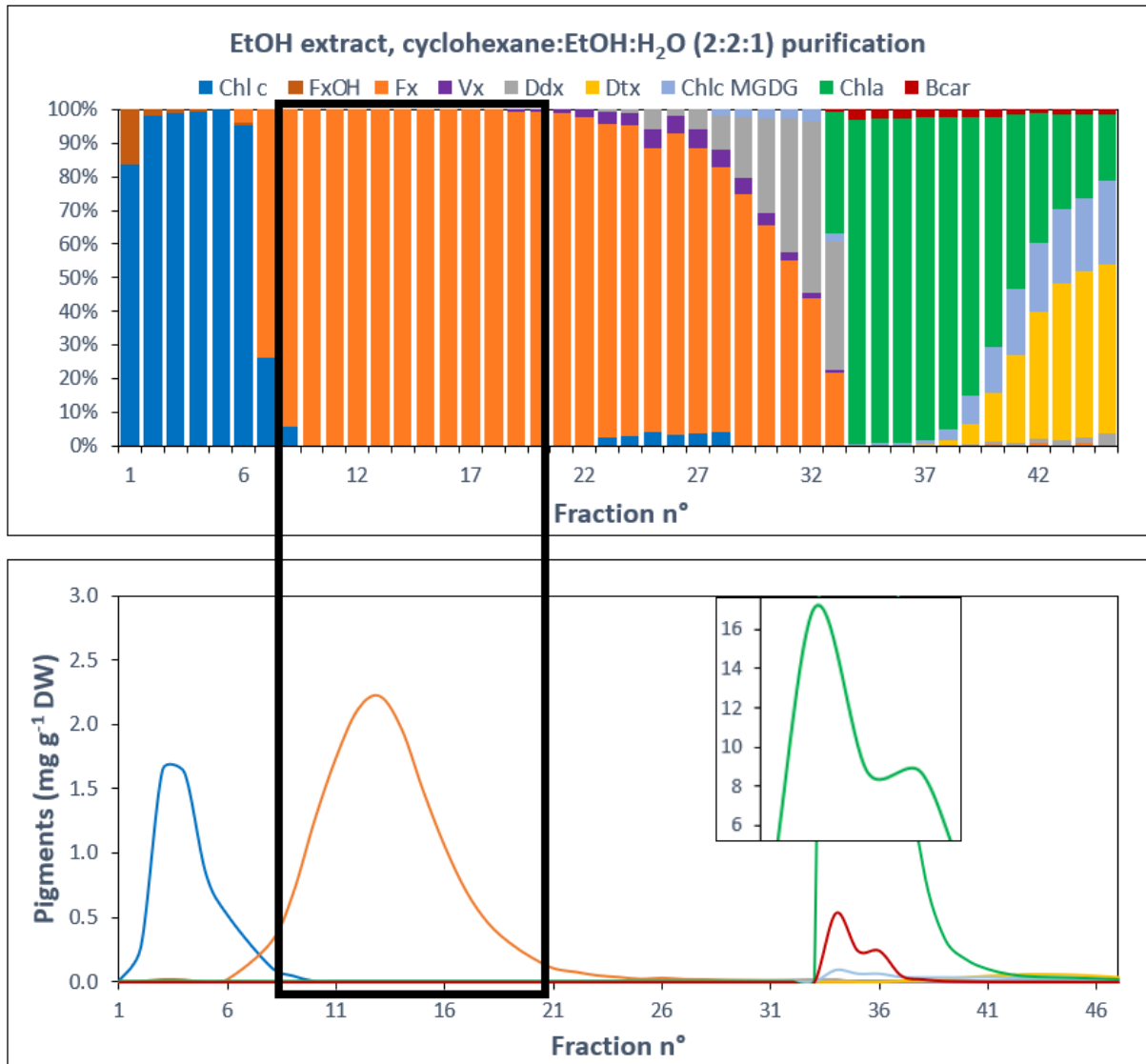


Figure 71. Characterization of the fractions collected from an ethanolic extract of *T. lutea* (EtOH-extract), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment D). (A) Cumulated percentages of pigments in each fraction, (B) Retention of the pigments in the CPC column, represented by their concentration in each fraction (mg g<sup>-1</sup> DW). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.

Table 21. Concentration of pigments in the ten fractions containing fucoxanthin ( $\text{mg g}^{-1}$  DW), from an ethanolic extract of *T. lutea* (EtOH-extract), using the cyclohexane:EtOH:H<sub>2</sub>O CPC solvent system in 2:2:1 v:v:v proportions (experiment D). The black frame highlights the most concentrated and purest fractions in fucoxanthin.

Fraction n°	(mg g <sup>-1</sup> DW)									
	Chl <i>c</i>	FxOH	Fx	Vx	Ddx	Dtx	Chl <i>c</i> MGDG	Chl <i>a</i>	βcar	% Fx
9	0.04	0.00	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	94 %
10	0.00	0.00	1.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
11	0.00	0.00	1.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
12	0.00	0.00	2.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
13	0.00	0.00	2.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
14	0.00	0.00	1.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
15	0.00	0.00	1.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
16	0.00	0.00	1.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
17	0.00	0.00	0.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
18	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100 %
19	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99 %
20	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99 %
21	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99 %
22	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	98 %
23	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	93 %
24	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	92 %



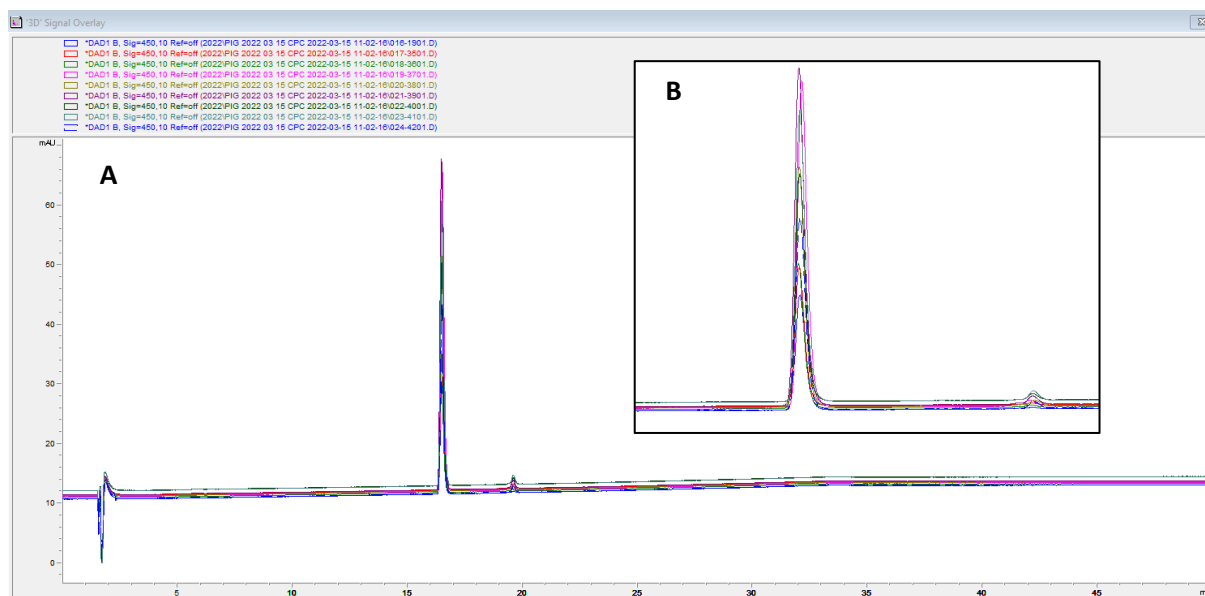


Figure 72. (A) Combined chromatograms of fractions n°10 to n°18, showing peak area (in mAU = milli arbitrary unit) relative to elution time (min). First peak at 2 min is an analysis artefact present in all chromatograms. Second peak at 16.4 min is trans-fucoxanthin, third peak at 19.8 min is cis-fucoxanthin, zoomed in (B).

### 5.3.1. Is fucoxanthin isolated from the Fucoxanthin Chlorophyll binding Protein?

The light-harvesting system of *T. lutea* is composed of pigments, including Fx and chlorophylls, which are bound to the Fucoxanthin Chlorophyll *a,c* binding Protein (FCP) [415]. It is the combination of the FCP and the pigments which allows cells to capture photons and perform photosynthesis. FCP belongs to the superfamily of transmembrane light-harvesting complex proteins and is located in chloroplasts [420]. Then, it is possible that Fx was still attached to the FCP after the extraction and purification process in our experiments. To verify if we managed to isolate Fx, we analysed the absorption spectra of the EtOH-extract (containing all pigments) and of a Fx-enriched fraction highly concentrated in Fx. Proteins absorb at 280 nm, and we did detect a peak between 270 and 280 nm, both in the EtOH-extract and in the Fx-enriched fraction (Figure 73 A). However, this peak is also present in the absorption spectra of the Fx standard (Figure 73 B) in the same proportion relative to the main Fx peak (450 nm) than the one in the Fx-enriched fraction. Therefore, it is likely there was no FCP co-purified with the Fx in our Fx-enriched fractions.

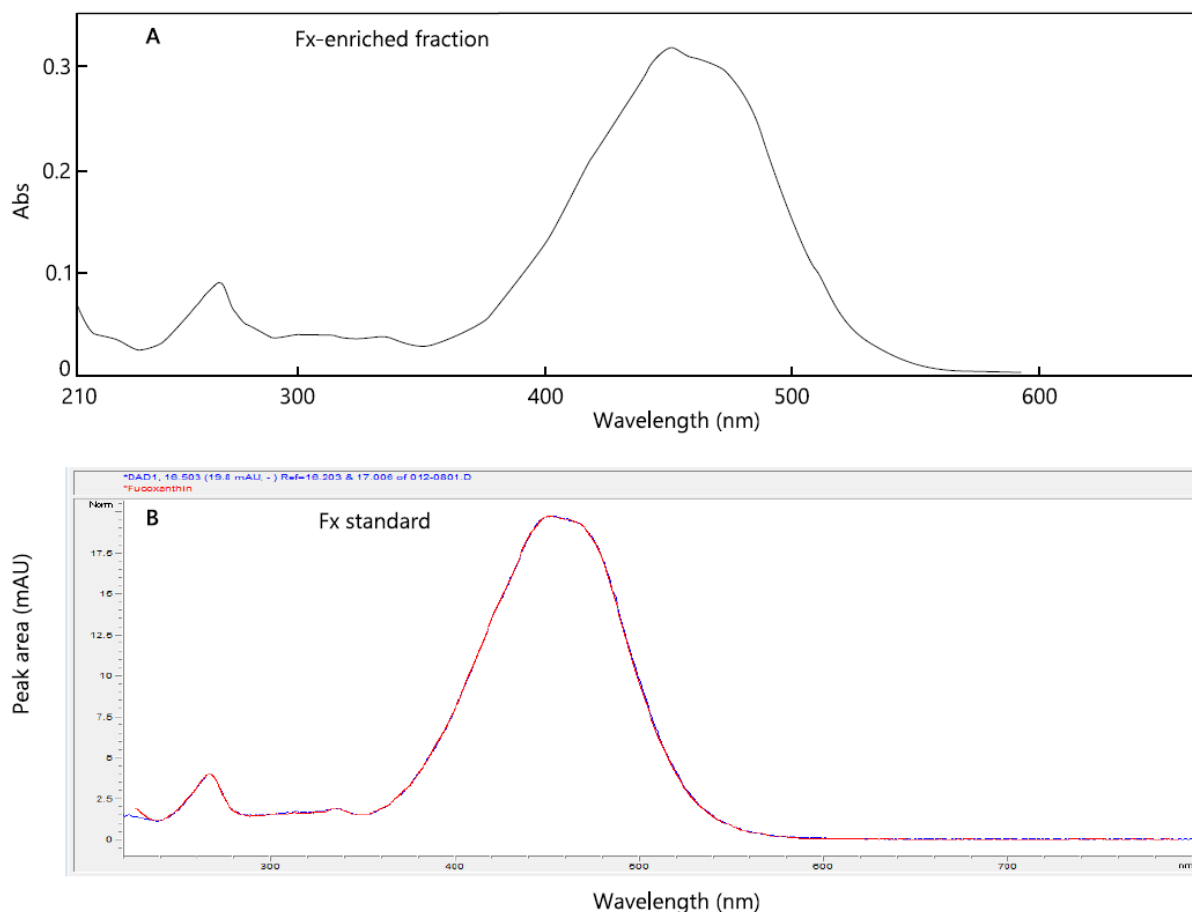


Figure 73. (A) Spectrum of a fucoxanthin-enriched fraction in experiment D. (B) Spectrum of a fucoxanthin standard.

### 5.3.2. Optimization of the solvent ratio for ethanol extraction

The method used for pigments extraction from *T. lutea* biomass was based on huge ratio of extraction solvent per gram of biomass (250mL to extract 1g of lyophilized biomass). In order to reduce this amount and be more in line with green chemistry principles, extraction were performed with less EtOH, and monitored by pigment composition and concentration.

The viscosity of the extract before evaporation was increased with less solvent, as the biomass concentration increased. Therefore, a different beaker was used with wider edges to prevent the solution from being sprayed and losing biomass during US extraction. Table 22 presents the different amounts of solvent tested (absolute EtOH) for 1g of biomass, the amount of EtOH-extract obtained, and the concentration of Fx in each EtOH-extract. With less solvent, the quantity of EtOH-extract obtained tended to slightly decrease gradually. But the Fx extraction,

in the contrary, slightly increase from 13.5 to 16.4mg.g<sup>-1</sup>, and they are then more concentrated. The highest Fx recovery (16,4mg.g<sup>-1</sup><sub>DW</sub>) and proportion (4.9%) was achieved with the lowest amount of absolute EtOH (9 g for 1 g of lyophilized biomass). We obtained 21% more Fx per gram of dried biomass by extracting it with 20 times less solvent.

**Table 22. Pigment extraction with five different amount of absolute EtOH, quantity of EtOH-extract obtained (mg.g<sup>-1</sup> DW) and Fx concentration obtained (mg.g<sup>-1</sup> DW).**

	for 1 g of lyophilized biomass				
Absolute EtOH (g):	200 g	99 g	49 g	19 g	9 g
EtOH-extract (mg.g <sup>-1</sup> <sub>DW</sub> )	387	410	341	306	331
Fx (mg.g <sup>-1</sup> <sub>DW</sub> )	13,54	15,69	12,53	14,85	16,37
Fx proportion in the extract	3.5%	3.8%	3.7%	4.9%	4.9%



---

# CHAPITRE 6

---

Discussion générale, conclusions et perspectives



## Chapitre 6 – Discussion générale, conclusions et perspectives

### 1. La caractérisation de la FCP chez *Tisochrysis lutea*

#### 1.1. Description générale et nomenclature

*Tisochrysis lutea* a été choisie comme algue modèle de ce travail de thèse pour sa capacité à synthétiser une grande quantité de fucoxanthine (Fx), pour sa facilité à être cultivée, et pour la connaissance que possède le laboratoire de l'Ifremer de Nantes (laboratoire PBA devenu ensuite le laboratoire GENALG) sur cette espèce, grâce à de nombreuses données déjà obtenues [16,36,38,42,79,327,408,421,426,449]. *T. lutea* est, avec la microalgue *Emiliania huxleyi*, un modèle du phylum des haptophytes car son rôle écologique est essentiel en tant que producteur primaire dans plusieurs océans du globe. Grâce aux données de terrain et d'autres obtenues en laboratoire, nous savons que *T. lutea* est capable de s'adapter à des conditions environnementales diverses comme la limitation en nutriments essentiels tels que l'azote et le phosphore, la limitation en lumière ou à l'inverse l'excès de lumière. Cette espèce colonise en effet une grande partie de la colonne d'eau de par sa capacité à combiner à la fois la capture des photons lumineux, et la dissipation de l'énergie lumineuse en excès. Cet équilibre est dû notamment à l'action de l'antenne collectrice de lumière, qui centralise les premières réactions de la photosynthèse (plus précisément : les réactions de photochimie), et de la photoprotection. Cette structure cellulaire située dans la membrane du chloroplaste est composée d'un complexe protéique sur lequel viennent se fixer les pigments. Afin de mieux comprendre les implications de cet équilibre chez *T. lutea*, les 52 gènes codant pour le complexe protéique de la Fucoxanthin Chl *a, c* binding Protein (la FCP) ont été annotés et leur expression caractérisée dans les premiers travaux de thèse.

Dans la littérature, la nomenclature hétéroclite de la classification des gènes et des séquences protéiques de la FCP a complexifié la sélection de *query sequences* issues d'autres microalgues haptophytes, des diatomées et autres Chromistes, pour effectuer la recherche de similarité avec *T. lutea*. Outre les *lhcf*, les *lhcr* et les *lhcx*, il est possible de trouver parmi les nombreuses études sur la FCP des appellations telles que les *lhcz* [110,130,489], les *lhcz-like* [129], les *lhCSR* [114,490], les *L1818* [129,130], les *L1818-like* [119,129,130], les *lhcc* [130], les *lhcf(red)* [129], les *lhcf-group1*, les *lhcf-group2* [129], et plus récemment les *lhcq* [110]. Ainsi, la classification des 52 gènes de *T. lutea* n'est pas irrévocable et pourra si nécessaire être précisée dans de futures

études. Bien que cette méthode ne justifie pas à définir à elle seule la fonction de ces gènes, il est courant dans la littérature de recourir à la comparaison par similarité de séquences afin d'annoter les gènes *lhc* [491–493]. En complément, l'analyse Interproscan a classé la totalité des 52 séquences protéiques correspondantes dans la famille des « *chlorophyll binding proteins* » avec une fonction moléculaire relative à la photosynthèse et au « *light-harvesting* » (GO:0009765). Des analyses protéomiques seraient complémentaires aux analyses transcriptomiques afin d'observer si les gènes transcrits ont effectivement été traduits en protéines. Une étude a par exemple montré que l'augmentation de l'expression du gène *lhcx1* chez la diatomée *T. pseudonana* dans des conditions de forte lumière n'était pas accompagnée d'une augmentation de la protéine Lhcx1 [119]. Ces résultats suggèrent que le rôle de la protéine Lhcx1 serait plutôt structurel au sein de la membrane des thylakoïdes.

## 1.2. Vers une étude cristallographique de la FCP

Une étude cristallographique complète de la FCP de *T. lutea*, à différentes conditions de lumière, à forte et à faible intensité par exemple, permettrait par ailleurs de visualiser la conformation exacte des sous-unités qui la composent ainsi que les sites de fixation des pigments sur les acides aminés des protéines Lhc (Lhcf, Lhcr et Lhcx). Si les monomères ou multimères Lhc fixent plus de Chl *a*, de Chl *c* ou de Fx, on pourra émettre l'hypothèse qu'ils ont un rôle prépondérant dans la photosynthèse tandis que les Lhc qui fixent une majorité de Ddx, Dtx, Vx et Zx auront un rôle prépondérant dans la photoprotection. Néanmoins, isoler la totalité de l'antenne collectrice de lumière, soit la FCP et les pigments qui y sont fixés, sans la dégrader, reste un challenge de taille. Il est possible par exemple que la durée et les conditions de l'extraction de la FCP fassent disparaître ses caractéristiques spécifiques dues à une intensité lumineuse faible ou élevée.

L'étude cristallographique permettrait également de constater la proximité, ou non, des molécules de Chl *a* et des molécules de Fx comme supposé, suggérant que le transfert et la dissipation de l'énergie lumineuse sont effectivement très efficaces [105]. Il serait également intéressant d'observer si certaines molécules de Fx sont directement liées à des Chl, comme c'est le cas chez *P. tricornutum*, facilitant d'autant plus le circuit énergétique.



### 1.3. Vers l'utilisation de CRISPR-Cas9 et de la qRT-PCR

La fonction exacte des 52 gènes *lhcf*, *lhcr* et *lhcx* de *T. lutea* pourrait être investiguée par mutagenèse et *knock out* ciblé grâce, par exemple, à la méthode CRISPR-Cas9. Cette technique révolutionnaire, inventée en 2017, est dérivée du système immunitaire de bactéries qui utilise une protéine nucléase, la Cas9, et un ARN « guide » complémentaire d'un gène en particulier, afin d'induire des cassures dans le double brin d'ADN [494]. En biologie moléculaire et en biotechnologie, la méthode développée permet donc d'inhiber ou de modifier spécifiquement un gène cible. Dans notre cas, la priorité d'une mutagenèse ciblée reposerait sur les gènes dont la classification reste floue comme par exemple les gènes *lhcr6* et *lhcr10* qui sembleraient appartenir au sous-groupe des *lhcr* soit les *lhcz*, dont la fonction n'est à ce jour pas définie dans la littérature. Le gène nommé *lhcx5* n'a pas pu être classifié avec certitude, sa séquence étant proche à la fois des *lhcx* et des *lhcf* et ses niveaux d'expression étant proches de ceux de la majorité des *lhcf*. Il en est de même avec le gène *lhcf23* dont la séquence est proche des *lhcr* et des *lhcf*. Par ailleurs les gènes *lchr5* et *lchr6* semblent plutôt jouer un rôle dans la photoprotection d'après les résultats des Chapitres 2 et 3, mais ils ne peuvent pas se classer parmi les *lhcx* car ils ne sont pas proches phylogénétiquement. On entrevoit donc la nécessité de ne pas restreindre le rôle des *lhcr* à la photochimie. Il subsiste donc des incertitudes dont certaines seraient difficilement levées par *knock out* des gènes, du fait que les séquences de la FCP sont nombreuses chez *T. lutea* et pourraient jouer des rôles multiples au sein de l'antenne collectrice de lumière.

Enfin, nous avons identifié chez *T. lutea* plusieurs gènes candidats comme facteurs de transcription des gènes *lhcf*, codant pour des protéines appartenant à la famille des protéines MYB. Nous avons constaté qu'ils étaient effectivement transcrits chez deux souches clonales et que leur niveau d'expression variait en fonction des conditions lumineuses. Nous avons émis des hypothèses quant à leur rôle dans la régulation de la transcription les différents groupes et sous-groupes des *lhcf*, *lhcr* et *lhcx*. Afin de préciser cette régulation, il serait nécessaire d'effectuer un *knock out* ciblé de ces sept gènes, avec la technique de CRISPR-Cas9 par exemple, et d'analyser par qRT-PCR plutôt que par RNAseq leur niveau d'expression à différents niveaux d'intensité lumineuse. À ce jour, cet outil n'est pas maîtrisé chez l'algue *T. lutea*.

La qRT-PCR, ou « quantitative real-time polymerase chain reaction » est le suivi quantitatif et en temps réel de l'amplification de fragments d'ADN d'un ou plusieurs gènes cibles à partir d'un échantillon dont la faible quantité d'ADN transcrit (soit d'ARN) ne permet pas de quantification. Les gènes dont on souhaite voir l'expression sont ciblés à l'aide d'amorces, qui sont de courtes séquences nucléotidiques complémentaires des séquences des gènes cibles. Les étapes de la qRT-PCR sont les suivantes : (i) de l'ARN, soit de l'ADN transcrit, c'est à dire exprimé par les cellules, est extrait des cellules de microalgues ; (ii) à l'aide d'une enzyme transcriptase inverse, les fragments d'ARN cibles sont transformés en ADN complémentaires (ADNc) afin d'être exploitables en PCR ; (iii) les fragments d'ADNc sont amplifiés par PCR au cours de laquelle est incorporée un fluorochrome afin de mesurer la quantité amplifiée. La détection du fluorochrome n'est possible qu'à partir d'une certaine quantité d'ADNc amplifié. Ainsi, plus le gène cible a été exprimé, plus il était présent dans l'échantillon sous forme d'ARN, plus d'ADNc de ce gène a été synthétisé par complémentarité, plus le fluorochrome sera détecté tôt dans les cycles de température de la PCR. Ainsi, à un cycle de température fixe, la fluorescence du fluorochrome sera différente pour une même séquence d'ADNc provenant d'une séquence d'ARN issu de cellules cultivées dans des conditions différentes (Figure 74).

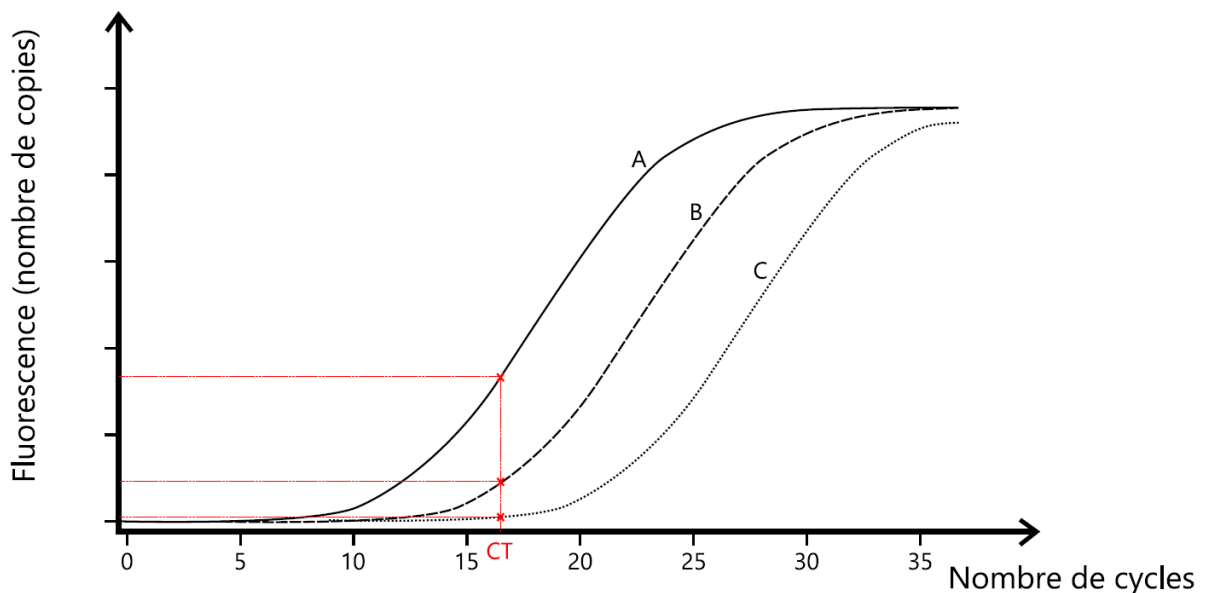


Figure 74. Exemple de graphique obtenu en qRT-PCR. Soit A, B et C représentant l'amplification d'un même gène obtenu dans des cellules cultivées dans trois conditions différentes respectivement. CT (en rouge) représente de cycle de température choisi pour comparer l'expression d'un gène dans les trois conditions différentes A, B et C.

La technique de qRT-PCR est beaucoup plus sensible que l'analyse globale RNAseq qui n'est pas ciblée. Elle permet d'analyser précisément la différence de niveau d'expression d'un même gène. Cependant, il est difficile de comparer l'expression de deux gènes car certains gènes sont plus aisément amplifiables que d'autres. L'analyse RNAseq normalise en revanche l'expression d'un gène en fonction de l'expression de tous les autres gènes, on peut donc plus facilement comparer l'expression de deux gènes entre eux.

## 2. L'identification de gènes candidats de la voie de biosynthèse des caroténoïdes

Grâce à l'étude des deux souches clonales de *T. lutea* présentant des différences dans leur stratégie de photoprotection, nous avons pu mettre en évidence quatre gènes candidats codant pour des enzymes de la biosynthèse des caroténoïdes : DDE\_L (Ddx dé-époxydase like), VDE\_L1 (Vx dé-époxydase like), VDE\_L2 et ZE\_L (Zx époxydase like). Récemment, les gènes équivalents de VDE\_L1 et ZE\_L chez *P. tricornutum*, soit VDL2 et ZEP1 respectivement, ont été caractérisés comme codant pour des enzymes clés dans la biosynthèse de Fx [174]. Cette étude représente par ailleurs un tournant majeur dans la connaissance de la voie de biosynthèse des caroténoïdes [174]. Leurs résultats soulignent d'autant plus la pertinence de l'étude des gènes VDE\_L1 et ZE\_L (entre autres) chez *T. lutea*. Après une première approche présentée dans le Chapitre 3 de cette thèse, il est évidemment nécessaire d'aller plus loin dans l'analyse de leur fonction et de leur régulation. Nous avons par exemple considéré les enzymes codées par VDE\_L1 et ZE\_L uniquement pour leur rôle au sein du cycle Vx-Zx, alors qu'il est possible que VDE\_L1 soit impliquée dans une réaction de tautomérisation de la Ddx (isomérisation d'une fonction moléculaire), indépendante du cycle Ddx-Dtx et du cycle Vx-Zx, et que ZE\_L soit impliquée dans l'époxydation d'une autre molécule que la Zx.

L'étude de Bai et al. souligne l'adéquation de l'utilisation de la technique de CRISPR-Cas9 pour comprendre l'implication d'une enzyme au sein d'une voie de biosynthèse [174]. Il serait intéressant d'investiguer les quatre gènes candidats trouvés chez *T. lutea* de la même manière que cela a été fait chez *P. tricornutum*. De plus, cultiver des souches mutantes de *T. lutea* dépourvues de DDE\_L, VDE\_L1, VDE\_L2 et/ou ZE\_L à différentes intensités lumineuses permettrait d'observer à la fois l'influence de ces gènes sur la synthèse de Fx, et sur la synthèse de pigments des deux cycles xanthophylles. Certaines des enzymes codées par ces gènes pourraient en effet avoir des rôles multiples. Comme pour les gènes de la FCP de *T. lutea* présentés précédemment, il pourrait être intéressant, une fois la fonction des gènes mieux

définie grâce à CRISPR-Cas9 par exemple, d'effectuer ensuite une qRT-PCR sur les souches sauvages, c'est à dire celles qui n'ont pas subi de modification génétique. L'analyse de l'évolution de l'expression de ces quatre gènes permettra d'apporter des éléments de réponse supplémentaires et de confirmer, ou non, leur(s) fonction(s) supposées. Par ailleurs, les analyses Interproscan ont révélé que le gène VDE\_L2 chez *T. lutea* pourrait également avoir de multiples fonctions dans le processus de photosynthèse. L'enzyme correspondante pourrait, d'un côté, agir dans la régulation du pH du lumen du chloroplaste et ainsi contrôler une partie du qE (*energy-dependant quenching*) lorsque les cellules mettent en place le NPQ en cas d'excès de lumière. De l'autre, elle pourrait avoir une activité de dé-époxydation de la Vx et éventuellement de la Ddx, et éventuellement un rôle au sein de la biosynthèse de la Fx, similairement à VDE\_L1.

### 3. La présence d'échinénone chez *Tisochrysis lutea*

Dans les travaux présentés au Chapitre 3, en parallèle des variations des pigments des cycles des xanthophylles Ddx-Dtx et Vx-Zx, nous avons observé la présence du pigment échinénone dans les cultures de la souche clonale T-4cl3 de *T. lutea*, dont la concentration a augmenté avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Dans les travaux présentés au Chapitre 4, les cultures de T-4cl3 présentaient également de l'échinénone à partir de la phase stationnaire de croissance, soit quand les cellules étaient limitées en azote ou en phosphore. Si la synthèse d'échinénone par *T. lutea* avait déjà été démontrée pour des cultures limitées en azote [4], c'est la première fois qu'elle est démontrée en réponse à l'augmentation de l'intensité lumineuse.

L'échinénone est un caroténoïde spécifique des cyanobactéries qui le synthétisent [495], où il joue un rôle photoprotecteur en cas de forte irradiance [5]. Comme expliqué dans le Chapitre 3, l'échinénone est fixée sur l'Orange Carotenoid Protein (OCP) chez les cyanobactéries et permet de piéger les espèces réactives oxygénées (les ROS) formées lorsque l'énergie lumineuse est en excès [5]. Chez *T. lutea*, l'échinénone semble également avoir un rôle dans la photoprotection. En effectuant une recherche de similarité entre différentes séquences de l'OCP de cyanobactéries et le génome de *T. lutea*, nous n'avons trouvé aucune correspondance. L'échinénone pourrait être capable de piéger les ROS sans être fixée à l'OCP, cependant cela n'a pas encore été montré dans la littérature ni chez les cyanobactéries, ni chez une autre espèce. Une étude de 2016 décrit une nouvelle famille de protéines permettant la fixation de caroténoïdes chez les cyanobactéries (dont l'échinénone), présentant des homologues avec

l'OCP et nommées « Helical Carotenoid Proteins » (HCP) [496]. De même que pour l'OCP, une recherche de similarité entre des séquences HCP déjà annotées et le génome de *T. lutea* serait nécessaire pour tenter de trouver une protéine chez *T. lutea* qui permettrait la fixation de l'échinénone et justifierai son rôle en tant que pigment photoprotecteur. De l'échinénone a également été retrouvée chez les microalgues d'eau douce *Tetradismus obliquus*, *Haematococcus pluvialis* et *Scenedesmus obliquus*, des chlorophytes (algues vertes), sans pour autant préciser si sa synthèse était liée à un quelconque facteur d'influence spécifique [497–499]. Chez *H. pluvialis* et *S. obliquus* plus précisément, l'échinénone est métabolisée à partir du  $\beta$ -carotène et a été caractérisée comme un intermédiaire du pigment astaxanthine [498,500], connu pour ses propriétés proches de la Fx et actuellement très recherchées dans les domaines pharmaceutiques et nutraceutiques. On s'interroge alors sur la possibilité que l'échinénone soit également synthétisée à partir du  $\beta$ -carotène chez *T. lutea*, et si elle est un intermédiaire de la Fx chez *T. lutea*. Pour cette dernière hypothèse cependant, les résultats du Chapitre 3 ont montré que les deux souches clonales de *T. lutea* accumulaient la même concentration de Fx alors que l'une d'entre elles, la souche T-5cl6, ne produisait pas d'échinénone.

Dans nos expériences, l'échinénone a été quantifiée par HPLC au cours de laquelle son temps de rétention était de 31 minutes. C'est également le temps de rétention de la Chl *c* MGDG, un pigment caractéristique des haptophytes ([486,501,502]), composé d'une molécule de Chl *c* liée à un monogalactosyl diacylglyceride. Ainsi, nous avons observé pour chaque échantillon analysé le spectre d'absorption du pic analytique à 31 minutes sur le chromatogramme, lorsqu'il était présent. Bien que les spectres de l'échinénone et de la Chl *c* MGDG soient distincts, il est possible que leur élution se confonde en un seul et même pic à cause du temps de rétention similaire, rendant les composés difficiles à quantifier. Il est donc possible que certaines concentrations d'échinénone aient été surestimées ou sous-estimées dans nos résultats.

#### **4. La régulation de la photoprotection chez *Tisochrysis lutea***

En plus d'avoir apporté des preuves du rôle photoprotecteur de l'échinénone, étudier en parallèle trois souches de *T. lutea* nous a permis de comprendre quelles étaient les implications de la mise en place du NPQ chez cette espèce. Les résultats du Chapitre 3 ont montré qu'une augmentation de l'intensité lumineuse incidente impliquait (i) la variation du pH au niveau de la membrane du thylakoïde, qui n'a pas été mesurée dans ces travaux mais qui est suggérée

par les variations du niveau d'expression de VDE\_L2 et par le fait que l'activation des cycles xanthophylles en dépend ; (ii) l'activation des deux cycles xanthophylles Ddx-Dtx et Vx-Zx grâce aux enzymes de dé-époxydation ; (iii) l'augmentation du niveau d'expression de certains gènes *lhcx* et *lhcr*. Ainsi, le qE (*energy-dependent quenching*, soit le composant principal du NPQ) serait contrôlé chez *T. lutea* de la même manière qu'il l'est chez les diatomées. Cependant, d'après la littérature, si le rôle du cycle Ddx-Dtx est prédominant chez les diatomées [503], le rôle du cycle Vx-Zx semble également constitutif du qE chez *T. lutea*. Comme discuté précédemment, le pigment échinénone pourrait être impliqué dans la photoprotection chez *T. lutea* (chez la souche modèle CCAP 927/14 et la souche clonale T-4cl3), il représenterait alors un quatrième composant du qE chez *T. lutea*, (iv) celui de piéger les ROS si la totalité de l'énergie lumineuse en excès n'est pas dissipée sous forme de chaleur.

Contrairement aux diatomées, le NPQ était soutenu chez les trois souches de *T. lutea*. Après avoir été exposées plusieurs jours à forte intensité lumineuse, générant la dé-époxydation de la Ddx en Dtx pour la photoprotection, les cultures ont été mises à l'obscurité. Cependant, après 2 h d'obscurité, les cellules continuaient à accumuler de la Dtx, impliquant que leur antenne collectrice n'avait pas encore retrouvé tout son potentiel photochimique. Chez les diatomées au contraire, la rétro-conversion de la Dtx en Ddx par époxydation est connue pour être beaucoup plus rapide, le qE se désactivant en quelques dizaines de seconde [120]. Par conséquent, nos résultats pourraient dans un premier temps suggérer que *T. lutea* fait de la photoinhibition, ou ql (*inhibition quenching*), qui est un composant du NPQ pouvant être complémentaire au qE [166]. Le ql possède plusieurs définitions dans la littérature, la plus commune étant la détérioration des photosystèmes, entraînant une baisse de la photochimie à forte lumière et donc un retour tardif de la photochimie, parfois diminuée, à l'obscurité. Cependant, bien qu'il soit difficile de mesurer la détérioration des PSII et PSI, le ql est en réalité souvent confondu avec du qE soutenu. Les cellules finissent effectivement par retrouver la totalité de leur potentiel photochimique, même tardivement. Un qE soutenu peut d'ailleurs tout à fait faire partie d'une stratégie de photoprotection, permettant aux cellules de réagir rapidement en cas de forte lumière après une période d'obscurité. Par ailleurs, nous avons montré dans le Chapitre 2 que les gènes *lhcx2* et *lhcx5* étaient surexprimés à faible lumière chez *T. lutea*, à l'inverse des autres *lhcx*, suggérant que les cellules étaient préparées à répondre

rapidement à une augmentation de l'intensité lumineuse. Ces résultats concordent donc avec l'hypothèse d'un qE soutenu et non de la photoinhibition chez *T. lutea*.

## 5. La montée en échelle de la production de fucoxanthine

### 5.1. L'importance de la disponibilité de la lumière

Etudier les mécanismes de la photosynthèse et de la photoprotection s'actionnant au niveau de l'antenne collectrice de lumière de *T. lutea* a permis d'améliorer notre compréhension globale de la synthèse des pigments chez cette espèce. Parmi ces derniers, la Fx est un caroténoïde d'intérêt dans de nombreux domaines, dont la nutrition aquacole. Trois souches différentes de *T. lutea* ont ainsi été cultivées de sorte à (i) obtenir des cultures plus ou moins riches en Fx pour nourrir des huîtres et naissains d'huîtres, et (ii) à analyser l'influence de différents facteurs sur la croissance de la population algale et la capacité des cellules à synthétiser et accumuler de la Fx. Nous avons montré que la disponibilité en lumière, et non l'intensité incidente de la lumière, était le facteur le plus différenciant pour l'accumulation de Fx. Bien sûr, l'étude de l'influence de la géométrie des photobioréacteurs (PBRs) sur la production de Fx est un sujet que l'on retrouve régulièrement dans la littérature, comme expliqué dans le Chapitre 1. Cependant, le parallèle avec la physiologie cellulaire, et plus spécifiquement ce qu'implique intrinsèquement la limitation par la lumière au niveau des cellules, était jusqu'ici rarement décrit. En cela, les premiers travaux des Chapitres 1, 2 et 3 nous ont permis de comprendre, à travers les expériences de production de Fx du projet TINAQUA, l'effet d'auto-ombrage des cellules, d'accessibilité de la lumière dans un PBR, de l'impact des nutriments sur la synthèse de Fx.

### 5.2. Vers la maîtrise du changement d'échelle

Après avoir mené des cultures en volume de 350 mL, 1 L et 6 L, les cultures en scobalites de 300 L ont montré des résultats relativement inverses de ceux auxquels nous nous attendions. Nous avons montré que le manque de luminosité traversant la colonne du scobalite était tel qu'il a provoqué une diminution du taux de croissance des trois souches et une sur-production de Fx dans les cultures des souches CCAP 927/14 et T-5cl6 par rapport aux cultures précédentes. Au-delà de cette limitation, il est par ailleurs admis que les cultures en scobalites ne peuvent pas être autant contrôlées que des cultures en plus petits volumes à l'échelle laboratoire. Notamment, il est probable que l'apport simultané de CO<sub>2</sub> par tuyaux multicanaux

dans les trois scobalites n'ait pas été homogène entre les cultures d'une même souche, ni entre les trois différentes souches. Par exemple, la souche T-5cl6 a semblé être plus sensible à l'apport de CO<sub>2</sub>, donc aux variations de pH, que les deux autres souches. Obtenir un triplicat, ou bien un duplicat de culture de T-5cl6 a nécessité plusieurs essais. Par ailleurs, compte-tenu de la largeur d'un scobalite et du matériel à disposition, il n'a pas pu être possible de cultiver les souches à une lumière incidente plus élevée comme dans les expériences précédentes. Bien que la synthèse de Fx n'en ait été qu'améliorée, il serait tout de même intéressant de tester une technologie permettant d'augmenter l'intensité incidente sur les scobalites de T-5cl6 par rapport à ceux de T-4cl3. Cela permettrait de constater d'autant plus l'impact important de la disponibilité de la lumière par rapport à celui de la différence entre les deux souches.

## 6. La Chromatographie de Partage Centrifuge

### 6.1. Une approche différente de la purification de fucoxanthine

La technique de chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été développée dans les années 1980 [504] et fait partie, avec la technique High Speed Counter Current Chromatography (HSCCC), de la catégorie des chromatographies à contre-courant (CCC), utilisant la force centrifuge pour aider à la décantation des systèmes [505]. Les travaux de Marchal *et al.* [506] et I.A. Sutherland [507] dans les années 2000 ont, depuis, largement contribué à améliorer la conception des cellules de partage composant les appareils, afin de rendre optimale la dispersion de la phase mobile et donc le transfert de matière à partir d'un extrait. Jusqu'ici, la CPC a été majoritairement utilisée pour séparer des molécules bioactives d'extraits de plantes [505,508–513], mais de récents travaux, peu nombreux, ont ouvert la voie au développement de la séparation par CPC de métabolites de microalgues [79,378,514].

Bien que certaines méthodes de purification de la Fx soient décrites au travers de plusieurs études dans la littérature (voir Chapitre 1, 3.7 L'extraction et la purification de fucoxanthine), nous nous sommes focalisés dès le début de cette thèse sur l'utilisation de la CPC. Outre son efficacité pour la séparation de Fx, que nous avons évoquée dans le Chapitre 5, cette technique présente de nombreux avantages [505]. Travailler en système biphasique de solvants et non avec un support solide permet de s'affranchir des phénomènes d'adsorption irréversibles, et permet un large choix de solvants pour composer les phases stationnaire et mobile selon la molécule d'intérêt [505]. Par rapport à l'utilisation de l'HPLC (*high performance liquid*



*chromatography*), le volume de la phase stationnaire est moins important en CPC, rendant les processus plus économiques et faisables à grande échelle [507]. De plus, bien qu'il y ait peu de CPC en industrie, les développements qui ont conduit à de la production ont été réalisés sur des colonnes de chromatographie allant jusqu'à 5 L de capacité volumique.

## 6.2. Une approche d'éco-conception en extraction-purification

Les études par Gonçalves de Oliveira-Júnior *et al.* publiée en 2020, et Kim *et al.* publiée en 2011 sont jusqu'ici les seules à avoir décrit l'utilisation de la CPC pour la séparation de Fx à partir d'un extrait de microalgues [79,378]. L'utilisation de la CPC étant souvent freinée par le choix du système biphasique de solvants qui peut s'avérer difficile, d'autant plus si on souhaite intégrer la notion de chimie verte au processus, nous nous sommes basés sur l'étude de Gonçalves de Oliveira-Júnior *et al.* pour nos travaux. Ce choix fut également motivé par le fait que les auteurs aient utilisé la même espèce et la même souche, soit *T. lutea* souche CCAP 927/14. En optimisant le système de solvants utilisés pour former la phase mobile de la CPC présenté dans l'étude de Gonçalves de Oliveira-Júnior *et al.*, nous avons réussi à augmenter l'efficacité de la séparation de Fx. Le méthanol a ainsi été remplacé par de l'éthanol, plus respectueux de l'environnement. Puis, en augmentant la polarité de la phase mobile avec de l'eau, nous avons réussi à séparer totalement la Fx des autres pigments présents dans l'extrait de *T. lutea*. La phase stationnaire de notre système, composée de cyclohexane, est cependant restée similaire à celle utilisée par de Oliveira-Júnior *et al.*

## 6.3. Vers une CPC « verte »

Nous n'avons pour le moment pas trouvé de substitut efficace au cyclohexane afin de mieux correspondre aux principes de la chimie verte. Toutefois, la CPC permet de fonctionner avec une consommation de solvant (phase mobile et phase stationnaire) réduite vis-à-vis des autres méthodes de purification.

Les étapes de R&D pour aller vers l'industrialisation du procédé sont : (i) optimiser la quantité d'extrait injecté sur la colonne CPC, et (ii) transposer la méthode sur une colonne CPC de taille supérieure, adaptée à la productivité souhaitée. Des expériences sont actuellement en cours au laboratoire GEPEA à Saint Nazaire sur la transposition d'échelle en passant d'une colonne de 240 mL à 1400 mL et en injectant non plus 100 mg mais 1 g d'extrait.

## 7. Conclusion générale de la thèse

Les travaux menés durant cette thèse pluridisciplinaire ont permis de répondre à tous les objectifs fixés. L'étude expérimentale de l'antenne collectrice de lumière chez *Tisochrysis lutea* a, dans un premier temps, permis de comprendre les processus métaboliques inhérents à la synthèse de fucoxanthine. Cinquante-deux gènes *lhc* codant pour la FCP de *T. lutea* ont été annotés et classés en 3 familles : *lhcf*, *lhcr*, *lhcx*. Le potentiel de capture de la lumière de *T. lutea* a été évalué et l'étude d'un cycle photopériodique dynamique et d'une variation de disponibilité en azote a démontré une dynamique très sensible des pigments photosynthétiques et photoprotecteurs ainsi qu'une nette différence dans l'expression des gènes *lhc*. Grâce à l'étude de deux souches clonales de *T. lutea* et à la conjonction des analyses génomiques et physiologiques, quatre gènes candidats des deux cycles de pigments xanthophylles ont également été annotés, ainsi que sept potentiels facteurs de transcription des gènes *lhc*. Ces travaux ouvrent la voie à des expériences complémentaires qui permettraient de valider et d'affiner certaines des hypothèses scientifiques proposées dans cette thèse, notamment au niveau de la fonction des gènes de l'antenne collectrice de lumière (gènes *lhc* et gènes des cycles de xanthophylles).

La production de Fx par ces deux souches clonales ainsi que la souche modèle *T. lutea* CCAP 927/14 a ensuite été étudiée à différentes échelles laboratoires et pilotes et a montré qu'un *scale-up* était possible pour ces trois souches. En scobalites de 300 L, par rapport aux cultures de 350 mL, la teneur en Fx de la souche modèle *T. lutea* CCAP 927/14 a été multipliée par 6.6, passant de 41 à 271 fg.cellule<sup>-1</sup>. Il a été montré que la disponibilité de la lumière à travers le photobioréacteur limitait logiquement la croissance des cultures et impliquait une augmentation drastique de la synthèse de fucoxanthine pour deux des trois souches. Enfin, l'optimisation d'une méthode d'extraction et de purification de la fucoxanthine par chromatographie de partage centrifuge a dépassé nos attentes. Nous avons réussi à remplacer le méthanol par de l'éthanol dans le système biphasique de solvants, puis à obtenir une séparation totale de la Fx des autres pigments soit de la Fx à 100% de pureté HPLC pour 10 fractions CPC, soit une concentration en Fx purifiée de 13 mg.g<sup>-1</sup> de masse sèche au total. Enfin, nous avons réussi à réduire radicalement la consommation spécifique d'éthanol pour la première étape d'extraction à partir de biomasse de *T. lutea*, passant de 200 g à 9g de solvant pour extraire efficacement 1 g de biomasse sèche. Ces résultats sont très encourageants et

soulignent largement l'avantage de la chromatographie de partage centrifuge pour la purification de fucoxanthine.



---

# VALORISATION SCIENTIFIQUE

---



## Valorisation scientifique

### 1. Publications dans des journaux à comité de lecture

**Article publié** : Pajot, A.; Lavaud, J.; Carrier, G.; Garnier, M.; Saint-Jean, B.; Rabilloud, N.; Baroukh, C.; Bérard, J.-B.; Bernard, O.; Marchal, L.; Nicolau, E. The Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*-Binding Protein in *Tisochrysis Lutea*: Influence of Nitrogen and Light on Fucoxanthin and Chlorophyll *a/c*-Binding Protein Gene Expression and Fucoxanthin Synthesis. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, doi :10.3389/fpls.2022.830069 [415].

**Article publié** : Pajot, A.; Hao Huynh, G.; Picot, L.; Marchal, L.; Nicolau, E. Fucoxanthin from Algae to Human, an Extraordinary Bioresource: Insights and Advances in up and Downstream Processes. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 222, doi:10.3390/md20040222 [173].

### 2. Article soumis et autres

**Article soumis** : Pajot, A.; Lavaud, J.; Carrier, G.; Lacour T.; Nicolau, E. ; Marchal, L. Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: evidence for different photoprotection strategies. *Algal Research* (ALGAL-D-22-00647R1, soumis le 26 août 2022, révisé et re-soumis le 20/10/2022).

**Article en cours de soumission** : Pajot, A.; Chollet, S; Nicolau, E.; Marchal, L. Improving fucoxanthin extraction and separation from *Tisochrysis lutea* by centrifugal partition chromatography. *Bioresource Technology*.

**Article en cours de rédaction** : Pajot, A.; Armeni-Ripari, J.; Charrier, A.; Chim, L.; Marchal, L.; Nicolau, E. A scale-up production of fucoxanthin by *Tisochrysis lutea*, from 350 mL to 300L. Journal visé : *Bioresource Technology*.

### 3. Présentations dans des conférences internationales

**AlgaEurope (Décembre 2020, webinaire)** : E-poster présenté oralement « First identification of the Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c* binding Protein in *Tisochrysis lutea* ».

**International Bioenergy & Environment Congress (I-BE-C, Février 2021, webinaire)** : E-poster présenté oralement « First identification of the Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c* binding Protein in *Tisochrysis lutea* ». Prix du meilleur poster.

**International Phycological Congress (IPC, Mars 2021, webinaire) :** Présentation orale « First identification of the Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c* binding Protein in *Tisochrysis lutea*, influence of light intensity on its expression ».

**AlgaEurope (Décembre 2021, webinaire) :** E-poster présenté oralement « Characterization of the Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c* binding Protein in *Tisochrysis lutea* ».

**Franco-Brazilian Network on Natural Products (FB2NP, Juillet 2022, webinaire) :** Présentation orale « The bioactive molecule fucoxanthin: Development of an extraction and purification method from *Tisochrysis lutea* using Centrifugal Partition Chromatography ». Prix de la meilleure présentation.

**Webinaire Microphyt & EABA « Fucoxanthin & Phaeodactylum » (Septembre 2022) :** Présentation orale « The bioactive molecule fucoxanthin: insights and advances in up and downstream processes ».

#### 4. Présentations dans des conférences nationales

**Congrès annuel de la Société Phycologique de France (Décembre 2020, webinaire) :** Présentation orale « Première identification de la Fucoxanthin-Chlorophyll *a/c* binding Protein chez la microalgues *Tisochrysis lutea* ». Prix de la meilleure présentation.

**Congrès Gen2Bio (Février 2022, La Baule) :** Poster « La Fucoxanthin Chlorophyll *a/c* binding Protein chez la microalgues *Tisochrysis lutea*, analyse de son expression et de la synthèse des pigments ».

**Colloque « La cellule face aux stimulations du monde marin » (Juin 2022, Nantes) :** Présentation orale « La molécule bioactive fucoxanthine : influence de la lumière sur sa production et sur les gènes associés ».

#### 5. Autres communications

**Journées des doctorants Ifremer (Janvier 2021, webinaire) :** Présentation du sujet de thèse, des objectifs et avancées.

**MT180 (Février, Mars 2021, Nantes) :** Concours national de présentation vulgarisée de la thèse en 180 secondes « Production par une microalgue dorée d'un pigment photosynthétique



valorisé en pharmacie et en aquaculture ». 2<sup>ème</sup> prix du jury de la finale Nantaise, participation à la finale régionale à Angers.

**Séminaire de l'école doctorale SPI (Avril 2021, webinaire)** : Présentation du sujet de thèse, des objectifs et avancées.

**Podcast Radio Prun' Labo des Savoirs (Septembre 2021, Nantes)** : Enregistrement d'un podcast « Émosons » sur le ressenti en thèse, dans l'émission *Le Labo des Savoirs*, diffusé sur la radio *Radio Prun'*.

**Séminaire « une thèse, et après !? » (Octobre 2021, Paris)** : Organisation et animation d'une table ronde sur les différents métiers hors recherche académique accessibles après la thèse.

**Journées des doctorants Ifremer (Septembre 2022)** : Organisation et animation de la première édition des *Journées Doctorantes Ifremer*. Présentation orale « The bioactive molecule fucoxanthin: Development of an extraction and purification method from *Tisochrysis lutea*. ».



---

# RÉFÉRENCES

---



## Références

1. Vesteg, M.; Vacula, R.; Krajčovič, J. On the Origin of Chloroplasts, Import Mechanisms of Chloroplast-Targeted Proteins, and Loss of Photosynthetic Ability — Review. *Folia Microbiol* **2009**, *54*, 303, doi:10.1007/s12223-009-0048-z.
2. Mulders, K.J.M.; Lamers, P.P.; Martens, D.E.; Wijffels, R.H. Phototrophic Pigment Production with Microalgae: Biological Constraints and Opportunities. *Journal of Phycology* **2014**, *50*, 229–242, doi:10.1111/jpy.12173.
3. Parker, M.; Mock, T.; Armbrust, E. Genomic Insights into Marine Microalgae. *Annual review of genetics* **2009**, *42*, 619–645, doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091417.
4. Mulders, K.J.M.; Weesepeel, Y.; Lamers, P.P.; Vincken, J.-P.; Martens, D.E.; Wijffels, R.H. Growth and Pigment Accumulation in Nutrient-Depleted *Isochrysis Aff. Galbana* T-ISO. *J Appl Phycol* **2013**, *25*, 1421–1430, doi:10.1007/s10811-012-9954-6.
5. Takaichi, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 1101–1118, doi:10.3390/md9061101.
6. Sanchez-Puerta, M.V.; Delwiche, C.F. A Hypothesis for Plastid Evolution in Chromalveolates. *Journal of Phycology* **2008**, *44*, 1097–1107, doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00559.x.
7. Janouškovec, J.; Horák, A.; Oborník, M.; Lukeš, J.; Keeling, P.J. A Common Red Algal Origin of the Apicomplexan, Dinoflagellate, and Heterokont Plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 10949–10954, doi:10.1073/pnas.1003335107.
8. Roy, S.; Llewellyn, C.A.; Egeland, E.S.; Johnsen, G. *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, Cambridge University Press, 2011; ISBN 978-1-139-50099-9.
9. Delwiche, C.F. Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *The American Naturalist* **1999**, *154*, S164–S177, doi:10.1086/303291.
10. Bodył, A.; Moszczyński, K. Did the Peridinin Plastid Evolve through Tertiary Endosymbiosis? A Hypothesis. *European Journal of Phycology* **2006**, *41*, 435–448, doi:10.1080/09670260600961080.
11. Falkowski, P.G. The Role of Phytoplankton Photosynthesis in Global Biogeochemical Cycles. *Photosynth Res* **1994**, *39*, 235–258, doi:10.1007/BF00014586.
12. Falkowski, P.G.; Barber, R.T.; Smetacek, V. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* **1998**, *281*, 200–207, doi:10.1126/science.281.5374.200.
13. Geider, R.J.; Delucia, E.H.; Falkowski, P.G.; Finzi, A.C.; Grime, J.P.; Grace, J.; Kana, T.M.; La Roche, J.; Long, S.P.; Osborne, B.A.; et al. Primary Productivity of Planet Earth: Biological Determinants and Physical Constraints in Terrestrial and Aquatic Habitats. *Global Change Biology* **2001**, *7*, 849–882, doi:10.1046/j.1365-2486.2001.00448.x.
14. Azam, F.; Malfatti, F. Microbial Structuring of Marine Ecosystems. *Nat Rev Microbiol* **2007**, *5*, 782–791, doi:10.1038/nrmicro1747.
15. Landsberg, J.H. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science* **2002**, *10*, 113–390, doi:10.1080/20026491051695.
16. Nef, C. Métabolisme et Interactions Bactériennes En Lien Avec La Vitamine B12 Chez La Microalgue Haptophyte *Tisochrysis Lutea*. Thèse de doctorat, Nantes, 2019.
17. de Vargas, C.; Audic, S.; Henry, N.; Decelle, J.; Mahé, F.; Logares, R.; Lara, E.; Berney, C.; Le Bescot, N.; Probert, I.; et al. Eukaryotic Plankton Diversity in the Sunlit Ocean. *Science* **2015**, *348*, 1261605, doi:10.1126/science.1261605.

18. Barkia, I.; Saari, N.; Manning, S.R. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 304, doi:10.3390/md17050304.
19. Delaunay, F.; Marty, Y.; Moal, J.; Samain, J.-F. The Effect of Monospecific Algal Diets on Growth and Fatty Acid Composition of *Pecten Maximus* (L.) Larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1993**, *173*, 163–179, doi:10.1016/0022-0981(93)90051-O.
20. Rico-Villa, B.; Le Coz, J.R.; Mingant, C.; Robert, R. Influence of Phytoplankton Diet Mixtures on Microalgae Consumption, Larval Development and Settlement of the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **2006**, *256*, 377–388, doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.015.
21. Barros de Medeiros, V.P.; Pimentel, T.C.; Sant’Ana, A.S.; Magnani, M. Microalgae in the Meat Processing Chain: Feed for Animal Production or Source of Techno-Functional Ingredients. *Current Opinion in Food Science* **2020**, doi:10.1016/j.cofs.2020.10.014.
22. Leal, E.; de Beyer, L.; O’Connor, W.; Dove, M.; Ralph, P.J.; Pernice, M. Production Optimisation of *Tisochrysis Lutea* as a Live Feed for Juvenile Sydney Rock Oysters, *Saccostrea Glomerata*, Using Large-Scale Photobioreactors. *Aquaculture* **2020**, 736077, doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736077.
23. Pradhan, J.; Das, S.; Das, B.K. Antibacterial Activity of Freshwater Microalgae: A Review. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, *8*, 809–818, doi:10.5897/AJPP2013.0002.
24. Falaise, C.; François, C.; Travers, M.-A.; Morga, B.; Haure, J.; Tremblay, R.; Turcotte, F.; Pasetto, P.; Gastineau, R.; Hardivillier, Y.; et al. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Mar Drugs* **2016**, *14*, E159, doi:10.3390/md14090159.
25. ANSES AVIS de l’Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et Du Travail Relatif « à La Teneur Maximale En Cadmium Pour Les Algues Destinées à l’alimentation Humaine » 2020.
26. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA); Turck, D.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Hirsch-Ernst, K.I.; Kearney, J.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H.J.; Naska, A.; et al. Safety of Dried Whole Cell *Euglena Gracilis* as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **2020**, *18*, e06100, doi:10.2903/j.efsa.2020.6100.
27. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA); Turck, D.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Hirsch-Ernst, K.I.; Kearney, J.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H.J.; Naska, A.; et al. Safety of *Schizochytrium* Sp. Oil as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283(a). *EFSA Journal* **2020**, *18*, e06242, doi:10.2903/j.efsa.2020.6242.
28. Patel, A.; Matsakas, L.; Hřůzová, K.; Rova, U.; Christakopoulos, P. Biosynthesis of Nutraceutical Fatty Acids by the Oleaginous Marine Microalgae *Phaeodactylum Tricornutum* Utilizing Hydrolysates from Organosolv-Pretreated Birch and Spruce Biomass. *Mar Drugs* **2019**, *17*, E119, doi:10.3390/md17020119.
29. Borowitzka, M.A. Microalgae as Sources of Pharmaceuticals and Other Biologically Active Compounds. *J Appl Phycol* **1995**, *7*, 3–15, doi:10.1007/BF00003544.
30. Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A.A.; Ibraheem, I.B.M. Microalgae and Wastewater Treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2012**, *19*, 257–275, doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005.
31. Rehmanji, M.; Suresh, S.; Nesamma, A.A.; Jutur, P.P. Chapter 26 - Microalgal Cell Factories, a Platform for High-Value-Added Biorenewables to Improve the Economics of the Biorefinery. In *Microbial and Natural Macromolecules*, Das, S., Dash, H.R., Eds.; Academic Press, 2021; pp. 689–731 ISBN 978-0-12-820084-1.

32. Pal, P.; Chew, K.W.; Yen, H.-W.; Lim, J.W.; Lam, M.K.; Show, P.L. Cultivation of Oily Microalgae for the Production of Third-Generation Biofuels. *Sustainability* **2019**, *11*, 5424, doi:10.3390/su11195424.
33. Medipally, S.R.; Yusoff, F.M.; Banerjee, S.; Shariff, M. Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, e519513, doi:10.1155/2015/519513.
34. Islam, M.A.; Heimann, K.; Brown, R.J. Microalgae Biodiesel: Current Status and Future Needs for Engine Performance and Emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, *79*, 1160–1170, doi:10.1016/j.rser.2017.05.041.
35. Tawfik, A.; Eraky, M.; Alhajeri, N.S.; Osman, A.I.; Rooney, D.W. Cultivation of Microalgae on Liquid Anaerobic Digestate for Depollution, Biofuels and Cosmetics: A Review. *Environ Chem Lett* **2022**, doi:10.1007/s10311-022-01481-2.
36. Marchetti, J.; Bougaran, G.; Le Dean, L.; Mégrier, C.; Lukomska, E.; Kaas, R.; Olivo, E.; Baron, R.; Robert, R.; Cadoret, J.P. Optimizing Conditions for the Continuous Culture of *Isochrysis Affinis Galbana* Relevant to Commercial Hatcheries. *Aquaculture* **2012**, *326–329*, 106–115, doi:10.1016/j.aquaculture.2011.11.020.
37. Loubière, K.; Olivo, E.; Bougaran, G.; Pruvost, J.; Robert, R.; Legrand, J. A New Photobioreactor for Continuous Microalgal Production in Hatcheries Based on External-Loop Airlift and Swirling Flow. *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *102*, 132–147, doi:10.1002/bit.22035.
38. Garnier, M.; Bougaran, G.; Pavlovic, M.; Berard, J.-B.; Carrier, G.; Charrier, A.; Le Grand, F.; Lukomska, E.; Rouxel, C.; Schreiber, N.; et al. Use of a Lipid Rich Strain Reveals Mechanisms of Nitrogen Limitation and Carbon Partitioning in the Haptophyte *Tisochrysis Lutea*. *Algal Research* **2016**, *20*, 229–248, doi:10.1016/j.algal.2016.10.017.
39. Leong, Y.K.; Chen, C.-Y.; Varjani, S.; Chang, J.-S. Producing Fucoxanthin from Algae – Recent Advances in Cultivation Strategies and Downstream Processing. *Bioresource Technology* **2022**, *344*, 126170, doi:10.1016/j.biortech.2021.126170.
40. Marinho, Y.F.; Malafaia, C.B.; de Araújo, K.S.; da Silva, T.D.; dos Santos, A.P.F.; de Moraes, L.B.; Gálvez, A.O. Evaluation of the Influence of Different Culture Media on Growth, Life Cycle, Biochemical Composition, and Astaxanthin Production in *Haematococcus Pluvialis*. *Aquacult Int* **2021**, *29*, 757–778, doi:10.1007/s10499-021-00655-z.
41. Hossain, N.; Mahlia, T.M.I. Progress in Physicochemical Parameters of Microalgae Cultivation for Biofuel Production. *Critical Reviews in Biotechnology* **2019**, *39*, 835–859, doi:10.1080/07388551.2019.1624945.
42. Bougaran, G. La Co-Limitation Par l'azote et Le Phosphore : Étude Des Mécanismes Chez La Microalgue *Tisochrysis Lutea*. Thèse de doctorat, Nantes, 2014.
43. Flynn, K.J.; Fasham, M.J.R.; Hipkin, C.R. Modelling the Interactions between Ammonium and Nitrate Uptake in Marine Phytoplankton. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1997**, *352*, 1625–1645, doi:10.1098/rstb.1997.0145.
44. Bhaya, D.; Schwarz, R.; Grossman, A. Molecular Responses to Environmental Stress. In *The Ecology of Cyanobacteria*; The Netherlands, 2007; pp. 397–442 ISBN 978-0-7923-4735-4.
45. Masclaux-Daubresse, C.; Daniel-Vedele, F.; Dechorgnat, J.; Chardon, F.; Gaufichon, L.; Suzuki, A. Nitrogen Uptake, Assimilation and Remobilization in Plants: Challenges for Sustainable and Productive Agriculture. *Annals of Botany* **2010**, *105*, 1141–1157, doi:10.1093/aob/mcq028.
46. Redfield, A.C. On the Proportions of Organic Derivatives in Sea Water and Their Relation to the Composition of Plankton. *University Press of Liverpool* **1934**, 176–192.

47. Elrifi, I.R.; Turpin, D.H. Steady-State Luxury Consumption and the Concept of Optimum Nutrient Ratios: A Study with Phosphate and Nitrate Limited *Selenastrum Minutum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **1985**, *21*, 592–602, doi:10.1111/j.0022-3646.1985.00592.x.
48. Droop, M.R. Some Thoughts on Nutrient Limitation in Algae. *Journal of Phycology* **1973**, *9*, 264–272, doi:10.1111/j.1529-8817.1973.tb04092.x.
49. Droop, M.R. The Nutrient Status of Algal Cells in Continuous Culture. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1974**, *54*, 825–855, doi:10.1017/S002531540005760X.
50. Rhee, G.-Y. Effects of N:P Atomic Ratios and Nitrate Limitation on Algal Growth, Cell Composition, and Nitrate Uptake. *Limnology and Oceanography* **1978**, *23*, 10–25, doi:10.4319/lo.1978.23.1.0010.
51. Terry, K.L. Nitrogen and Phosphorus Requirements of *Pavlova Lutheri* in Continuous Culture. *Botanica marina* **1980**.
52. Kunikane, S.; Kaneko, M.; Maehara, R. Growth and Nutrient Uptake of Green Alga, *Scenedesmus Dimorphus*, under a Wide Range of Nitrogen/Phosphorus Ratio—I. Experimental Study. *Water Research* **1984**, *18*, 1299–1311, doi:10.1016/0043-1354(84)90036-8.
53. Boyd, P.W. Environmental Factors Controlling Phytoplankton Processes in the Southern Ocean. *Journal of Phycology* **2002**, *38*, 844–861, doi:10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01203.x.
54. Maberly, S.C.; King, L.; Dent, M.M.; Jones, R.I.; Gibson, C.E. Nutrient Limitation of Phytoplankton and Periphyton Growth in Upland Lakes. *Freshwater Biology* **2002**, *47*, 2136–2152, doi:10.1046/j.1365-2427.2002.00962.x.
55. Costa, S.S.; Miranda, A.L.; Andrade, B.B.; De Jesus Assis, D.; Souza, C.O.; de Morais, M.G.; Costa, J.A.V.; Druzian, J.I. Influence of Nitrogen on Growth, Biomass Composition, Production, and Properties of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by Microalgae. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *116*, 552–562, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064.
56. Dahmen-Ben Moussa, I.; Chtourou, H.; Karray, F.; Sayadi, S.; Dhouib, A. Nitrogen or Phosphorus Repletion Strategies for Enhancing Lipid or Carotenoid Production from *Tetraselmis Marina*. *Bioresource Technology* **2017**, *238*, 325–332, doi:10.1016/j.biortech.2017.04.008.
57. McClure, D.D.; Luiz, A.; Gerber, B.; Barton, G.W.; Kavanagh, J.M. An Investigation into the Effect of Culture Conditions on Fucoxanthin Production Using the Marine Microalgae *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Research* **2018**, *29*, 41–48, doi:10.1016/j.algal.2017.11.015.
58. Sahin, M.S.; Khazi, M.I.; Demirel, Z.; Dalay, M.C. Variation in Growth, Fucoxanthin, Fatty Acids Profile and Lipid Content of Marine Diatoms *Nitzschia* Sp. and *Nanofrustulum Shiloi* in Response to Nitrogen and Iron. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2019**, *17*, 390–398, doi:10.1016/j.bcab.2018.12.023.
59. Xia, S.; Gao, B.; Fu, J.; Xiong, J.; Zhang, C. Production of Fucoxanthin, Chrysolaminarin, and Eicosapentaenoic Acid by *Odontella Aurita* under Different Nitrogen Supply Regimes. *J Biosci Bioeng* **2018**, *126*, 723–729, doi:10.1016/j.jbiosc.2018.06.002.
60. Zarrinmehr, M.J.; Farhadian, O.; Heyrati, F.P.; Keramat, J.; Koutra, E.; Kornaros, M.; Daneshvar, E. Effect of Nitrogen Concentration on the Growth Rate and Biochemical



- Composition of the Microalga, *Isochrysis Galbana*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* **2019**, doi:10.1016/j.ejar.2019.11.003.
61. Dodd, J.C. Elements of Pond Design and Construction. In *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press, 1986 ISBN 978-0-203-71240-5.
  62. Oswald, W.J. Large Scale Algal Culture Systems Engineering Aspects. *Borowitzka M, Ed, Micro-Algal Biotechnology, Cambridge University Press* **1988**, 357–394.
  63. Doucha, J.; Lívanský, K. Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Exchange and Hydraulics in Outdoor Open High Density Microalgal (*Chlorella* Sp.) Photobioreactors Operated in a Middle and Southern European Climate. *J Appl Phycol* **2006**, *18*, 811–826, doi:10.1007/s10811-006-9100-4.
  64. Pruvost, J.; Pottier, L.; Legrand, J. Numerical Investigation of Hydrodynamic and Mixing Conditions in a Torus Photobioreactor. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 4476–4489, doi:10.1016/j.ces.2006.02.027.
  65. Rodolfi, L.; Biondi, N.; Guccione, A.; Bassi, N.; D’Ottavio, M.; Arganaraz, G.; Tredici, M.R. Oil and Eicosapentaenoic Acid Production by the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Cultivated Outdoors in Green Wall Panel (GWP) Reactors. *Biotechnology and Bioengineering* **2017**, *114*, 2204–2210, doi:10.1002/bit.26353.
  66. Vonshak, A. Laboratory Techniques for the Cultivation of Microalgae. In *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, CRC Press, 1986 ISBN 978-0-203-71240-5.
  67. Cadoret, P.; Bougaran, G.; Bérard, J.-B.; Carrier, G.; Charrier, A.; Coulombier, N.; Garnier, M.; Kaas, R.; Le Déan, L.; Lukomska, E.; et al. Microalgae and Biotechnology. In *Development of Marine Resources*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp. 57–115 ISBN 978-1-119-00776-0.
  68. Bendif, E.M.; Probert, I.; Schroeder, D.C.; de Vargas, C. On the Description of *Tisochrysis Lutea* Gen. Nov. Sp. Nov. and *Isochrysis Nuda* Sp. Nov. in the Isochrysidales, and the Transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *J Appl Phycol* **2013**, *25*, 1763–1776, doi:10.1007/s10811-013-0037-0.
  69. Kawachi, M.; Inouye, I. Functional Roles of the Haptonema and the Spine Scales in the Feeding Process of *Chrysochromulina Spinifera* (Fournier) Pienaar et Norris (Haptophyta = Prymnesiophyta). *Phycologia* **1995**, *34*, 193–200, doi:10.2216/i0031-8884-34-3-193.1.
  70. Jordan, R.W.; Chamberlain, A.H.L. Biodiversity among Haptophyte Algae. *Biodiversity and Conservation* **1997**, *6*, 131–152, doi:10.1023/A:1018383817777.
  71. Eikrem, W.; Medlin, L.K.; Henderiks, J.; Rokitta, S.; Rost, B.; Probert, I.; Throndsen, J.; Edvardsen, B. Haptophyta. In *Handbook of the Protists*, Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D.J., Corliss, J.O., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp. 1–61 ISBN 978-3-319-32669-6.
  72. Liu, H.; Aris-Brosou, S.; Probert, I.; de Vargas, C. A Time Line of the Environmental Genetics of the Haptophytes. *Mol Biol Evol* **2010**, *27*, 161–176, doi:10.1093/molbev/msp222.
  73. Green, J.C.; Jordan, R.W. Order Prymnesiida. In *Illustrated Guide to the Protozoa*, 2000; pp. 1268–1301.
  74. Liu, H.; Probert, I.; Uitz, J.; Claustre, H.; Aris-Brosou, S.; Frada, M.; Not, F.; de Vargas, C. Extreme Diversity in Noncalcifying Haptophytes Explains a Major Pigment Paradox in Open Oceans. *PNAS* **2009**, *106*, 12803–12808, doi:10.1073/pnas.0905841106.
  75. Edvardsen, B.; Egge, E.S.; Vaultot, D. Diversity and Distribution of Haptophytes Revealed by Environmental Sequencing and Metabarcoding – a Review. *pip* **2016**, *3*, 77–91, doi:10.1127/pip/2016/0052.

76. Gast, R.J.; McDonnell, T.A.; Caron, D.A. SrDna-Based Taxonomic Affinities of Algal Symbionts from a Planktonic Foraminifer and a Solitary Radiolarian. *Journal of Phycology* **2000**, *36*, 172–177, doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99133.x.
77. Decelle, J.; Probert, I.; Bittner, L.; Desdevises, Y.; Colin, S.; de Vargas, C.; Galí, M.; Simó, R.; Not, F. An Original Mode of Symbiosis in Open Ocean Plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 18000–18005, doi:10.1073/pnas.1212303109.
78. Sheehan, J.; Dunahay, T.; Benemann, J.; Roessler, P. *Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report*, 1998; pp. 1–328.
79. Gonçalves de Oliveira-Júnior, R.; Grougnet, R.; Bodet, P.-E.; Bonnet, A.; Nicolau, E.; Jebali, A.; Rumin, J.; Picot, L. Updated Pigment Composition of *Tisochrysis Lutea* and Purification of Fucoxanthin Using Centrifugal Partition Chromatography Coupled to Flash Chromatography for the Chemosensitization of Melanoma Cells. *Algal Research* **2020**, *51*, 102035, doi:10.1016/j.algal.2020.102035.
80. Mohamadnia, S.; Tavakoli, O.; Faramarzi, M.A.; Shamsollahi, Z. Production of Fucoxanthin by the Microalga *Tisochrysis Lutea*. A Review of Recent Developments. *Aquaculture* **2019**, *734637*, doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734637.
81. Masojídek, J.; Torzillo, G.; Koblížek, M. Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture*, John Wiley & Sons, Ltd, 2013; pp. 21–36 ISBN 978-1-118-56716-6.
82. Hall, D.O.; Rao, K. *Photosynthesis*, Cambridge University Press, 1999; ISBN 978-0-521-64497-6.
83. Sánchez-Saavedra, M.P.; Voltolina, D. Effect of Photon Fluence Rates of White and Blue-Green Light on Growth Efficiency and Pigment Content Of Three Diatom Species In Batch Cultures. *Ciencias Marinas* **2002**, *28*, 273–279, doi:10.7773/cm.v28i3.225.
84. Haxo, F.T.; Blinks, L.R. Photosynthetic Action Spectra of Marine Algae. *J Gen Physiol* **1950**, *33*, 389–422, doi:10.1085/jgp.33.4.389.
85. Lichtenthaler, H.K. [34] Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In *Methods in Enzymology*, Plant Cell Membranes; Academic Press, 1987; Vol. 148, pp. 350–382.
86. Falkowski, P.G.; Raven, J.A. *Aquatic Photosynthesis: Second Edition*, Princeton University Press, 2007; ISBN 978-1-4008-4972-7.
87. Kanehisa Laboratories KEGG PATHWAY Database Available online: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (accessed on 16 October 2022).
88. Beale, S.I. Enzymes of Chlorophyll Biosynthesis. *Photosynthesis Research* **1999**, *60*, 43–73, doi:10.1023/A:1006297731456.
89. Lohr, M.; Wilhelm, C. Algae Displaying the Diadinoxanthin Cycle Also Possess the Violaxanthin Cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 8784–8789, doi:10.1073/pnas.96.15.8784.
90. Lohr, M.; Wilhelm, C. Xanthophyll Synthesis in Diatoms: Quantification of Putative Intermediates and Comparison of Pigment Conversion Kinetics with Rate Constants Derived from a Model. *Planta* **2001**, *212*, 382–391, doi:10.1007/s004250000403.
91. Wang, Y.; Chen, T. The Biosynthetic Pathway of Carotenoids in the Astaxanthin-Producing Green Alga *Chlorella Zofingiensis*. *World J Microbiol Biotechnol* **2008**, *24*, 2927–2932, doi:10.1007/s11274-008-9834-z.
92. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., Eds.; Monographs on oceanographic methodology; UNESCO Publishing: Paris, 1997; ISBN 978-92-3-103275-2.

93. Lee, R.E. *Phycology*, 4th ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2008;
94. Kuczynska, P.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 5847–5881, doi:10.3390/md13095847.
95. Eggink, L.L.; Park, H.; Hooper, J.K. The Role of Chlorophyll b in Photosynthesis: Hypothesis. *BMC Plant Biology* **2001**, *1*, 2, doi:10.1186/1471-2229-1-2.
96. Jeffrey, S.W. Introduction to Marine Phytoplankton and Their Pigment Signatures. *Phytoplankton pigment in oceanography* **1997**, 37–84.
97. Young, A.; Britton, G. *Carotenoids in Photosynthesis*; Springer Science & Business Media, 2012; ISBN 978-94-011-2124-8.
98. Larkum, A.W.D.; Douglas, S.; Raven, J.A. *Photosynthesis in Algae*; Springer Science & Business Media, 2012; ISBN 978-94-007-1038-2.
99. Hill, R.; Bendall, F. Function of the Two Cytochrome Components in Chloroplasts: A Working Hypothesis. *Nature* **1960**, *186*, 136–137, doi:10.1038/186136a0.
100. Kirk, J.T.O. Thermal Dissociation of Fucoxanthin-Protein Binding in Pigment Complexes from Chloroplasts of *Hormosira* (Phaeophyta). *Plant Science Letters* **1977**, *9*, 373–380, doi:10.1016/0304-4211(77)90109-2.
101. Büchel, C. Light-Harvesting Complexes of Diatoms: Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins. In *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms*; Larkum, A.W.D., Grossman, A.R., Raven, J.A., Eds.; Advances in Photosynthesis and Respiration; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 441–457 ISBN 978-3-030-33397-3.
102. Lavaud, J.; Rousseau, B.; van Gorkom, H.J.; Etienne, A.-L. Influence of the Diadinoxanthin Pool Size on Photoprotection in the Marine Planktonic Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Physiology* **2002**, *129*, 1398–1406, doi:10.1104/pp.002014.
103. Lavaud, J.; Rousseau, B.; Etienne, A.-L. General Features of Photoprotection by Energy Dissipation in Planktonic Diatoms (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **2004**, *40*, 130–137, doi:10.1046/j.1529-8817.2004.03026.x.
104. Wang, W.; Zhao, S.; Pi, X.; Kuang, T.; Sui, S.-F.; Shen, J.-R. Structural Features of the Diatom Photosystem II–Light-Harvesting Antenna Complex. *The FEBS Journal* **2019**, *n/a*, doi:10.1111/febs.15183.
105. Wang, W.; Yu, L.-J.; Xu, C.; Tomizaki, T.; Zhao, S.; Umena, Y.; Chen, X.; Qin, X.; Xin, Y.; Suga, M.; et al. Structural Basis for Blue-Green Light Harvesting and Energy Dissipation in Diatoms. *Science* **2019**, *363*, doi:10.1126/science.aav0365.
106. Bhaya, D.; Grossman, A.R. Characterization of Gene Clusters Encoding the Fucoxanthin Chlorophyll Proteins of the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*, 4458–4466, doi:10.1093/nar/21.19.4458.
107. Apt, K.E.; Bhaya, D.; Grossman, A.R. Characterization of Genes Encoding the Light-Harvesting Proteins in Diatoms: Biogenesis of the Fucoxanthin Chlorophyll a/c Protein Complex. *J Appl Phycol* **1994**, *6*, 225–230, doi:10.1007/BF02186075.
108. Apt, K.E.; Clendennen, S.K.; Powers, D.A.; Grossman, A.R. The Gene Family Encoding the Fucoxanthin Chlorophyll Proteins from the Brown Alga *Macrocystis Pyrifera*. *Molec. Gen. Genet.* **1995**, *246*, 455–464, doi:10.1007/BF00290449.
109. Nagao, R.; Kato, K.; Ifuku, K.; Suzuki, T.; Kumazawa, M.; Uchiyama, I.; Kashino, Y.; Dohmae, N.; Akimoto, S.; Shen, J.-R.; et al. Structural Basis for Assembly and Function of a Diatom Photosystem I–Light-Harvesting Supercomplex. *Nature Communications* **2020**, *11*, 2481, doi:10.1038/s41467-020-16324-3.
110. Kumazawa, M.; Nishide, H.; Nagao, R.; Inoue-Kashino, N.; Shen, J.-R.; Nakano, T.; Uchiyama, I.; Kashino, Y.; Ifuku, K. Molecular Phylogeny of Fucoxanthin-Chlorophyll a/c Proteins from

- Chaetoceros Gracilis* and Lhcq/Lhcf Diversity. *Physiologia Plantarum* **2021**, doi:10.1111/ppl.13598.
111. Nagao, R.; Kato, K.; Suzuki, T.; Ifuku, K.; Uchiyama, I.; Kashino, Y.; Dohmae, N.; Akimoto, S.; Shen, J.-R.; Miyazaki, N.; et al. Structural Basis for Energy Harvesting and Dissipation in a Diatom PSII–FCPII Supercomplex. *Nat. Plants* **2019**, *5*, 890–901, doi:10.1038/s41477-019-0477-x.
112. Pi, X.; Zhao, S.; Wang, W.; Liu, D.; Xu, C.; Han, G.; Kuang, T.; Sui, S.-F.; Shen, J.-R. The Pigment-Protein Network of a Diatom Photosystem II–Light-Harvesting Antenna Supercomplex. *Science* **2019**, *365*, eaax4406, doi:10.1126/science.aax4406.
113. Xu, C.; Pi, X.; Huang, Y.; Han, G.; Chen, X.; Qin, X.; Huang, G.; Zhao, S.; Yang, Y.; Kuang, T.; et al. Structural Basis for Energy Transfer in a Huge Diatom PSI-FCPI Supercomplex. *Nat Commun* **2020**, *11*, 5081, doi:10.1038/s41467-020-18867-x.
114. Bailleul, B.; Rogato, A.; de Martino, A.; Coesel, S.; Cardol, P.; Bowler, C.; Falciatore, A.; Finazzi, G. An Atypical Member of the Light-Harvesting Complex Stress-Related Protein Family Modulates Diatom Responses to Light. *PNAS* **2010**, *107*, 18214–18219, doi:10.1073/pnas.1007703107.
115. Taddei, L.; Stella, G.R.; Rogato, A.; Bailleul, B.; Fortunato, A.E.; Annunziata, R.; Sanges, R.; Thaler, M.; Lepetit, B.; Lavaud, J.; et al. Multisignal Control of Expression of the LHCX Protein Family in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *EXBOTJ* **2016**, *67*, 3939–3951, doi:10.1093/jxb/erw198.
116. Lepetit, B.; Gélín, G.; Lepetit, M.; Sturm, S.; Vugrinec, S.; Rogato, A.; Kroth, P.G.; Falciatore, A.; Lavaud, J. The Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Adjusts Nonphotochemical Fluorescence Quenching Capacity in Response to Dynamic Light via Fine-Tuned Lhcx and Xanthophyll Cycle Pigment Synthesis. *New Phytol* **2016**, *214*, 205–218, doi:10.1111/nph.14337.
117. Buck, J.M.; Sherman, J.; Bártulos, C.R.; Serif, M.; Halder, M.; Henkel, J.; Falciatore, A.; Lavaud, J.; Gorbunov, M.Y.; Kroth, P.G.; et al. Lhcx Proteins Provide Photoprotection via Thermal Dissipation of Absorbed Light in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Nature Communications* **2019**, *10*, 4167, doi:10.1038/s41467-019-12043-6.
118. Beer, A.; Gundermann, K.; Beckmann, J.; Büchel, C. Subunit Composition and Pigmentation of Fucoxanthin–Chlorophyll Proteins in Diatoms: Evidence for a Subunit Involved in Diadinoxanthin and Diatoxanthin Binding. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13046–13053, doi:10.1021/bi061249h.
119. Zhu, S.-H.; Green, B.R. Photoprotection in the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Role of L1818-like Proteins in Response to High Light Stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2010**, *1797*, 1449–1457, doi:10.1016/j.bbabi.2010.04.003.
120. Lepetit, B.; Sturm, S.; Rogato, A.; Gruber, A.; Sachse, M.; Falciatore, A.; Kroth, P.G.; Lavaud, J. High Light Acclimation in the Secondary Plastids Containing Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Is Triggered by the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Plant Physiology* **2013**, *161*, 853–865, doi:10.1104/pp.112.207811.
121. Goss, R.; Lepetit, B. Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology* **2015**, *172*, 13–32, doi:10.1016/j.jplph.2014.03.004.
122. Jensen, E.; Clément, R.; Maberly, S.C.; Gontero, B. Regulation of the Calvin–Benson–Bassham Cycle in the Enigmatic Diatoms: Biochemical and Evolutionary Variations on an Original Theme. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2017**, *372*, 20160401, doi:10.1098/rstb.2016.0401.

123. Büchel, C. Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins in Diatoms: 18 and 19 KDa Subunits Assemble into Different Oligomeric States. *Biochemistry* **2003**, *42*, 13027–13034, doi:10.1021/bi0349468.
124. Papagiannakis, E.; Van Stokkum, I.H.M.; Fey, H.; Büchel, C.; Van Grondelle, R. Spectroscopic Characterization of the Excitation Energy Transfer in the Fucoxanthin–Chlorophyll Protein of Diatoms. *Photosynth Res* **2005**, *86*, 241–250, doi:10.1007/s11120-005-1003-8.
125. Nagao, R.; Yokono, M.; Akimoto, S.; Tomo, T. High Excitation Energy Quenching in Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein Complexes from the Diatom *Chaetoceros Gracilis*. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 6888–6895, doi:10.1021/jp403923q.
126. Akimoto, S.; Teshigahara, A.; Yokono, M.; Mimuro, M.; Nagao, R.; Tomo, T. Excitation Relaxation Dynamics and Energy Transfer in Fucoxanthin–Chlorophyll a/c-Protein Complexes, Probed by Time-Resolved Fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2014**, *1837*, 1514–1521, doi:10.1016/j.bbabi.2014.02.002.
127. Gelzinis, A.; Butkus, V.; Songaila, E.; Augulis, R.; Gall, A.; Büchel, C.; Robert, B.; Abramavicius, D.; Zigmantas, D.; Valkunas, L. Mapping Energy Transfer Channels in Fucoxanthin–Chlorophyll Protein Complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2015**, *1847*, 241–247, doi:10.1016/j.bbabi.2014.11.004.
128. Lefebvre, S.C.; Harris, G.; Webster, R.; Leonardos, N.; Geider, R.J.; Raines, C.A.; Read, B.A.; Garrido, J.L. Characterization and Expression Analysis of the Lhcf Gene Family in *Emiliania Huxleyi* (Haptophyta) Reveals Differential Responses to Light and CO<sub>2</sub>. *Journal of Phycology* **2010**, *46*, 123–134, doi:https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00793.x.
129. McKew, B.A.; Lefebvre, S.C.; Achterberg, E.P.; Metodieva, G.; Raines, C.A.; Metodiev, M.V.; Geider, R.J. Plasticity in the Proteome of *Emiliania Huxleyi* CCMP 1516 to Extremes of Light Is Highly Targeted. *New Phytologist* **2013**, *200*, 61–73, doi:10.1111/nph.12352.
130. Koziol, A.G.; Borza, T.; Ishida, K.-I.; Keeling, P.; Lee, R.W.; Durnford, D.G. Tracing the Evolution of the Light-Harvesting Antennae in Chlorophyll a/b-Containing Organisms. *Plant Physiology* **2007**, *143*, 1802–1816, doi:10.1104/pp.106.092536.
131. Harper, J.T.; Waanders, E.; Keeling, P.J. On the Monophyly of Chromalveolates Using a Six-Protein Phylogeny of Eukaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2005**, *55*, 487–496, doi:10.1099/ijs.0.63216-0.
132. Patron, N.J.; Inagaki, Y.; Keeling, P.J. Multiple Gene Phylogenies Support the Monophyly of Cryptomonad and Haptophyte Host Lineages. *Current Biology* **2007**, *17*, 887–891, doi:10.1016/j.cub.2007.03.069.
133. McEvoy, J.P.; Brudvig, G.W. Water-Splitting Chemistry of Photosystem II. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4455–4483, doi:10.1021/cr0204294.
134. Ames, J. The Function of Plastoquinone in Photosynthetic Electron Transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **1973**, *301*, 35–51, doi:10.1016/0304-4173(73)90011-6.
135. Owens, T.G. Light-Harvesting Function in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. II. Distribution of Excitation Energy between the Photosystems. *Plant Physiology* **1986**, *80*, 739–746, doi:10.1104/pp.80.3.739.
136. Falkowski, P.G. Light-Shade Adaptation in Marine Phytoplankton. In *Primary Productivity in the Sea*; Falkowski, P.G., Ed.; Environmental Science Research; Springer US: Boston, MA, 1980; pp. 99–119 ISBN 978-1-4684-3890-1.
137. Geider, R.J.; la Roche, J.; Greene, R.M.; Olaizola, M. Response of the Photosynthetic Apparatus of *Phaeodactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae) to Nitrate, Phosphate, or

- Iron Starvation1. *Journal of Phycology* **1993**, *29*, 755–766, doi:10.1111/j.0022-3646.1993.00755.x.
138. *The Physiology of Microalgae*, Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A., Eds.; Developments in Applied Phycology; Springer International Publishing, 2016; ISBN 978-3-319-24943-8.
139. Kurisu, G.; Zhang, H.; Smith, J.L.; Cramer, W.A. Structure of the Cytochrome B6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* **2003**, *302*, 1009–1014, doi:10.1126/science.1090165.
140. Redding, K.E. Chapter 15 - Photosystem I. In *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*; Harris, E.H., Stern, D.B., Witman, G.B., Eds.; Academic Press: London, 2009; pp. 541–572 ISBN 978-0-12-370873-1.
141. Goodwin, T.W. Biogeochemistry of Carotenoids. In *The Biochemistry of the Carotenoids: Volume I Plants*; Goodwin, T.W., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1980; pp. 346–349 ISBN 978-94-009-5860-9.
142. Goldstein, J.L.; Brown, M.S. Regulation of the Mevalonate Pathway. *Nature* **1990**, *343*, 425–430, doi:10.1038/343425a0.
143. Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A. Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiology* **2002**, *130*, 1079–1089, doi:10.1104/pp.007138.
144. Kuntz, M.; Römer, S.; Suire, C.; Hugueney, P.; Weil, J.H.; Schantz, R.; Camara, B. Identification of a cDNA for the Plastid-Located Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase from *Capsicum Annuum*. Correlative Increase in Enzyme Activity and Transcript Level during Fruit Ripening. *The Plant Journal* **1992**, *2*, 25–34, doi:10.1111/j.1365-3113X.1992.00025.x.
145. Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1989**, *274*, 532–538, doi:10.1016/0003-9861(89)90467-0.
146. Demmig-Adams, B.; Adams, W.W. The Xanthophyll Cycle, Protein Turnover, and the High Light Tolerance of Sun-Acclimated Leaves. *Plant Physiology* **1993**, *103*, 1413–1420, doi:10.1104/pp.103.4.1413.
147. Demmig-Adams, B.; Adams, W.W. The Role of Xanthophyll Cycle Carotenoids in the Protection of Photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1996**, *1*, 21–26, doi:10.1016/S1360-1385(96)80019-7.
148. García-Plazaola, J.L.; Matsubara, S.; Osmond, C.B. The Lutein Epoxide Cycle in Higher Plants: Its Relationships to Other Xanthophyll Cycles and Possible Functions. *Functional Plant Biol.* **2007**, *34*, 759–773, doi:10.1071/FP07095.
149. Yamamoto, H.Y.; Nakayama, T.O.M.; Chichester, C.O. Studies on the Light and Dark Interconversions of Leaf Xanthophylls. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1962**, *97*, 168–173, doi:10.1016/0003-9861(62)90060-7.
150. Aرسالane, W.; Rousseau, B.; Duval, J.-C. Influence of the Pool Size of the Xanthophyll Cycle on the Effects of Light Stress in a Diatom: Competition Between Photoprotection and Photoinhibition. *Photochemistry and Photobiology* **1994**, *60*, 237–243, doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05097.x.
151. Britton, G. Overview of Carotenoid Biosynthesis. In *Carotenoids: Biosynthesis and metabolism*; Birkhäuser, 1998; Vol. 3, pp. 13–147 ISBN 978-3-0348-7836-4.
152. Rochaix, J.-D. Regulation and Dynamics of the Light-Harvesting System. *Annual Review of Plant Biology* **2014**, *65*, 287–309, doi:10.1146/annurev-arplant-050213-040226.

153. Lavaud, J.; Strzepek, R.F.; Kroth, P.G. Photoprotection Capacity Differs among Diatoms: Possible Consequences on the Spatial Distribution of Diatoms Related to Fluctuations in the Underwater Light Climate. *Limnology and Oceanography* **2007**, *52*, 1188–1194, doi:10.4319/lo.2007.52.3.1188.
154. Lichtlé, C.; Arsalane, W.; Duval, J.C.; Passaquet, C. Characterization of the Light-Harvesting Complex of *Giraudyopsis STELlifer* (Chrysophyceae) and Effects of Light Stress1. *Journal of Phycology* **1995**, *31*, 380–387, doi:10.1111/j.0022-3646.1995.00380.x.
155. Goss, R.; Böhme, K.; Wilhelm, C. The Xanthophyll Cycle of *Mantoniella Squamata* Converts Violaxanthin into Antheraxanthin but Not to Zeaxanthin: Consequences for the Mechanism of Enhanced Non-Photochemical Energy Dissipation. *Planta* **1998**, *205*, 613–621, doi:10.1007/s004250050364.
156. Brown, B.E.; Ambarsari, I.; Warner, M.E.; Fitt, W.K.; Dunne, R.P.; Gibb, S.W.; Cummings, D.G. Diurnal Changes in Photochemical Efficiency and Xanthophyll Concentrations in Shallow Water Reef Corals: Evidence for Photoinhibition and Photoprotection. *Coral Reefs* **1999**, *18*, 99–105, doi:10.1007/s003380050163.
157. Häder, D.P. Penetration and Effects of Solar UV-B on Phytoplankton and Macroalgae. *Plant Ecology* **1997**, *128*, 5–13, doi:10.1023/A:1009718604610.
158. Harris, G. *Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation*; Springer Netherlands, 1986; ISBN 978-0-412-30690-7.
159. Reynolds, C.S. *The Ecology of Phytoplankton*; Cambridge University Press, 2006; ISBN 978-1-139-45489-6.
160. Bracher, A.U.; Wiencke, C. Simulation of the Effects of Naturally Enhanced UV Radiation on Photosynthesis of Antarctic Phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* **2000**, *196*, 127–141, doi:10.3354/meps196127.
161. Larkum, A.W.D.; Wood, W.F. The Effect of UV-B Radiation on Photosynthesis and Respiration of Phytoplankton, Benthic Macroalgae and Seagrasses. *Photosynth Res* **1993**, *36*, 17–23, doi:10.1007/BF00018071.
162. Ledford, H.K.; Niyogi, K.K. Singlet Oxygen and Photo-Oxidative Stress Management in Plants and Algae. *Plant, Cell & Environment* **2005**, *28*, 1037–1045, doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01374.x.
163. Kanervo, E.; Suorsa, M.; Aro, E.-M. Functional Flexibility and Acclimation of the Thylakoid Membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2005**, *4*, 1072–1080, doi:10.1039/B507866K.
164. Müller, P.; Li, X.-P.; Niyogi, K.K. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* **2001**, *125*, 1558–1566, doi:10.1104/pp.125.4.1558.
165. Premvardhan, L.; Bordes, L.; Beer, A.; Büchel, C.; Robert, B. Carotenoid Structures and Environments in Trimeric and Oligomeric Fucoxanthin Chlorophyll a/C2 Proteins from Resonance Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12565–12574, doi:10.1021/jp903029g.
166. Malnoë, A. Photoinhibition or Photoprotection of Photosynthesis? Update on the (Newly Termed) Sustained Quenching Component QH. *Environmental and Experimental Botany* **2018**, *154*, 123–133, doi:10.1016/j.envexpbot.2018.05.005.
167. Zigman, M.; Dubinsky, Z.; Iluz, D. The Xanthophyll Cycle in Aquatic Phototrophs and Its Role in the Mitigation of Photoinhibition and Photodynamic Damage. In *Applied Photosynthesis*; Najafpour, M., Ed.; InTech: London, UK, 2012 ISBN 978-953-51-0061-4.

168. Ruban, A.V.; Johnson, M.P.; Duffy, C.D.P. The Photoprotective Molecular Switch in the Photosystem II Antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817*, 167–181, doi:10.1016/j.bbabi.2011.04.007.
169. Laval-Martin, D.; Mazliak, P. *Physiologie Végétale, Nutrition et Métabolisme*, Méthodes; 1995; Vol. 1; ISBN 2 7056 6253 7.
170. Lavaud, J. Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *Functional Plant Science and Biotechnology* **2007**, *1*, 267.
171. Lepetit, B.; Goss, R.; Jakob, T.; Wilhelm, C. Molecular Dynamics of the Diatom Thylakoid Membrane under Different Light Conditions. *Photosynth Res* **2012**, *111*, 245–257, doi:10.1007/s11120-011-9633-5.
172. Goss, R.; Jakob, T. Regulation and Function of Xanthophyll Cycle-Dependent Photoprotection in Algae. *Photosynth Res* **2010**, *106*, 103–122, doi:10.1007/s11120-010-9536-x.
173. Pajot, A.; Hao Huynh, G.; Picot, L.; Marchal, L.; Nicolau, E. Fucoxanthin from Algae to Human, an Extraordinary Bioresource: Insights and Advances in up and Downstream Processes. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 222, doi:10.3390/md20040222.
174. Bai, Y.; Cao, T.; Dautermann, O.; Buschbeck, P.; Cantrell, M.B.; Chen, Y.; Lein, C.D.; Shi, X.; Ware, M.A.; Yang, F.; et al. Green Diatom Mutants Reveal an Intricate Biosynthetic Pathway of Fucoxanthin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119*, e2203708119, doi:10.1073/pnas.2203708119.
175. Liaaen-Jensen, S. Chapter 1 - Marine Carotenoids. In *Marine Natural Products*, Scheuer, P.J., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1978; pp. 1–73 ISBN 978-0-12-624002-3.
176. D’Orazio, N.; Gemello, E.; Gammone, M.; de Girolamo, M.; Ficoneri, C.; Riccioni, G. Fucoxanthin: A Treasure from the Sea. *Marine Drugs* **2012**, *10*, 604–616, doi:10.3390/md10030604.
177. Englert, G.; Bjørnland, T.; Liaaen-Jensen, S. 1D and 2D NMR Study of Some Allenic Carotenoids of the Fucoxanthin Series. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1990**, *28*, 519–528, doi:10.1002/mrc.1260280610.
178. Peng, J.; Yuan, J.-P.; Wu, C.-F.; Wang, J.H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 1806–1828, doi:10.3390/md9101806.
179. Sathasivam, R.; Ki, J.-S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Marine Drugs* **2018**, *16*, 26, doi:10.3390/md16010026.
180. Koo, S.Y.; Hwang, J.-H.; Yang, S.-H.; Um, J.-I.; Hong, K.W.; Kang, K.; Pan, C.-H.; Hwang, K.T.; Kim, S.M. Anti-Obesity Effect of Standardized Extract of Microalga *Phaeodactylum Tricornutum* Containing Fucoxanthin. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 311, doi:10.3390/md17050311.
181. Kawee-Ai, A.; Kim, S.M. Application of Microalgal Fucoxanthin for the Reduction of Colon Cancer Risk: Inhibitory Activity of Fucoxanthin against  $\beta$ -Glucuronidase and DLD-1 Cancer Cells. *NPC Natural Product Communications* **2014**, *5*.
182. Liu, M.; Li, W.; Chen, Y.; Wan, X.; Wang, J. Fucoxanthin: A Promising Compound for Human Inflammation-Related Diseases. *Life Sciences* **2020**, *255*, 117850, doi:10.1016/j.lfs.2020.117850.
183. Zarekarizi, A.; Hoffmann, L.; Burritt, D. Approaches for the Sustainable Production of Fucoxanthin, a Xanthophyll with Potential Health Benefits. *J Appl Phycol* **2019**, *31*, 281–299, doi:10.1007/s10811-018-1558-3.



184. Mordi, R.C. Mechanism of Beta-Carotene Degradation. *Biochem J* **1993**, *292*, 310–312.
185. Aman, R.; Schieber, A.; Carle, R. Effects of Heating and Illumination on Trans–Cis Isomerization and Degradation of  $\beta$ -Carotene and Lutein in Isolated Spinach Chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9512–9518, doi:10.1021/jf050926w.
186. Achir, N.; Randrianatoandro, V.A.; Bohuon, P.; Laffargue, A.; Avallone, S. Kinetic Study of  $\beta$ -Carotene and Lutein Degradation in Oils during Heat Treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2010**, *112*, 349–361, doi:10.1002/ejlt.200900165.
187. Rodriguez-Amaya, D.B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. *ILSI Press* **2001**, 71.
188. Böhm, V.; Puspitasari-Nienaber, N.L.; Ferruzzi, M.G.; Schwartz, S.J. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of  $\alpha$ -Carotene,  $\beta$ -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 221–226, doi:10.1021/jf010888q.
189. Kawee-ai, A.; Kuntiya, A.; Kim, S.M. Anticholinesterase and Antioxidant Activities of Fucoxanthin Purified from the Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Natural Product Communications* **2013**, *8*, 1934578X1300801, doi:10.1177/1934578X1300801010.
190. Zhang, Y.; Fang, H.; Xie, Q.; Sun, J.; Liu, R.; Hong, Z.; Yi, R.; Wu, H. Comparative Evaluation of the Radical-Scavenging Activities of Fucoxanthin and Its Stereoisomers. *Molecules* **2014**, *19*, 2100–2113, doi:10.3390/molecules19022100.
191. Nakazawa, Y.; Sashima, T.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Comparative Evaluation of Growth Inhibitory Effect of Stereoisomers of Fucoxanthin in Human Cancer Cell Lines. *Journal of Functional Foods* **2009**, *1*, 88–97, doi:10.1016/j.jff.2008.09.015.
192. Abu-Ghannam, N.; Shannon, E. Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as Functional Food. In *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 39–64 ISBN 978-1-119-04896-1.
193. Kuczynska, P.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 5847–5881, doi:10.3390/md13095847.
194. Bauer, C.M.; Schmitz, C.; Corrêa, R.G.; Herrera, C.M.; Ramlov, F.; Oliveira, E.R.; Pizzato, A.; Varela, L.A.C.; Cabral, D.Q.; Yunes, R.A.; et al. In Vitro Fucoxanthin Production by the *Phaeodactylum Tricornutum* Diatom. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Vol. 63, pp. 211–242 ISBN 978-0-12-817901-7.
195. Polívka, T.; Sundström, V. Ultrafast Dynamics of Carotenoid Excited States—From Solution to Natural and Artificial Systems. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2021–2072, doi:10.1021/cr020674n.
196. Zigmantas, D.; Hiller, R.G.; Sharples, F.P.; Frank, H.A.; Sundström, V.; Polívka, T. Effect of a Conjugated Carbonyl Group on the Photophysical Properties of Carotenoids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 3009–3016, doi:10.1039/B315786E.
197. Premvardhan, L.; Sandberg, D.J.; Fey, H.; Birge, R.R.; Büchel, C.; van Grondelle, R. The Charge-Transfer Properties of the S<sub>2</sub> State of Fucoxanthin in Solution and in Fucoxanthin Chlorophyll-a/C<sub>2</sub> Protein (FCP) Based on Stark Spectroscopy and Molecular-Orbital Theory. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 11838–11853, doi:10.1021/jp802689p.
198. Políkva, T.; Zigmantas, D.; Hiller, R.G.; Sundström, V. Excited State Dynamics of the Carotenoid Peridinin. In *Femtochemistry and Femtobiology: Ultrafast Events in Molecular Science*; Martin, M.M., Hynes, J.T., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2004; pp. 445–452 ISBN 978-0-08-050626-5.
199. Di Valentin, M.; Büchel, C.; Giacometti, G.M.; Carbonera, D. Chlorophyll Triplet Quenching by Fucoxanthin in the Fucoxanthin–Chlorophyll Protein from the Diatom *Cyclotella*

- Meneghiniana. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *427*, 637–641, doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.113.
200. Goss, R.; Ann Pinto, E.; Wilhelm, C.; Richter, M. The Importance of a Highly Active and  $\Delta$ pH-Regulated Diatoxanthin Epoxidase for the Regulation of the PS II Antenna Function in Diadinoxanthin Cycle Containing Algae. *Journal of Plant Physiology* **2006**, *163*, 1008–1021, doi:10.1016/j.jplph.2005.09.008.
201. Xiao, H.; Zhao, J.; Fang, C.; Cao, Q.; Xing, M.; Li, X.; Hou, J.; Ji, A.; Song, S. Advances in Studies on the Pharmacological Activities of Fucoxanthin. *Marine Drugs* **2020**, *18*, 634, doi:10.3390/md18120634.
202. Tiwari, A.; Melchor-Martínez, E.M.; Saxena, A.; Kapoor, N.; Singh, K.J.; Saldarriaga-Hernández, S.; Parra-Saldívar, R.; Iqbal, H.M.N. Therapeutic Attributes and Applied Aspects of Biological Macromolecules (Polypeptides, Fucoxanthin, Sterols, Fatty Acids, Polysaccharides, and Polyphenols) from Diatoms — A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *171*, 398–413, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.219.
203. Aghajanpour, M.; Nazer, M.R.; Obeidavi, Z.; Akbari, M.; Ezati, P.; Kor, M. Functional Foods and Their Role in Cancer Prevention and Health Promotion: A Comprehensive Review. *Am J Cancer Res* **2017**, *30*.
204. Irvani, N.; Hajiaghaee, R.; Zarekarizi, A.R. A Review on Biosynthesis, Health Benefits and Extraction Methods of Fucoxanthin, Particular Marine Carotenoids in Algae. *Journal of Medicinal Plants* **2018**, *17*, 25.
205. Lourenço-Lopes, C.; Fraga-Corral, M.; Jimenez-Lopez, C.; Carpena, M.; Pereira, A.G.; Garcia-Oliveira, P.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Biological Action Mechanisms of Fucoxanthin Extracted from Algae for Application in Food and Cosmetic Industries. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, doi:10.1016/j.tifs.2021.03.012.
206. Wang, H.-M.D.; Chen, C.-C.; Huynh, P.; Chang, J.-S. Exploring the Potential of Using Algae in Cosmetics. *Bioresource Technology* **2015**, *184*, 355–362, doi:10.1016/j.biortech.2014.12.001.
207. Khaw, Y.S.; Yusoff, F.M.; Tan, H.T.; Noor Mazli, N.A.I.; Nazarudin, M.F.; Shaharuddin, N.A.; Omar, A.R. The Critical Studies of Fucoxanthin Research Trends from 1928 to June 2021: A Bibliometric Review. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 606, doi:10.3390/md19110606.
208. Sugawara, T.; Baskaran, V.; Tsuzuki, W.; Nagao, A. Brown Algae Fucoxanthin Is Hydrolyzed to Fucoxanthinol during Absorption by Caco-2 Human Intestinal Cells and Mice. *J Nutr* **2002**, *132*, 946–951, doi:10.1093/jn/132.5.946.
209. Terasaki, M.; Takahashi, S.; Nishimura, R.; Kubota, A.; Kojima, H.; Ohta, T.; Hamada, J.; Kuramitsu, Y.; Maeda, H.; Miyashita, K.; et al. A Marine Carotenoid of Fucoxanthinol Accelerates the Growth of Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cells. *Nutrition and Cancer* **2021**, *0*, 1–16, doi:10.1080/01635581.2020.1863994.
210. Terasaki, M.; Inoue, T.; Murase, W.; Kubota, A.; Kojima, H.; Kojoma, M.; Ohta, T.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M.; et al. A Fucoxanthinol Induces Apoptosis in a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Cell. *Cancer Genomics Proteomics* **2021**, *18*, 133–146, doi:10.21873/cgp.20248.
211. Terasaki, M.; Nishizaka, Y.; Murase, W.; Kubota, A.; Kojima, H.; Kojoma, M.; Tanaka, T.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M.; et al. Effect of Fucoxanthinol on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells from an N-Nitrosobis(2-Oxopropyl)Amine-Initiated Syrian Golden Hamster Pancreatic Carcinogenesis Model. *Cancer Genomics & Proteomics* **2021**, *18*, 407–423, doi:10.21873/cgp.20268.

212. Bigagli, E.; D'Ambrosio, M.; Cinci, L.; Niccolai, A.; Biondi, N.; Rodolfi, L.; Dos Santos Nascimento, L.B.; Tredici, M.R.; Luceri, C. A Comparative In Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Effects of a *Tisochrysis Lutea* Extract and Fucoxanthin. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 334, doi:10.3390/md19060334.
213. Matos, J.; Cardoso, C.; Gomes, A.; Campos, A.M.; Falé, P.; Afonso, C.; Bandarra, N.M. Bioprospection of *Isochrysis Galbana* and Its Potential as a Nutraceutical. *Food Funct* **2019**, doi:10.1039/c9fo01364d.
214. Alghazwi, M.; Smid, S.; Musgrave, I.; Zhang, W. In Vitro Studies of the Neuroprotective Activities of Astaxanthin and Fucoxanthin against Amyloid Beta (A $\beta$ 1-42) Toxicity and Aggregation. *Neurochem Int* **2019**, *124*, 215–224, doi:10.1016/j.neuint.2019.01.010.
215. Molina, N.; Morandi, A.C.; Bolin, A.P.; Otton, R. Comparative Effect of Fucoxanthin and Vitamin C on Oxidative and Functional Parameters of Human Lymphocytes. *Int Immunopharmacol* **2014**, *22*, 41–50, doi:10.1016/j.intimp.2014.06.026.
216. Zheng, J.; Piao, M.; Keum, Y.S.; Kim, H.S.; Hyun, J.W. Fucoxanthin Protects Cultured Human Keratinocytes against Oxidative Stress by Blocking Free Radicals and Inhibiting Apoptosis. *Biomol Ther (Seoul)* **2013**, *21*, 270–276, doi:10.4062/biomolther.2013.030.
217. Terasaki, M.; Hamoya, T.; Kubota, A.; Kojima, H.; Tanaka, T.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M. Fucoxanthin Prevents Colorectal Cancer Development in Dextran Sodium Sulfate-Treated ApcMin/+ Mice. *Anticancer Research* **2021**, *41*, 1299–1305, doi:10.21873/anticancer.14887.
218. Terasaki, M.; Uehara, O.; Ogasa, S.; Sano, T.; Kubota, A.; Kojima, H.; Tanaka, T.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M. Alteration of Fecal Microbiota by Fucoxanthin Results in Prevention of Colorectal Cancer in AOM/DSS-Treated Mice. *Carcinogenesis* **2020**, doi:10.1093/carcin/bgaa100.
219. Sui, Y.; Gu, Y.; Lu, Y.; Yu, C.; Zheng, J.; Qi, H. Fucoxanthin Polyvinylpyrrolidone Nanoparticles Promoted Oxidative Stress-Induced Cell Death in Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 92, doi:10.3390/md19020092.
220. Yokoyama, R.; Kojima, H.; Takai, R.; Ohta, T.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M.; Terasaki, M. Effects of CLIC4 on Fucoxanthinol-Induced Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* **2020**, *0*, 1–10, doi:10.1080/01635581.2020.1779760.
221. Iyappan, P.; Bala, M.D.; Sureshkumar, M.; Veeraraghavan, V.P.; Palanisamy, A. Fucoxanthin Induced Apoptotic Cell Death in Oral Squamous Carcinoma (KB) Cells. *Bioinformation* **2021**, *17*, 181–191, doi:10.6026/97320630017181.
222. Pruteanu, L.-L.; Kopanitsa, L.; Módos, D.; Kletnieks, E.; Samarova, E.; Bender, A.; Gomez, L.D.; Bailey, D.S. Transcriptomics Predicts Compound Synergy in Drug and Natural Product Treated Glioblastoma Cells. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0239551, doi:10.1371/journal.pone.0239551.
223. Ming, J.X.; Wang, Z.C.; Huang, Y.; Ohishi, H.; Wu, R.J.; Shao, Y.; Wang, H.; Qin, M.Y.; Wu, Z.L.; Li, Y.Y.; et al. Fucoxanthin Extracted from *Laminaria Japonica* Inhibits Metastasis and Enhances the Sensitivity of Lung Cancer to Gefitinib. *Journal of Ethnopharmacology* **2020**, 113302, doi:10.1016/j.jep.2020.113302.
224. Nurcahyanti, A.D.R.; Kusmita, L.; Wink, M. Bixin and Fucoxanthin Sensitize Human Lung Cancer and Cervical Cancer Cell to Cisplatin in Vitro. *BMC Research Notes* **2021**, *14*, 454, doi:10.1186/s13104-021-05866-4.
225. Long, Y.; Cao, X.; Zhao, R.; Gong, S.; Jin, L.; Feng, C. Fucoxanthin Treatment Inhibits Nasopharyngeal Carcinoma Cell Proliferation through Induction of Autophagy Mechanism. *Environmental Toxicology* **2020**, *n/a*, doi:10.1002/tox.22944.

226. Wu, S.-H.; Liou, C.-J.; Chen, Y.-L.; Cheng, S.-C.; Huang, W.-C. Fucoxanthin Ameliorates Oxidative Stress and Airway Inflammation in Tracheal Epithelial Cells and Asthmatic Mice. *Cells* **2021**, *10*, 1311, doi:10.3390/cells10061311.
227. Shih, P.-H.; Shiue, S.-J.; Chen, C.-N.; Cheng, S.-W.; Lin, H.-Y.; Wu, L.-W.; Wu, M.-S. Fucoidan and Fucoxanthin Attenuate Hepatic Steatosis and Inflammation of NAFLD through Modulation of Leptin/Adiponectin Axis. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 148, doi:10.3390/md19030148.
228. Takatani, N.; Kono, Y.; Beppu, F.; Okamatsu-Ogura, Y.; Yamano, Y.; Miyashita, K.; Airanthi, M.K. Fucoxanthin Inhibits Hepatic Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Model Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, doi:10.1016/j.bbrc.2020.05.050.
229. Dai, Y.-L.; Jiang, Y.-F.; Lu, Y.-A.; Yu, J.-B.; Kang, M.-C.; Jeon, Y.-J. Fucoxanthin-Rich Fraction from *Sargassum Fusiformis* Alleviates Particulate Matter-Induced Inflammation in Vitro and in Vivo. *Toxicology Reports* **2021**, *8*, 349–358, doi:10.1016/j.toxrep.2021.02.005.
230. Takatani, N.; Taya, D.; Katsuki, A.; Beppu, F.; Yamano, Y.; Wada, A.; Miyashita, K.; Hosokawa, M. Identification of Paracentrone in Fucoxanthin-Fed Mice and Anti-Inflammatory Effect against Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages and Adipocytes. *Molecular Nutrition & Food Research* **2020**, *n/a*, 2000405, doi:https://doi.org/10.1002/mnfr.202000405.
231. Jin, W.; Yang, L.; Yi, Z.; Fang, H.; Chen, W.; Hong, Z.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Li, L. Anti-Inflammatory Effects of Fucoxanthinol in LPS-Induced RAW264.7 Cells through the NAAA-PEA Pathway. *Marine Drugs* **2020**, *18*, 222, doi:10.3390/md18040222.
232. Sun, G.; Xin, T.; Zhang, R.; Liu, C.; Pang, Q. Fucoxanthin Attenuates Behavior Deficits and Neuroinflammatory Response in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Parkinson's Disease in Mice. *Pharmacognosy Magazine* **2020**, *16*, 51, doi:10.4103/pm.pm\_318\_19.
233. Li, X.; Huang, R.; Liu, K.; Li, M.; Luo, H.; Cui, L.; Huang, L.; Luo, L. Fucoxanthin Attenuates LPS-Induced Acute Lung Injury via Inhibition of the TLR4/MYD88 Signaling Axis. *aging* **2020**, doi:10.18632/aging.202309.
234. Lykov, A.; Rachkovskaya, L.; Surovtseva, M.; Kim, I.; Gevorgiz, R.; Zheleznova, S.; Korolev, M.; Letyagin, A.; Poveschenko, O. In Vitro and In Vivo Effect of the Composition of Fucoxanthin with Porous Aluminum-Silicon Carrier on Cells. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2021**, *11*, 9467–9476.
235. Lee, A.-H.; Shin, H.-Y.; Park, J.-H.; Koo, S.Y.; Kim, S.M.; Yang, S. Fucoxanthin from Microalgae *Phaeodactylum Tricornutum* Inhibits pro-Inflammatory Cytokines by Regulating Both NF- $\kappa$ B and NLRP3 Inflammasome Activation. *Sci Rep* **2021**, *11*, doi:10.1038/s41598-020-80748-6.
236. Chen, S.-J.; Lin, T.-B.; Peng, H.-Y.; Lin, C.-H.; Lee, A.-S.; Liu, H.-J.; Li, C.-C.; Tseng, K.-W. Protective Effects of Fucoxanthin Dampen Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Action and Elevated Intraocular Pressure by Activating Nrf2 Signaling and Generating Reactive Oxygen Species. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1092, doi:10.3390/antiox10071092.
237. Huang, L.L.; Huang, Z.Q.; Zhang, X.Q.; Liu, J.; Zhang, Y.P.; Zhao, H.Y.; Huang, M.Q. Effect of Fucoxanthin on Insulin Resistance in Obese Mice Induced by High Fat Diet. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2021**, *46*, 171–176, doi:10.19540/j.cnki.cjcm.20200927.402.

238. du Preez, R.; Magnusson, M.; Majzoub, M.E.; Thomas, T.; Praeger, C.; Glasson, C.R.K.; Panchal, S.K.; Brown, L. Brown Seaweed *Sargassum Siliquosum* as an Intervention for Diet-Induced Obesity in Male Wistar Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 1754, doi:10.3390/nu13061754.
239. Sun, X.; Zhao, H.; Liu, Z.; Sun, X.; Zhang, D.; Wang, S.; Xu, Y.; Zhang, G.; Wang, D. Modulation of Gut Microbiota by Fucoxanthin during Alleviation of Obesity in High-Fat Diet-Fed Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, doi:10.1021/acs.jafc.0c01467.
240. Lu, Y.A.; Lee, H.G.; Li, X.; Hyun, J.-M.; Kim, H.-S.; Kim, T.H.; Kim, H.-M.; Lee, J.J.; Kang, M.-C.; Jeon, Y.-J. Anti-Obesity Effects of Red Seaweed, *Plocamium Telfairiae*, in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *Food Funct.* **2020**, doi:10.1039/C9FO02924A.
241. Oliyaei, N.; Moosavi-Nasab, M.; Tamaddon, A.M.; Tanideh, N. Antidiabetic Effect of Fucoxanthin Extracted from *Sargassum Angustifolium* on Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Food Science & Nutrition* **2021**, *9*, 3521–3529, doi:10.1002/fsn3.2301.
242. Zhiyin, L.; Jinliang, C.; Qiunan, C.; Yunfei, Y.; Qian, X. Fucoxanthin Rescues Dexamethasone Induced C2C12 Myotubes Atrophy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2021**, *139*, 111590, doi:10.1016/j.biopha.2021.111590.
243. Yang, M.; Xuan, Z.; Wang, Q.; Yan, S.; Zhou, D.; Naman, C.B.; Zhang, J.; He, S.; Yan, X.; Cui, W. Fucoxanthin Has Potential for Therapeutic Efficacy in Neurodegenerative Disorders by Acting on Multiple Targets. *Nutritional Neuroscience* **2021**, *10*, 1–14, doi:10.1080/1028415X.2021.1926140.
244. Wu, W.; Han, H.; Liu, J.; Tang, M.; Wu, X.; Cao, X.; Zhao, T.; Lu, Y.; Niu, T.; Chen, J.; et al. Fucoxanthin Prevents 6-OHDA-Induced Neurotoxicity by Targeting Keap1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2021**, *2021*, e6688708, doi:10.1155/2021/6688708.
245. Wei, J.; Mou, C.; Bao, Y.; Xie, Y.; Jin, H.; Shen, H.; Zhou, W.; Zhang, J.; He, S.; Chen, B.; et al. Fucoxanthin Alleviates Methamphetamine-Induced Neurotoxicity Possibly via the Inhibition of Interaction between Keap1 and Nrf2. *Journal of Functional Foods* **2021**, *86*, 104713, doi:10.1016/j.jff.2021.104713.
246. Hudlikar, R.R.; Sargsyan, D.; Li, W.; Wu, R.; Zheng, M.; Kong, A.-N. Epigenomic, Transcriptomic, and Protective Effect of Carotenoid Fucoxanthin in High Glucose-Induced Oxidative Stress in Mes13 Kidney Mesangial Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2021**, doi:10.1021/acs.chemrestox.0c00235.
247. El Bakary, N.M.; Thabet, N.M.; El Fatih, N.M.; Abdel-Rafei, M.K.; El Tawill, G.; Azab, K.S. Fucoxanthin Alters the Apelin-13/APJ Pathway in Certain Organs of  $\gamma$ -Irradiated Mice. *Journal of Radiation Research* **2021**, doi:10.1093/jrr/rraa141.
248. Chiang, Y.-F.; Tsai, C.-H.; Chen, H.-Y.; Wang, K.-L.; Chang, H.-Y.; Huang, Y.-J.; Hong, Y.-H.; Ali, M.; Shieh, T.-M.; Huang, T.-C.; et al. Protective Effects of Fucoxanthin on Hydrogen Peroxide-Induced Calcification of Heart Valve Interstitial Cells. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 307, doi:10.3390/md19060307.
249. Chen, S.-J.; Lin, T.-B.; Peng, H.-Y.; Liu, H.-J.; Lee, A.-S.; Lin, C.-S.; Tseng, K.-W. Cytoprotective Potential of Fucoxanthin in Oxidative Stress-Induced Age-Related Macular Degeneration and Retinal Pigment Epithelial Cell Senescence In Vivo and In Vitro. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 114, doi:10.3390/md19020114.
250. Natsume, C.; Aoki, N.; Aoyama, T.; Senda, K.; Matsui, M.; Ikegami, A.; Tanaka, K.; Azuma, Y.-T.; Fujita, T. Fucoxanthin Ameliorates Atopic Dermatitis Symptoms by Regulating Keratinocytes and Regulatory Innate Lymphoid Cells. *IJMS* **2020**, *21*, 2180, doi:10.3390/ijms21062180.

251. Guvatova, Z.; Dalina, A.; Marusich, E.; Pudova, E.; Snezhkina, A.; Krasnov, G.; Kudryavtseva, A.; Leonov, S.; Moskalev, A. Protective Effects of Carotenoid Fucoxanthin in Fibroblasts Cellular Senescence. *Mechanisms of Ageing and Development* **2020**, *189*, 111260, doi:10.1016/j.mad.2020.111260.
252. Mao, H.; Wang, L.; Xiong, Y.; Jiang, G.; Liu, X. Fucoxanthin Attenuates Oxidative Damage by Activating the Sirt1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway to Protect the Kidney from Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, *2022*, e7444430, doi:10.1155/2022/7444430.
253. Shi, Y.; Ren, J.; Zhao, B.; Zhu, T.; Qi, H. Photoprotective Mechanism of Fucoxanthin in Ultraviolet B Irradiation-Induced Retinal Müller Cells Based on Lipidomics Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, doi:10.1021/acs.jafc.1c07980.
254. Qiu, S.; Shen, Y.; Wu, Z.; Zhang, X.; Ge, S. Effects of Algae Subtype and Extraction Condition on Extracted Fucoxanthin Antioxidant Property: A 20-Year Meta-Analysis. *Algal Research* **2021**, *53*, 102161, doi:10.1016/j.algal.2020.102161.
255. Mishra, B.; Tiwari, A. Cultivation of *Anabena Variabilis*, *Synechococcus Elongatus*, *Spirulina Platensis* for the Production of C-Phycocyanin, C-Phycoerythrin and *Thalassiosira*, *Skeletonema*, *Chaetoceros* for Fucoxanthin. *Syst Microbiol and Biomanuf* **2021**, *1*, 356–361, doi:10.1007/s43393-020-00020-w.
256. Karpiński, T.M.; Adamczak, A. Fucoxanthin—An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants* **2019**, *8*, 239, doi:10.3390/antiox8080239.
257. Karpiński, T.M.; Ożarowski, M.; Alam, R.; Łochyńska, M.; Stasiewicz, M. What Do We Know about Antimicrobial Activity of Astaxanthin and Fucoxanthin? *Marine Drugs* **2021**, *20*, 36, doi:10.3390/md20010036.
258. Yang, M.; Jin, L.; Wu, Z.; Xie, Y.; Zhang, P.; Wang, Q.; Yan, S.; Chen, B.; Liang, H.; Naman, C.B.; et al. PLGA-PEG Nanoparticles Facilitate In Vivo Anti-Alzheimer's Effects of Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Derived from Edible Brown Algae. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 9764–9777, doi:10.1021/acs.jafc.1c00569.
259. Ha, Y.-J.; Choi, Y.S.; Oh, Y.R.; Kang, E.H.; Khang, G.; Park, Y.-B.; Lee, Y.J. Fucoxanthin Suppresses Osteoclastogenesis via Modulation of MAP Kinase and Nrf2 Signaling. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 132, doi:10.3390/md19030132.
260. Wang, R.; Younis, E.M.; Priya Veeraraghavan, V.; Tian, C. Antiurolithiatic Effect of Fucoxanthin on Ethylene Glycol-Induced Renal Calculus in Experimental Rats. *Journal of King Saud University - Science* **2020**, doi:10.1016/j.jksus.2020.01.027.
261. Li, Y.; Kim, M.-B.; Park, Y.-K.; Lee, J.-Y. Fucoxanthin Metabolites Exert Anti-Fibrogenic and Antioxidant Effects in Hepatic Stellate Cells. *Journal of Agriculture and Food Research* **2021**, *6*, 100245, doi:10.1016/j.jafr.2021.100245.
262. Kwon, D.Y.; Vuong, T.T.; Choi, J.; Lee, T.S.; Um, J.-J.; Koo, S.Y.; Hwang, K.T.; Kim, S.M. Fucoxanthin Biosynthesis Has a Positive Correlation with the Specific Growth Rate in the Culture of Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *J Appl Phycol* **2021**, *33*, 1473–1485, doi:10.1007/s10811-021-02376-5.
263. Gaidarenko, O.; Mills, D.W.; Vernet, M.; Hildebrand, M. *Overexpression of Thalassiosira Pseudonana Violaxanthin de-Epoxidase-like 2 (VDL2) Increases Fucoxanthin While Stoichiometrically Reducing Diadinoxanthin Cycle Pigment Abundance*, Microbiology, 2020;
264. Dautermann, O.; Lyska, D.; Andersen-Ranberg, J.; Becker, M.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Gartmann, H.; Krämer, L.C.; Mayr, K.; Pieper, D.; Rij, L.M.; et al. An Algal Enzyme Required

- for Biosynthesis of the Most Abundant Marine Carotenoids. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaaw9183, doi:10.1126/sciadv.aaw9183.
265. Beuzenberg, V.; Goodwin, E.O.; Puddick, J.; Romanazzi, D.; Adams, S.L.; Packer, M.A. Optimising Conditions for Growth and Xanthophyll Production in Continuous Culture of *Tisochrysis Lutea* Using Photobioreactor Arrays and Central Composite Design Experiments. *New Zealand Journal of Botany* **2017**, *55*, 64–78, doi:10.1080/0028825X.2016.1238398.
266. Hao, T.-B.; Lu, Y.; Zhang, Z.-H.; Liu, S.-F.; Wang, X.; Yang, W.-D.; Balamurugan, S.; Li, H.-Y. Hyperaccumulation of Fucoxanthin by Enhancing Methylerythritol Phosphate Pathway in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2021**, doi:10.1007/s00253-021-11660-w.
267. Handelman, G.J. The Evolving Role of Carotenoids in Human Biochemistry. *Nutrition* **2001**, *17*, 818–822, doi:10.1016/S0899-9007(01)00640-2.
268. Zhang, H.; Tang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Qu, J.; Wang, X.; Kong, R.; Han, C.; Liu, Z. Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient Available online: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/723515/> (accessed on 2 April 2020).
269. Asai, A.; Sugawara, T.; Ono, H.; Nagao, A. Biotransformation of Fucoxanthinol into Amarouciaxanthin a in Mice and Hepg2 Cells: Formation and Cytotoxicity of Fucoxanthin Metabolites. *Drug Metab Dispos* **2004**, *32*, 205–211, doi:10.1124/dmd.32.2.205.
270. Hashimoto, T.; Ozaki, Y.; Taminato, M.; Das, S.K.; Mizuno, M.; Yoshimura, K.; Maoka, T.; Kanazawa, K. The Distribution and Accumulation of Fucoxanthin and Its Metabolites after Oral Administration in Mice. *British Journal of Nutrition* **2009**, *102*, 242–248, doi:10.1017/S0007114508199007.
271. Petrushkina, M.; Gusev, E.; Sorokin, B.; Zotko, N.; Mamaeva, A.; Filimonova, A.; Kulikovskiy, M.; Maltsev, Y.; Yampolsky, I.; Guglya, E.; et al. Fucoxanthin Production by Heterokont Microalgae. *Algal Research* **2017**, *24*, 387–393, doi:10.1016/j.algal.2017.03.016.
272. Mohamadnia, S.; Tavakoli, O.; Faramarzi, M.A. Enhancing Production of Fucoxanthin by the Optimization of Culture Media of the Microalga *Tisochrysis Lutea*. *Aquaculture* **2020**, 736074, doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736074.
273. Gao, F.; Cabanelas, I.T.D.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Fucoxanthin and Docosahexaenoic Acid Production by Cold-Adapted *Tisochrysis Lutea*. *New Biotechnology* **2022**, *66*, 16–24, doi:10.1016/j.nbt.2021.08.005.
274. Gao, F.; Sá, M.; Cabanelas, I.T.D.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Improved Fucoxanthin and Docosahexaenoic Acid Productivities of a Sorted Self-Settling *Tisochrysis Lutea* Phenotype at Pilot Scale. *Bioresource Technology* **2021**, *325*, 124725, doi:10.1016/j.biortech.2021.124725.
275. Gao, F.; Teles, I.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Process Optimization of Fucoxanthin Production with *Tisochrysis Lutea*. *Bioresource Technology* **2020**, *315*, 123894, doi:10.1016/j.biortech.2020.123894.
276. Gao, F.; Teles, L.; Ferrer-Ledo, N.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Production and High Throughput Quantification of Fucoxanthin and Lipids in *Tisochrysis Lutea* Using Single-Cell Fluorescence. *Bioresource Technology* **2020**, *318*, 124104, doi:10.1016/j.biortech.2020.124104.
277. Gao, F.; Woolschot, S.; Cabanelas, I.T.D.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Light Spectra as Triggers for Sorting Improved Strains of *Tisochrysis Lutea*. *Bioresource Technology* **2020**, 124434, doi:10.1016/j.biortech.2020.124434.

278. Gao, F.; Sá, M.; Teles Cabanelas Ltd, I.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Production and Monitoring of Biomass and Fucoxanthin with Brown Microalgae under Outdoor Conditions. *Biotechnol Bioeng* **2020**, doi:10.1002/bit.27657.
279. Pereira, H.; Sá, M.; Maia, I.; Rodrigues, A.; Teles, I.; Wijffels, R.H.; Navalho, J.; Barbosa, M. Fucoxanthin Production from *Tisochrysis Lutea* and *Phaeodactylum Tricornutum* at Industrial Scale. *Algal Research* **2021**, *56*, 102322, doi:10.1016/j.algal.2021.102322.
280. Kanamoto, A.; Kato, Y.; Yoshida, E.; Hasunuma, T.; Kondo, A. Development of a Method for Fucoxanthin Production Using the Haptophyte Marine Microalga *Pavlova* Sp. OPMS 30543. *Mar Biotechnol* **2021**, doi:10.1007/s10126-021-10028-5.
281. Li, Y.; Sun, H.; Wang, Y.; Yang, S.; Wang, J.; Wu, T.; Lu, X.; Chu, Y.; Chen, F. Integrated Metabolic Tools Reveal Carbon Alternative in *Isochrysis Zhangjiangensis* for Fucoxanthin Improvement. *Bioresource Technology* **2021**, *347*, 126401, doi:10.1016/j.biortech.2021.126401.
282. Yang, R.; Wei, D. Improving Fucoxanthin Production in Mixotrophic Culture of Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* by LED Light Shift and Nitrogen Supplementation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, doi:10.3389/fbioe.2020.00820.
283. Derwenskus, F.; Weickert, S.; Lewandowski, I.; Schmid-Staiger, U.; Hirth, T. Economic Evaluation of Up- and Downstream Scenarios for the Co-Production of Fucoxanthin and Eicosapentaenoic Acid with *P. Tricornutum* Using Flat-Panel Airlift Photobioreactors with Artificial Light. *Algal Research* **2020**, *51*, 102078, doi:10.1016/j.algal.2020.102078.
284. Wang, Z.-P.; Wang, P.-K.; Ma, Y.; Lin, J.-X.; Wang, C.-L.; Zhao, Y.-X.; Zhang, X.-Y.; Huang, B.-C.; Zhao, S.-G.; Gao, L.; et al. *Laminaria Japonica* Hydrolysate Promotes Fucoxanthin Accumulation in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Bioresource Technology* **2022**, *344*, 126117, doi:10.1016/j.biortech.2021.126117.
285. Bárcenas-Pérez, D.; Střížek, A.; Hrouzek, P.; Kopecký, J.; Barradas, M.; Sierra-Ramirez, A.; Fernandez-Marcos, P.J.; Cheel, J. Production of Fucoxanthin from *Phaeodactylum Tricornutum* Using High Performance Countercurrent Chromatography Retaining Its FOXO3 Nuclear Translocation-Inducing Effect. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 517, doi:10.3390/md19090517.
286. Rehmanji, M.; Nesamma, A.; Khan, N.; Fatma, T.; Jutur, P. *Media Engineering in Marine Diatom Phaeodactylum Tricornutum Employing Cost-Effective Substrates for Sustainable Production of High Value Renewables*, Preprints, 2022;
287. Jiang, J.; Huang, J.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Du, Y.; Cheng, Z.; Feng, B.; Yao, T.; Zhang, A.; Zhao, Z. Potential Integration of Wastewater Treatment and Natural Pigment Production by *Phaeodactylum Tricornutum*: Microalgal Growth, Nutrient Removal, and Fucoxanthin Accumulation. *J Appl Phycol* **2022**, doi:10.1007/s10811-022-02700-7.
288. Khoo, K.S.; Ooi, C.W.; Chew, K.W.; Foo, S.C.; Show, P.L. Bioprocessing of *Chaetoceros Calcitrans* for the Recovery of Fucoxanthin Using CO<sub>2</sub>-Based Alkyl Carbamate Ionic Liquids. *Bioresource Technology* **2021**, *322*, 124520, doi:10.1016/j.biortech.2020.124520.
289. Mc Gee, D.; Archer, L.; Fleming, G.T.A.; Gillespie, E.; Touzet, N. The Effect of Nutrient and Phytohormone Supplementation on the Growth, Pigment Yields and Biochemical Composition of Newly Isolated Microalgae. *Process Biochemistry* **2020**, *92*, 61–68, doi:10.1016/j.procbio.2020.03.001.
290. Parkes, R.; Archer, L.; Mc Gee, D.; Smyth, T.J.; Gillespie, E.; Touzet, N. Differential Responses in EPA and Fucoxanthin Production by the Marine Diatom *Stauroneis* Sp. under Varying Cultivation Conditions. *Biotechnol Prog* **2021**, e3197, doi:10.1002/btpr.3197.



291. Marella, T.K.; Tiwari, A. Marine Diatom *Thalassiosira Weissflogii* Based Biorefinery for Co-Production of Eicosapentaenoic Acid and Fucoxanthin. *Bioresource Technology* **2020**, *307*, 123245, doi:10.1016/j.biortech.2020.123245.
292. Zhang, H.; Gong, P.; Cai, Q.; Zhang, C.; Gao, B. Maximizing Fucoxanthin Production in *Odontella Aurita* by Optimizing the Ratio of Red and Blue Light-Emitting Diodes in an Auto-Controlled Internally Illuminated Photobioreactor. *Bioresource Technology* **2022**, *344*, 126260, doi:10.1016/j.biortech.2021.126260.
293. Erdoğan, A.; Karataş, A.B.; Demirel, Z.; Dalay, M.C. Purification of Fucoxanthin from the Diatom *Amphora Capitellata* by Preparative Chromatography after Its Enhanced Productivity via Oxidative Stress. *J Appl Phycol* **2021**, doi:10.1007/s10811-021-02625-7.
294. Mao, X.; Chen, S.H.Y.; Lu, X.; Yu, J.; Liu, B. High Silicate Concentration Facilitates Fucoxanthin and Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production under Heterotrophic Condition in the Marine Diatom *Nitzschia Laevis*. *Algal Research* **2020**, *52*, 102086, doi:10.1016/j.algal.2020.102086.
295. Couto, C.; Hernández, C.P.; Alves Sobrinho, R.C.M.; Borges Mendes, C.F.; Roselet, F.; Abreu, P.C. Optimization of a Low-Cost Fertilizer-Based Medium for Large-Scale Cultivation of the Coastal Diatom *Conticribra Weissflogii* Using Response Surface Methodology and Its Effects on Biomass Composition. *J Appl Phycol* **2021**, *33*, 2767–2781, doi:10.1007/s10811-021-02519-8.
296. Gérin, S.; Delhez, T.; Corato, A.; Remacle, C.; Franck, F. A Novel Culture Medium for Freshwater Diatoms Promotes Efficient Photoautotrophic Batch Production of Biomass, Fucoxanthin, and Eicosapentaenoic Acid. *J Appl Phycol* **2020**, doi:10.1007/s10811-020-02097-1.
297. Tachihana, S.; Nagao, N.; Katayama, T.; Hirahara, M.; Yusoff, F.M.; Banerjee, S.; Shariff, M.; Kurosawa, N.; Toda, T.; Furuya, K. High Productivity of Eicosapentaenoic Acid and Fucoxanthin by a Marine Diatom *Chaetoceros Gracilis* in a Semi-Continuous Culture. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*, 602721, doi:10.3389/fbioe.2020.602721.
298. Boeing, P. Larval Feed Alternatives. *Global Aquaculture Advocate* **1999**, *3*, 48–50.
299. Aghzar, A.; Miñambres, M.; Alvarez, P.; Presa, P. A Cost-Benefit Assessment of Two Multi-Species Algae Diets for Juveniles of *Mytilus Galloprovincialis*. *Thalassas* **2013**, *29*, 9–16.
300. Acién Fernández, F.G.; Hall, D.O.; Cañizares Guerrero, E.; Krishna Rao, K.; Molina Grima, E. Outdoor Production of *Phaeodactylum Tricornutum* Biomass in a Helical Reactor. *Journal of Biotechnology* **2003**, *103*, 137–152, doi:10.1016/S0168-1656(03)00101-9.
301. Kim, S.M.; Kang, S.-W.; Kwon, O.-N.; Chung, D.; Pan, C.-H. Fucoxanthin as a Major Carotenoid in *Isochrysis Aff. Galbana*. Characterization of Extraction for Commercial Application. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **2012**, *55*, 477–483, doi:10.1007/s13765-012-2108-3.
302. Sun, Z.; Wang, X.; Liu, J. Screening of *Isochrysis* Strains for Simultaneous Production of Docosahexaenoic Acid and Fucoxanthin. *Algal Research* **2019**, *41*, 101545, doi:10.1016/j.algal.2019.101545.
303. Alkhamis, Y.; Qin, J.G. Comparison of Pigment and Proximate Compositions of *Tisochrysis Lutea* in Phototrophic and Mixotrophic Cultures. *J Appl Phycol* **2016**, *28*, 35–42, doi:10.1007/s10811-015-0599-0.
304. Chen, G.-Q.; Chen, F. Growing Phototrophic Cells without Light. *Biotechnol Lett* **2006**, *28*, 607–616, doi:10.1007/s10529-006-0025-4.

305. Saoudi-Helis, L.; Dubacq, J.-P.; Marty, Y.; Samain, J.F.; Gudin, C. Influence of Growth Rate on Pigment and Lipid Composition of the Microalga *Isochrysis Aff. Galbana* Clone T.Iso. *J Appl Phycol* **1994**, *6*, 315–322, doi:10.1007/BF02181945.
306. Fret, J.; Roef, L.; Diels, L.; Tavernier, S.; Vyverman, W.; Michiels, M. Combining Medium Recirculation with Alternating the Microalga Production Strain: A Laboratory and Pilot Scale Cultivation Test. *Algal Research* **2020**, *46*, 101763, doi:10.1016/j.algal.2019.101763.
307. Ardiles, P.; Cerezal-Mezquita, P.; Salinas-Fuentes, F.; Órdenes, D.; Renato, G.; Ruiz-Domínguez, M.C. Biochemical Composition and Phycoerythrin Extraction from Red Microalgae: A Comparative Study Using Green Extraction Technologies. *Processes* **2020**, *8*, 1628, doi:10.3390/pr8121628.
308. Ishika, T.; Moheimani, N.R.; Bahri, P.A.; Laird, D.W.; Blair, S.; Parlevliet, D. Halo-Adapted Microalgae for Fucoxanthin Production: Effect of Incremental Increase in Salinity. *Algal Research* **2017**, *28*, 66–73, doi:10.1016/j.algal.2017.10.002.
309. Torzillo, G.; Faraloni, C.; Silva, A.M.; Kopecký, J.; Pilný, J.; Masojídek, J. Photoacclimation of *Phaeodactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae) Cultures Grown Outdoors in Photobioreactors and Open Ponds. *European Journal of Phycology* **2012**, *47*, 169–181, doi:10.1080/09670262.2012.683202.
310. Xia, S.; Wang, K.; Wan, L.; Li, A.; Hu, Q.; Zhang, C. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella Aurita*. *Marine Drugs* **2013**, *11*, 2667–2681, doi:10.3390/md11072667.
311. Kavadikeri, S.; Manokaran, S.; Reddy, A.H.M. Extraction and Characterization of Microalgal Oil and Fucoxanthin from Diatom. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *12*, 5.
312. Aslanbay Guler, B.; Deniz, I.; Demirel, Z.; Oncel, S.S.; Imamoglu, E. Transition from Start-up to Scale-up for Fucoxanthin Production in Flat Plate Photobioreactor. *J Appl Phycol* **2019**, *31*, 1525–1533, doi:10.1007/s10811-018-1696-7.
313. Gao, B.; Chen, A.; Zhang, W.; Li, A.; Zhang, C. Co-Production of Lipids, Eicosapentaenoic Acid, Fucoxanthin, and Chrysolaminarin by *Phaeodactylum Tricornutum* Cultured in a Flat-Plate Photobioreactor under Varying Nitrogen Conditions. *J. Ocean Univ. China* **2017**, *16*, 916–924, doi:10.1007/s11802-017-3174-2.
314. Aslanbay Guler, B.; Deniz, I.; Demirel, Z.; Oncel, S.S.; Imamoglu, E. Comparison of Different Photobioreactor Configurations and Empirical Computational Fluid Dynamics Simulation for Fucoxanthin Production. *Algal Research* **2019**, *37*, 195–204, doi:10.1016/j.algal.2018.11.019.
315. Wang, H.; Zhang, Y.; Chen, L.; Cheng, W.; Liu, T. Combined Production of Fucoxanthin and EPA from Two Diatom Strains *Phaeodactylum Tricornutum* and *Cylindrotheca Fusiformis* Cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* **2018**, *41*, 1061–1071, doi:10.1007/s00449-018-1935-y.
316. Lu, X.; Sun, H.; Zhao, W.; Cheng, K.-W.; Chen, F.; Liu, B. A Hetero-Photoautotrophic Two-Stage Cultivation Process for Production of Fucoxanthin by the Marine Diatom *Nitzschia Laevis*. *Marine Drugs* **2018**, *16*, 219, doi:10.3390/md16070219.
317. Wu, S.; Xie, X.; Huan, L.; Zheng, Z.; Zhao, P.; Kuang, J.; Liu, X.; Wang, G. Selection of Optimal Flocculant for Effective Harvesting of the Fucoxanthin-Rich Marine Microalga *Isochrysis Galbana*. *J Appl Phycol* **2016**, *28*, 1579–1588, doi:10.1007/s10811-015-0716-0.
318. Anning, T.; MacIntyre, H.L.; Pratt, S.M.; Sannes, P.J.; Gibb, S.; Geider, R.J. Photoacclimation in the Marine Diatom *Skeletonema Costatum*. *Limnology and Oceanography* **2000**, *45*, 1807–1817, doi:10.4319/lo.2000.45.8.1807.

319. Harris, G.N.; Scanlan, D.J.; Geider, R.J. Responses of *Emiliania Huxleyi* (Prymnesiophyceae) to Step Changes in Photon Flux Density. *European Journal of Phycology* **2009**, *44*, 31–48, doi:10.1080/09670260802233460.
320. Zhao, D.; Kim, S.-M.; Pan, C.-H.; Chung, D. Effects of Heating, Aerial Exposure and Illumination on Stability of Fucoxanthin in Canola Oil. *Food Chemistry* **2014**, *145*, 505–513, doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.045.
321. Wang, S.; Verma, S.K.; Hakeem Said, I.; Thomsen, L.; Ullrich, M.S.; Kuhnert, N. Changes in the Fucoxanthin Production and Protein Profiles in *Cylindrotheca Closterium* in Response to Blue Light-Emitting Diode Light. *Microb Cell Fact* **2018**, *17*, 110, doi:10.1186/s12934-018-0957-0.
322. Geider, R.; La Roche, J. Redfield Revisited: Variability of C:N:P in Marine Microalgae and Its Biochemical Basis. *European Journal of Phycology* **2002**, *37*, 1–17, doi:10.1017/S0967026201003456.
323. Gómez-Loredo, A.; Benavides, J.; Rito-Palomares, M. Growth Kinetics and Fucoxanthin Production of *Phaeodactylum Tricornutum* and *Isochrysis Galbana* Cultures at Different Light and Agitation Conditions. *J Appl Phycol* **2016**, *28*, 849–860, doi:10.1007/s10811-015-0635-0.
324. Gupta, P.L.; Lee, S.-M.; Choi, H.-J. Integration of Microalgal Cultivation System for Wastewater Remediation and Sustainable Biomass Production. *World J Microbiol Biotechnol* **2016**, *32*, 139, doi:10.1007/s11274-016-2090-8.
325. Fuggi, A.; Di Martino Rigano, V.; Vona, V.; Rigano, C. Nitrate and Ammonium Assimilation in Algal Cell-Suspensions and Related PH Variations in the External Medium, Monitored by Electrodes. *Plant Science Letters* **1981**, *23*, 129–138, doi:10.1016/0304-4211(81)90002-X.
326. Mairet, F.; Bernard, O.; Lacour, T.; Sciandra, A. Modelling Microalgae Growth in Nitrogen Limited Photobioreactor for Estimating Biomass, Carbohydrate and Neutral Lipid Productivities. *IFAC Proceedings Volumes* **2011**, *44*, 10591–10596, doi:10.3182/20110828-6-IT-1002.03165.
327. Bougaran, G.; Bernard, O.; Sciandra, A. Modeling Continuous Cultures of Microalgae Colimited by Nitrogen and Phosphorus. *Journal of Theoretical Biology* **2010**, *265*, 443–454, doi:10.1016/j.jtbi.2010.04.018.
328. Geider, R.; Macintyre, L.; Graziano, L.; McKay, R.M. Responses of the Photosynthetic Apparatus of *Dunaliella Tertiolecta* (Chlorophyceae) to Nitrogen and Phosphorus Limitation. *European Journal of Phycology* **1998**, *33*, 315–332, doi:10.1080/09670269810001736813.
329. Wever, A.D.; Muylaert, K.; Langlet, D.; Alleman, L.; Descy, J.-P.; André, L.; Cocquyt, C.; Vyverman, W. Differential Response of Phytoplankton to Additions of Nitrogen, Phosphorus and Iron in Lake Tanganyika. *Freshwater Biology* **2008**, *53*, 264–277, doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01890.x.
330. Novoveská, L.; Ross, M.E.; Stanley, M.S.; Pradelles, R.; Wasiolek, V.; Sassi, J.-F. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Mar Drugs* **2019**, *17*, 640, doi:10.3390/md17110640.
331. Yi, Z.; Su, Y.; Cherek, P.; Nelson, D.R.; Lin, J.; Rolfsson, O.; Wu, H.; Salehi-Ashtiani, K.; Brynjolfsson, S.; Fu, W. Combined Artificial High-Silicate Medium and LED Illumination Promote Carotenoid Accumulation in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Microb Cell Fact* **2019**, *18*, 209, doi:10.1186/s12934-019-1263-1.

332. Moreno-Garcia, L.; Adjallé, K.; Barnabé, S.; Raghavan, G.S.V. Microalgae Biomass Production for a Biorefinery System: Recent Advances and the Way towards Sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, *76*, 493–506, doi:10.1016/j.rser.2017.03.024.
333. Lu, X.; Liu, B.; He, Y.; Guo, B.; Sun, H.; Chen, F. Novel Insights into Mixotrophic Cultivation of *Nitzschia Laevis* for Co-Production of Fucoxanthin and Eicosapentaenoic Acid. *Bioresource Technology* **2019**, *294*, 122145, doi:10.1016/j.biortech.2019.122145.
334. Cerón García, M.C.; Sánchez Mirón, A.; Fernández Sevilla, J.M.; Molina Grima, E.; García Camacho, F. Mixotrophic Growth of the Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*: Influence of Different Nitrogen and Organic Carbon Sources on Productivity and Biomass Composition. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 297–305, doi:10.1016/j.procbio.2004.01.016.
335. Cerón-García, M.C.; Fernández-Sevilla, J.M.; Sánchez-Mirón, A.; García-Camacho, F.; Contreras-Gómez, A.; Molina-Grima, E. Mixotrophic Growth of *Phaeodactylum Tricornutum* on Fructose and Glycerol in Fed-Batch and Semi-Continuous Modes. *Bioresource Technology* **2013**, *147*, 569–576, doi:10.1016/j.biortech.2013.08.092.
336. Kim, S.M.; Jung, Y.-J.; Kwon, O.-N.; Cha, K.H.; Um, B.-H.; Chung, D.; Pan, C.-H. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Appl Biochem Biotechnol* **2012**, *166*, 1843–1855, doi:10.1007/s12010-012-9602-2.
337. Miyashita, K.; Beppu, F.; Hosokawa, M.; Liu, X.; Wang, S. Bioactive Significance of Fucoxanthin and Its Effective Extraction. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2020**, *101639*, doi:10.1016/j.bcab.2020.101639.
338. Zhang, W.; Wang, F.; Gao, B.; Huang, L.; Zhang, C. An Integrated Biorefinery Process: Stepwise Extraction of Fucoxanthin, Eicosapentaenoic Acid and Chrysolaminarin from the Same *Phaeodactylum Tricornutum* Biomass. *Algal Research* **2018**, *32*, 193–200, doi:10.1016/j.algal.2018.04.002.
339. Kapoore, R.V.; Butler, T.O.; Pandhal, J.; Vaidyanathan, S. Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. *Biology (Basel)* **2018**, *7*, 18, doi:10.3390/biology7010018.
340. Siahann, E.; Chun, B.; Kim, S.-K. Innovative Alternative Technology for Fucoxanthin Recovery. *Encyclopedia of Marine Biotechnology* **2020**, 3213–3227, doi:10.1002/9781119143802.ch143.
341. Aslanbay Guler, B.; Deniz, I.; Demirel, Z.; Yesil-Celiktas, O.; Imamoglu, E. A Novel Subcritical Fucoxanthin Extraction with a Biorefinery Approach. *Biochemical Engineering Journal* **2019**, 107403, doi:10.1016/j.bej.2019.107403.
342. Sun, J.; Zhou, C.; Cheng, P.; Zhu, J.; Hou, Y.; Li, Y.; Zhang, J.; Yan, X. A Simple and Efficient Strategy for Fucoxanthin Extraction from the Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Algal Research* **2022**, *61*, 102610, doi:10.1016/j.algal.2021.102610.
343. Pasquet, V.; Chérouvrier, J.-R.; Farhat, F.; Thiéry, V.; Piot, J.-M.; Bérard, J.-B.; Kaas, R.; Serive, B.; Patrice, T.; Cadoret, J.-P.; et al. Study on the Microalgal Pigments Extraction Process: Performance of Microwave Assisted Extraction. *Process Biochemistry* **2011**, *46*, 59–67, doi:10.1016/j.procbio.2010.07.009.
344. Xiao, X.; Si, X.; Yuan, Z.; Xu, X.; Li, G. Isolation of Fucoxanthin from Edible Brown Algae by Microwave-Assisted Extraction Coupled with High-Speed Countercurrent Chromatography: Other Techniques. *J. Sep. Science* **2012**, *35*, 2313–2317, doi:10.1002/jssc.201200231.

345. Plaza, M.; Santoyo, S.; Jaime, L.; García-Blairsy Reina, G.; Herrero, M.; Señoráns, F.J.; Ibáñez, E. Screening for Bioactive Compounds from Algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 450–455, doi:10.1016/j.jpba.2009.03.016.
346. Shang, Y.F.; Kim, S.M.; Lee, W.J.; Um, B.-H. Pressurized Liquid Method for Fucoxanthin Extraction from *Eisenia Bicyclis* (Kjellman) Setchell. *J Biosci Bioeng* **2011**, *111*, 237–241, doi:10.1016/j.jbiosc.2010.10.008.
347. Billakanti, J.M.; Catchpole, O.J.; Fenton, T.A.; Mitchell, K.A.; MacKenzie, A.D. Enzyme-Assisted Extraction of Fucoxanthin and Lipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids from *Undaria Pinnatifida* Using Dimethyl Ether and Ethanol. *Process Biochemistry* **2013**, *48*, 1999–2008, doi:10.1016/j.procbio.2013.09.015.
348. Taucher, J.; Baer, S. Cell Disruption and Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids from Microalgae. *J Thermodyn Catal* **2016**, *07*, doi:10.4172/2157-7544.1000158.
349. Olaizola, M. Commercial Production of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis* Using 25,000-Liter Outdoor Photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* **2000**, *12*, 499–506, doi:10.1023/A:1008159127672.
350. Ruiz-Domínguez, M.C.; Salinas, F.; Medina, E.; Rincón, B.; Martín, M.A.; Gutiérrez, M.C.; Cerezal-Mezquita, P. Supercritical Fluid Extraction of Fucoxanthin from the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* and Biogas Production through Anaerobic Digestion. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 127, doi:10.3390/md20020127.
351. Toepfl, S.; Knorr, D. Pulsed Electric Fields as a Pretreatment Technique in Drying Processes. *Stewart Postharvest Review* **2006**, *2*, 1–6, doi:10.2212/spr.2006.4.3.
352. Parniakov, O.; Barba, F.J.; Grimi, N.; Marchal, L.; Jubeau, S.; Lebovka, N.; Vorobiev, E. Pulsed Electric Field and PH Assisted Selective Extraction of Intracellular Components from Microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Research* **2015**, *8*, 128–134, doi:10.1016/j.algal.2015.01.014.
353. Jaeschke, D.P.; Menegol, T.; Rech, R.; Mercali, G.D.; Marczak, L.D.F. Carotenoid and Lipid Extraction from *Heterochlorella Luteoviridis* Using Moderate Electric Field and Ethanol. *Process Biochemistry* **2016**, *51*, 1636–1643, doi:10.1016/j.procbio.2016.07.016.
354. Grimi, N.; Dubois, A.; Marchal, L.; Jubeau, S.; Lebovka, N.I.; Vorobiev, E. Selective Extraction from Microalgae *Nannochloropsis* Sp. Using Different Methods of Cell Disruption. *Bioresource Technology* **2014**, *153*, 254–259, doi:10.1016/j.biortech.2013.12.011.
355. Khoo, K.S.; Ooi, C.W.; Chew, K.W.; Chia, S.R.; Foo, S.C.; Ng, H.S.; Show, P.L. Extraction of Fucoxanthin from *Chaetoceros Calcitrans* by Electropermeabilization-Assisted Liquid Biphasic Flotation System. *Journal of Chromatography A* **2022**, 462915, doi:10.1016/j.chroma.2022.462915.
356. Pierobon, S.C.; Cheng, X.; Graham, P.J.; Nguyen, B.; Karakolis, E.G.; Sinton, D. Emerging Microalgae Technology: A Review. *Sustainable Energy Fuels* **2017**, *2*, 13–38, doi:10.1039/C7SE00236J.
357. Teramukai, K.; Kakui, S.; Beppu, F.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Effective Extraction of Carotenoids from Brown Seaweeds and Vegetable Leaves with Edible Oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2020**, *60*, 102302, doi:10.1016/j.ifset.2020.102302.
358. Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Miyashita, K. Dietary Combination of Fucoxanthin and Fish Oil Attenuates the Weight Gain of White Adipose Tissue and Decreases Blood Glucose in Obese/Diabetic KK-Ay Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7701–7706, doi:10.1021/jf071569n.

359. Choi, S.-A.; Oh, Y.-K.; Lee, J.; Sim, S.J.; Hong, M.E.; Park, J.-Y.; Kim, M.-S.; Kim, S.W.; Lee, J.-S. High-Efficiency Cell Disruption and Astaxanthin Recovery from *Haematococcus Pluvialis* Cyst Cells Using Room-Temperature Imidazolium-Based Ionic Liquid/Water Mixtures. *Bioresource Technology* **2019**, *274*, 120–126, doi:10.1016/j.biortech.2018.11.082.
360. Bi, W.; Tian, M.; Zhou, J.; Row, K.H. Task-Specific Ionic Liquid-Assisted Extraction and Separation of Astaxanthin from Shrimp Waste. *Journal of Chromatography B* **2010**, *878*, 2243–2248, doi:10.1016/j.jchromb.2010.06.034.
361. Costa Gomes, M. *Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances*, New York, NY, USA, 2021;
362. Fu, X.; Wang, D.; Belwal, T.; Xu, Y.; Li, L.; Luo, Z. Sonication-Synergistic Natural Deep Eutectic Solvent as a Green and Efficient Approach for Extraction of Phenolic Compounds from Peels of *Carya Cathayensis* Sarg. *Food Chemistry* **2021**, *355*, 129577, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129577.
363. Rodrigues, L.A.; Pereira, C.V.; Leonardo, I.C.; Fernández, N.; Gaspar, F.B.; Silva, J.M.; Reis, R.L.; Duarte, A.R.C.; Paiva, A.; Matias, A.A. Terpene-Based Natural Deep Eutectic Systems as Efficient Solvents To Recover Astaxanthin from Brown Crab Shell Residues. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 2246–2259, doi:10.1021/acssuschemeng.9b06283.
364. Obluchinskaya, E.D.; Pozharitskaya, O.N.; Zakharova, L.V.; Daurtseva, A.V.; Flisyuk, E.V.; Shikov, A.N. Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from *Fucus Vesiculosus*. *Molecules* **2021**, *26*, 4198, doi:10.3390/molecules26144198.
365. Gallego, R.; Tardif, C.; Parreira, C.; Guerra, T.; Alves, M.J.; Ibáñez, E.; Herrero, M. Simultaneous Extraction and Purification of Fucoxanthin from *Tisochrysis Lutea* Microalgae Using Compressed Fluids. *Journal of Separation Science* **2020**, *n/a*, doi:10.1002/jssc.202000021.
366. Chen, C.-R.; Lin, D.-M.; Chang, C.M.J.; Chou, H.-N.; Wu, J.-J. Supercritical Carbon Dioxide Anti-Solvent Crystallization of Fucoxanthin Chromatographically Purified from *Hinckia Mitchellae* P.C. Silva. *The Journal of Supercritical Fluids* **2017**, *119*, 1–8, doi:10.1016/j.supflu.2016.08.013.
367. Gómez-Loredo, A.; González-Valdez, J.; Rito-Palomares, M. Insights on the Downstream Purification of Fucoxanthin, a Microalgal Carotenoid, from an Aqueous Two-Phase System Stream Exploiting Ultrafiltration. *J Appl Phycol* **2015**, *27*, 1517–1523, doi:10.1007/s10811-014-0443-y.
368. Iqbal, M.; Tao, Y.; Xie, S.; Zhu, Y.; Chen, D.; Wang, X.; Huang, L.; Peng, D.; Sattar, A.; Shabbir, M.A.B.; et al. Aqueous Two-Phase System (ATPS): An Overview and Advances in Its Applications. *Biological Procedures Online* **2016**, *18*, 18, doi:10.1186/s12575-016-0048-8.
369. Espitia-Saloma, E.; Vázquez-Villegas, P.; Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. Continuous Aqueous Two-Phase Systems Devices for the Recovery of Biological Products. *Food and Bioproducts Processing* **2014**, *92*, 101–112, doi:10.1016/j.fbp.2013.05.006.
370. Hatti-Kaul, R. *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*, Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2000; ISBN 978-1-59259-028-5.
371. Albertsson, P.Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules in Polymer Two-Phase Systems. In *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., Eds.; Academic Press, 1970; Vol. 24, pp. 309–341.
372. Chen, J.-P.; Lee, M.-S. Enhanced Production of *Serratia Marcescens* Chitinase in PEG/Dextran Aqueous Two-Phase Systems. *Enzyme and Microbial Technology* **1995**, *17*, 1021–1027, doi:10.1016/0141-0229(95)00030-5.

373. Helfrich, M.R.; El-Kouedi, M.; Etherton, M.R.; Keating, C.D. Partitioning and Assembly of Metal Particles and Their Bioconjugates in Aqueous Two-Phase Systems. *Langmuir* **2005**, *21*, 8478–8486, doi:10.1021/la051220z.
374. Benavides, J.; Rito-Palomares, M. Simplified Two-Stage Method to B-Phycoerythrin Recovery from *Porphyridium Cruentum*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2006**, *844*, 39–44, doi:10.1016/j.jchromb.2006.06.029.
375. Schmidt, A.S.; Ventom, A.M.; Asenjo, J.A. Partitioning and Purification of  $\alpha$ -Amylase in Aqueous Two-Phase Systems. *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, *16*, 131–142, doi:10.1016/0141-0229(94)90076-0.
376. Gómez-Loredo, A.; González-Valdez, J.; González-González, M.; Benavides, J.; Rito-Palomares, M. Practical Experiences from the Bench-Scale Implementation of a Bioprocess for Fucoxanthin Production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2018**, *93*, 2033–2039, doi:10.1002/jctb.5494.
377. Gómez-Loredo, A.; Benavides, J.; Rito-Palomares, M. Partition Behavior of Fucoxanthin in Ethanol-Potassium Phosphate Two-Phase Systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2014**, *89*, 1637–1645, doi:https://doi.org/10.1002/jctb.4514.
378. Kim, S.M.; Shang, Y.F.; Um, B.-H. A Preparative Method for Isolation of Fucoxanthin from *Eisenia Bicyclis* by Centrifugal Partition Chromatography. *Phytochemical Analysis* **2011**, *22*, 322–329, doi:10.1002/pca.1283.
379. Beppu, F.; Niwano, Y.; Tsukui, T.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Single and Repeated Oral Dose Toxicity Study of Fucoxanthin (FX), a Marine Carotenoid, in Mice. *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 501–510, doi:10.2131/jts.34.501.
380. Iio, K.; Okada, Y.; Ishikura, M. Single and 13-week oral toxicity study of fucoxanthin oil from microalgae in rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **2011**, *52*, 183–189, doi:10.3358/shokueishi.52.183.
381. Faisal Hossain, M.; Mamoon, R.; Thomas, B.; Mohammed, A.; Winnie, W.; Adeshina, K.K.; Rajjit, S.; Michael, J.M.; Shamly, A. Evaluation of Fucoxanthin Content in Popular Weight Loss Supplements: The Case for Stricter Regulation of Dietary Supplements. *Journal of Obesity and Weight-Loss Medication* **2019**, *5*, 1–6, doi:10.23937/2572-4010.1510031.
382. Yusof, Z.; Khong, N.M.H.; Choo, W.S.; Foo, S.C. Opportunities for the Marine Carotenoid Value Chain from the Perspective of Fucoxanthin Degradation. *Food Chemistry* **2022**, *383*, 132394, doi:10.1016/j.foodchem.2022.132394.
383. Wang, C.; Chen, X.; Nakamura, Y.; Yu, C.; Qi, H. Fucoxanthin Activities Motivate Its Nano/Micro-Encapsulation for Food or Nutraceutical Application: A Review. *Food Funct.* **2020**, doi:10.1039/D0FO02176H.
384. Cordenonsi, L.M.; Santer, A.; Sponchiado, R.M.; Wingert, N.R.; Raffin, R.P.; Schapoval, E.E.S. Amazonia Products in Novel Lipid Nanoparticles for Fucoxanthin Encapsulation. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21*, 32, doi:10.1208/s12249-019-1601-y.
385. Foo, S.C.; Khong, N.M.H.; Yusoff, F.Md. Physicochemical, Microstructure and Antioxidant Properties of Microalgae-Derived Fucoxanthin Rich Microcapsules. *Algal Research* **2020**, *51*, 102061, doi:10.1016/j.algal.2020.102061.
386. Koo, S.Y.; Mok, I.-K.; Pan, C.-H.; Kim, S.M. Preparation of Fucoxanthin-Loaded Nanoparticles Composed of Casein and Chitosan with Improved Fucoxanthin Bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 9428–9435, doi:10.1021/acs.jafc.6b04376.
387. Li, D.; Liu, Y.; Ma, Y.; Liu, Y.; Wang, S.; Guo, Z.; Li, J.; Wang, Y.; Tan, B.; Wei, Y. Fabricating Hydrophilic Fatty Acid-Protein Particles to Encapsulate Fucoxanthin: Fatty Acid Screening,

- Structural Characterization, and Thermal Stability Analysis. *Food Chemistry* **2022**, *382*, 132311, doi:10.1016/j.foodchem.2022.132311.
388. Ma, Z.; Zhao, Y.; Khalid, N.; Shu, G.; Neves, M.A.; Kobayashi, I.; Nakajima, M. Comparative Study of Oil-in-Water Emulsions Encapsulating Fucoxanthin Formulated by Microchannel Emulsification and High-Pressure Homogenization. *Food Hydrocolloids* **2020**, 105977, doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105977.
389. Oliyaei, N.; Moosavi-Nasab, M.; Tamaddon, A.M.; Fazaeli, M. Double Encapsulation of Fucoxanthin Using Porous Starch through Sequential Coating Modification with Maltodextrin and Gum Arabic. *Food Science & Nutrition* **2019**, *n/a*, doi:10.1002/fsn3.1411.
390. Rehman, A.; Tong, Q.; Jafari, S.M.; Assadpour, E.; Shehzad, Q.; Aadil, R.M.; Iqbal, M.W.; Rashed, M.M.A.; Mushtaq, B.S.; Ashraf, W. Carotenoid-Loaded Nanocarriers: A Comprehensive Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2019**, 102048, doi:10.1016/j.cis.2019.102048.
391. Roychoudhury, P.; Dąbek, P.; Gloc, M.; Golubeva, A.; Dobrucka, R.; Kurzydłowski, K.J.; Witkowski, A. Reducing Efficiency of Fucoxanthin in Diatom Mediated Biofabrication of Gold Nanoparticles. *Materials* **2021**, *14*, 4094, doi:10.3390/ma14154094.
392. Wang, C.; Ren, J.; Song, H.; Chen, X.; Qi, H. Characterization of Whey Protein-Based Nanocomplex to Load Fucoxanthin and the Mechanism of Action on Glial Cells PC12. *LWT* **2021**, 112208, doi:10.1016/j.lwt.2021.112208.
393. Bayu, A.; Rachman, A.; Noerdjito, D.R.; Putra, M.Y.; Widayatno, W.B. High-Value Chemicals from Marine Diatoms: A Biorefinery Approach. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2020**, *460*, 012012, doi:10.1088/1755-1315/460/1/012012.
394. Centre d'Etude et de Valorisation des Algues *Macroalgues et Microalgues Alimentaires - Statut Règlementaire En France et En Europe, Synthèse CEVA*; CEVA: Pleubian, France, 2019;
395. Miyashita, K.; Beppu, F.; Hosokawa, M.; Liu, X.; Wang, S. Nutraceutical Characteristics of the Brown Seaweed Carotenoid Fucoxanthin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2020**, *686*, 108364, doi:10.1016/j.abb.2020.108364.
396. Lourenço-Lopes, C.; Fraga-Corral, M.; Jimenez-Lopez, C.; Pereira, A.G.; Garcia-Oliveira, P.; Carpena, M.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Metabolites from Macroalgae and Its Applications in the Cosmetic Industry: A Circular Economy Approach. *Resources* **2020**, *9*, 101, doi:10.3390/resources9090101.
397. Lee, Y.-K.; Nam, G.-W. Sunscreen Boosting Effect by Solid Lipid Nanoparticles-Loaded Fucoxanthin Formulation. *Cosmetics* **2020**, *7*, 14, doi:10.3390/cosmetics7010014.
398. Lee, K.-T.; Lee, Y.; Jeong, J.-H.; Jo, B.-K. New Anti-Wrinkle Cosmetics. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* **2002**, *28*, 71–79.
399. Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Funayama, K.; Miyashita, K. Fucoxanthin from Edible Seaweed, *Undaria Pinnatifida*, Shows Antiobesity Effect through UCP1 Expression in White Adipose Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *332*, 392–397, doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.002.
400. Maeda, H.; Tsukui, T.; Sashima, T.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as a Multi-Functional Nutrient. **2008**, *17*, 196–199.
401. Himms-Hagen, J. Brown Adipose Tissue Thermogenesis: Interdisciplinary Studies. *The FASEB Journal* **1990**, *4*, 2890–2898, doi:10.1096/fasebj.4.11.2199286.
402. Martinez-Teipel, B.; Bouhrir, S. Reshaping Body Care with Biotech Microalgae. *Personal Care* **2021**, *22*, 59–63.
403. Market Reports World *Global Fucoxanthin Market*, 2017;



404. Shendure, J.; Porreca, G.J.; Reppas, N.B.; Lin, X.; McCutcheon, J.P.; Rosenbaum, A.M.; Wang, M.D.; Zhang, K.; Mitra, R.D.; Church, G.M. Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. *Science* **2005**, doi:10.1126/science.1117389.
405. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data 2010.
406. Krueger, F. Babraham Bioinformatics - Trim Galore! Available online: [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) (accessed on 6 October 2022).
407. Kim, D.; Paggi, J.M.; Park, C.; Bennett, C.; Salzberg, S.L. Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-Genotype. *Nat Biotechnol* **2019**, *37*, 907–915, doi:10.1038/s41587-019-0201-4.
408. Carrier, G.; Garnier, M.; Le Cunff, L.; Bougaran, G.; Probert, I.; De Vargas, C.; Corre, E.; Cadoret, J.-P.; Saint-Jean, B. Comparative Transcriptome of Wild Type and Selected Strains of the Microalgae *Tisochrysis Lutea* Provides Insights into the Genetic Basis, Lipid Metabolism and the Life Cycle. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e86889, doi:10.1371/journal.pone.0086889.
409. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. FeatureCounts: An Efficient General Purpose Program for Assigning Sequence Reads to Genomic Features. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 923–930, doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
410. Love, M.; Anders, S.; Huber, W. Differential Analysis of Count Data – the DESeq2 2013.
411. Falkowski, P.G.; Sukenik, A.; Herzig, R. Nitrogen Limitation in *Isochrysis Galbana* (Haptophyceae). II. Relative Abundance of Chloroplast Proteins<sup>1</sup>. *Journal of Phycology* **1989**, *25*, 471–478, doi:10.1111/j.1529-8817.1989.tb00252.x.
412. Oeltjen, A.; Krumbein, W.E.; Rhiel, E. Investigations on Transcript Sizes, Steady State mRNA Concentrations and Diurnal Expression of Genes Encoding Fucoxanthin Chlorophyll a/c Light Harvesting Polypeptides in the Centric Diatom *Cyclotella Cryptica*. *Plant Biology* **2002**, *4*, 250–257, doi:10.1055/s-2002-25737.
413. Gundermann, K.; Büchel, C. The Fluorescence Yield of the Trimeric Fucoxanthin–Chlorophyll–Protein FCPa in the Diatom *Cyclotella Meneghiniana* Is Dependent on the Amount of Bound Diatoxanthin. *Photosynth Res* **2008**, *95*, 229–235, doi:10.1007/s11120-007-9262-1.
414. Nymark, M.; Valle, K.C.; Brembu, T.; Hancke, K.; Winge, P.; Andresen, K.; Johnsen, G.; Bones, A.M. An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *PLOS ONE* **2009**, *4*, e7743, doi:10.1371/journal.pone.0007743.
415. Pajot, A.; Lavaud, J.; Carrier, G.; Garnier, M.; Saint-Jean, B.; Rabilloud, N.; Baroukh, C.; Bérard, J.-B.; Bernard, O.; Marchal, L.; et al. The Fucoxanthin Chlorophyll a/c-Binding Protein in *Tisochrysis Lutea*. Influence of Nitrogen and Light on Fucoxanthin and Chlorophyll a/c-Binding Protein Gene Expression and Fucoxanthin Synthesis. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, doi:10.3389/fpls.2022.830069.
416. Field, C.B.; Behrenfeld, M.J.; Randerson, J.T.; Falkowski, P. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **1998**, *281*, 237–240, doi:10.1126/science.281.5374.237.
417. Cavalier-Smith, T. Chromalveolate Diversity and Cell Megaevolution: Interplay of Membranes, Genomes and Cytoskeleton. In *Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny: An Evolutionary Synthesis in the Age of Genomics*; CRC Press, 2004; pp. 71–103 ISBN 978-0-203-50893-0.

418. Custódio, L.; Soares, F.; Pereira, H.; Barreira, L.; Vizetto-Duarte, C.; Rodrigues, M.J.; Rauter, A.P.; Alberício, F.; Varela, J. Fatty Acid Composition and Biological Activities of *Isochrysis Galbana* T-ISO, *Tetraselmis* Sp. and *Scenedesmus* Sp.: Possible Application in the Pharmaceutical and Functional Food Industries. *J Appl Phycol* **2014**, *26*, 151–161, doi:10.1007/s10811-013-0098-0.
419. Arora, N.; Philippidis, G.P. Fucoxanthin Production from Diatoms: Current Advances and Challenges. In *Algae: Multifarious Applications for a Sustainable World*; Mandotra, S.K., Upadhyay, A.K., Ahluwalia, A.S., Eds.; Springer: Singapore, 2021; pp. 227–242 ISBN 9789811575181.
420. Büchel, C. Light Harvesting Complexes in Chlorophyll C-Containing Algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2020**, *1861*, 148027, doi:10.1016/j.bbabi.2019.05.003.
421. Marchetti, J.; Bougaran, G.; Jauffrais, T.; Lefebvre, S.; Rouxel, C.; Saint-Jean, B.; Lukomska, E.; Robert, R.; Cadoret, J.-P. Effects of Blue Light on the Biochemical Composition and Photosynthetic Activity of *Isochrysis* Sp. (T-Iso). *J Appl Phycol* **2013**, *25*, 109–119, doi:10.1007/s10811-012-9844-y.
422. Nagao, R.; Ueno, Y.; Yokono, M.; Shen, J.-R.; Akimoto, S. Effects of Excess Light Energy on Excitation-Energy Dynamics in a Pennate Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Photosynth Res* **2019**, *141*, 355–365, doi:10.1007/s1120-019-00639-4.
423. Duarte, B.; Feijão, E.; Goessling, J.W.; Caçador, I.; Matos, A.R. Pigment and Fatty Acid Production under Different Light Qualities in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Applied Sciences* **2021**, *11*, 2550, doi:10.3390/app11062550.
424. Demmig-Adams, B.; Garab, G.; Adams, W.W.; Govindjee *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*; Advances in Photosynthesis and Respiration; Springer The Netherlands: Dordrecht, 2014; Vol. 40; ISBN 978-94-017-9031-4.
425. Blommaert, L.; Vancaester, E.; Huysman, M.J.J.; Osuna-Cruz, C.M.; D'hondt, S.; Lavaud, J.; Lepetit, B.; Winge, P.; Bones, A.M.; Vandepoele, K.; et al. Light Regulation of LHCX Genes in the Benthic Diatom *Seminavis Robusta*. *Front. Mar. Sci.* **2020**, *7*, 192, doi:10.3389/fmars.2020.00192.
426. Berthelie, J.; Casse, N.; Daccord, N.; Jamilloux, V.; Saint-Jean, B.; Carrier, G. Annotation of the Genome Assembly (Version 2) of the Microalga *Tisochrysis Lutea* 2018.
427. Delbrut, A.; Albina, P.; Lapierre, T.; Pradelles, R.; Dubreucq, E. Fucoxanthin and Polyunsaturated Fatty Acids Co-Extraction by a Green Process. *Molecules* **2018**, *23*, 874, doi:10.3390/molecules23040874.
428. Cezare-Gomes, E.A.; Mejia-da-Silva, L.C.; Pérez-Mora, L.S.; Matsudo, M.C.; Ferreira-Camargo, L.S.; Singh, A.K.; de Carvalho, J.C.M. Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Appl Biochem Biotechnol* **2019**, *188*, 602–634, doi:10.1007/s12010-018-02945-4.
429. Walne, P.R. *Experiments in the Large-Scale Culture of the Larvae of Ostrea Edulis L.*; H.M. Stationery Office, 1966;
430. Van Heukelem, L.; Thomas, C.S. Computer-Assisted High-Performance Liquid Chromatography Method Development with Applications to the Isolation and Analysis of Phytoplankton Pigments. *Journal of Chromatography A* **2001**, *910*, 31–49, doi:10.1016/S0378-4347(00)00603-4.
431. Gundermann, K.; Schmidt, M.; Weisheit, W.; Mittag, M.; Büchel, C. Identification of Several Sub-Populations in the Pool of Light Harvesting Proteins in the Pennate Diatom

- Phaeodactylum Tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827*, 303–310, doi:10.1016/j.bbabbio.2012.10.017.
432. Suggett, D.J.; Le Floch, E.; Harris, G.N.; Leonardos, N.; Geider, R.J. Different Strategies of Photoacclimation by Two Strains of *Emiliana Huxleyi* (Haptophyta). *Journal of Phycology* **2007**, *43*, 1209–1222, doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00406.x.
433. Dubinsky, Z.; Falkowski, P.G.; Wyman, K. Light Harvesting and Utilization by Phytoplankton. *Plant and Cell Physiology* **1986**, *27*, 1335–1349, doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a077232.
434. Brown, C.W.; Yoder, J.A. Blooms of *Emiliana Huxleyi* (Prymnesiophyceae) in Surface Waters of the Nova Scotian Shelf and the Grand Bank. *J Plankton Res* **1993**, *15*, 1429–1438, doi:10.1093/plankt/15.12.1429.
435. Perrin, L. Physiologie Du Coccolithophoridé *Emiliana Huxleyi* En Co-Limitation de Nutriments et de Lumière, Université Pierre et Marie Curie, 2017.
436. Cortés, M.Y.; Bollmann, J.; Thierstein, H.R. Coccolithophore Ecology at the HOT Station ALOHA, Hawaii. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **2001**, *48*, 1957–1981, doi:10.1016/S0967-0645(00)00165-X.
437. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A.G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **2009**, *136*, 731–745, doi:10.1016/j.cell.2009.01.042.
438. Longworth, J.; Wu, D.; Huete-Ortega, M.; Wright, P.C.; Vaidyanathan, S. Proteome Response of *Phaeodactylum Tricornutum*, during Lipid Accumulation Induced by Nitrogen Depletion. *Algal Research* **2016**, *18*, 213–224, doi:10.1016/j.algal.2016.06.015.
439. Dambek, M.; Eilers, U.; Breitenbach, J.; Steiger, S.; Büchel, C.; Sandmann, G. Biosynthesis of Fucoxanthin and Diadinoxanthin and Function of Initial Pathway Genes in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Journal of Experimental Botany* **2012**, *63*, 5607–5612.
440. Blommaert, L.; Huysman, M.J.J.; Vyverman, W.; Lavaud, J.; Sabbe, K. Contrasting NPQ Dynamics and Xanthophyll Cycling in a Motile and a Non-motile Intertidal Benthic Diatom. *Limnol. Oceanogr.* **2017**, *62*, 1466–1479, doi:10.1002/lno.10511.
441. Buck, J.M.; Kroth, P.G.; Lepetit, B. Identification of Sequence Motifs in Lhcx Proteins That Confer QE-based Photoprotection in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *The Plant Journal* **2021**, tpj.15539, doi:10.1111/tpj.15539.
442. Lacour, T.; Babin, M.; Lavaud, J. Diversity in Xanthophyll Cycle Pigments Content and Related Non Photochemical Quenching (NPQ) Among Microalgae: Implications for Growth Strategy and Ecology. *Journal of Phycology* **2020**, *56*, 245–263, doi:10.1111/jpy.12944.
443. Ghazaryan, A.; Akhtar, P.; Garab, G.; Lambrev, P.H.; Büchel, C. Involvement of the Lhcx Protein Fcp6 of the Diatom *Cyclotella Meneghiniana* in the Macro-Organisation and Structural Flexibility of Thylakoid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2016**, *1857*, 1373–1379, doi:10.1016/j.bbabbio.2016.04.288.
444. Nymark, M.; Valle, K.C.; Hancke, K.; Winge, P.; Andresen, K.; Johnsen, G.; Bones, A.M.; Brembu, T. Molecular and Photosynthetic Responses to Prolonged Darkness and Subsequent Acclimation to Re-Illumination in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e58722, doi:10.1371/journal.pone.0058722.
445. Kusama, Y.; Inoue, S.; Jimbo, H.; Takaichi, S.; Sonoike, K.; Hihara, Y.; Nishiyama, Y. Zeaxanthin and Echinenone Protect the Repair of Photosystem II from Inhibition by Singlet Oxygen in *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* **2015**, *56*, 906–916, doi:10.1093/pcp/pcv018.

446. Zdobnov, E.M.; Apweiler, R. InterProScan – an Integration Platform for the Signature-Recognition Methods in InterPro. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 847–848, doi:10.1093/bioinformatics/17.9.847.
447. Lacour, T.; Larivière, J.; Ferland, J.; Bruyant, F.; Lavaud, J.; Babin, M. The Role of Sustained Photoprotective Non-Photochemical Quenching in Low Temperature and High Light Acclimation in the Bloom-Forming Arctic Diatom *Thalassiosira Gravida*. *Frontiers in Marine Science* **2018**, *5*.
448. Agarwal, A.; Di, R.; Falkowski, P.G. Light-Harvesting Complex Gene Regulation by a MYB-Family Transcription Factor in the Marine Diatom, *Phaeodactylum Tricornutum*. *Photosynth Res* **2022**, doi:10.1007/s11120-022-00915-w.
449. Thiriet-Rupert, S.; Carrier, G.; Trottier, C.; Eveillard, D.; Schoefs, B.; Bougaran, G.; Cadoret, J.-P.; Chénaïs, B.; Saint-Jean, B. Identification of Transcription Factors Involved in the Phenotype of a Domesticated Oleaginous Microalgae Strain of *Tisochrysis Lutea*. *Algal Research* **2018**, *30*, 59–72, doi:10.1016/j.algal.2017.12.011.
450. Telfer, A. Singlet Oxygen Production by PSII Under Light Stress: Mechanism, Detection and the Protective Role of  $\beta$ -Carotene. *Plant and Cell Physiology* **2014**, *55*, 1216–1223, doi:10.1093/pcp/pcu040.
451. Edreva, A. Generation and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts: A Submolecular Approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **2005**, *106*, 119–133, doi:10.1016/j.agee.2004.10.022.
452. Lohman, K.E. The Ubiquitous Diatom - a Brief Survey of the Present State of Knowledge. *American Journal of Science* **1960**, *258*, 180–191.
453. Guiry, M.D. How Many Species of Algae Are There? *Journal of Phycology* **2012**, *48*, 1057–1063, doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x.
454. Fisher, N.L.; Campbell, D.A.; Hughes, J.; Kuzhiumparambil, U.; Halsey, K.H.; Ralph, P.J.; Suggett, D.J. Divergence of Photosynthetic Strategies amongst Marine Diatoms. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0244252, doi:10.1371/journal.pone.0244252.
455. Schaller-Laudel, S.; Volke, D.; Redlich, M.; Kansy, M.; Hoffmann, R.; Wilhelm, C.; Goss, R. The Diadinoxanthin Diatoxanthin Cycle Induces Structural Rearrangements of the Isolated FCP Antenna Complexes of the Pennate Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **2015**, *96*, 364–376, doi:10.1016/j.plaphy.2015.09.002.
456. Fufezan, C.; Simionato, D.; Morosinotto, T. Identification of Key Residues for PH Dependent Activation of Violaxanthin De-Epoxidase from *Arabidopsis Thaliana*. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e35669, doi:10.1371/journal.pone.0035669.
457. Havaux, M.; Niyogi, K.K. The Violaxanthin Cycle Protects Plants from Photooxidative Damage by More than One Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 8762–8767.
458. Kuczynska, P.; Jemiola-Rzeminska, M.; Nowicka, B.; Jakubowska, A.; Strzalka, W.; Burda, K.; Strzalka, K. The Xanthophyll Cycle in Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* in Response to Light Stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **2020**, *152*, 125–137, doi:10.1016/j.plaphy.2020.04.043.
459. Lavaud, J.; Goss, R. The Peculiar Features of Non-Photochemical Fluorescence Quenching in Diatoms and Brown Algae. In *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, 2014; pp. 421–443.
460. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215*, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

461. Flynn, K.J.; Zapata, M.; Garrido, J.L.; Öpik, H.; Hipkin, C.R. Changes in Carbon and Nitrogen Physiology during Ammonium and Nitrate Nutrition and Nitrogen Starvation in *Isochrysis Galbana*. *European Journal of Phycology* **1993**, *28*, 47–52, doi:10.1080/09670269300650071.
462. Takaichi, S.; Mochimaru, M. Carotenoids and Carotenogenesis in Cyanobacteria: Unique Ketocarotenoids and Carotenoid Glycosides. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2607, doi:10.1007/s00018-007-7190-z.
463. Punginelli, C.; Wilson, A.; Routaboul, J.-M.; Kirilovsky, D. Influence of Zeaxanthin and Echinenone Binding on the Activity of the Orange Carotenoid Protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2009**, *1787*, 280–288, doi:10.1016/j.bbabi.2009.01.011.
464. Wilson, A.; Ajlani, G.; Verbavatz, J.-M.; Vass, I.; Kerfeld, C.A.; Kirilovsky, D. A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria. *Plant Cell* **2006**, *18*, 992–1007, doi:10.1105/tpc.105.040121.
465. Kay Holt, T.; Krogmann, D.W. A Carotenoid-Protein from Cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1981**, *637*, 408–414, doi:10.1016/0005-2728(81)90045-1.
466. Mohamad, S.B.B.; Yousef, Y.A.; Melø, T.-B.; Jávorfí, T.; Partali, V.; Sliwka, H.-R.; Razi Naqvi, K. Singlet Oxygen Quenching by Thione Analogues of Canthaxanthin, Echinenone and Rhodoxanthin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2006**, *84*, 135–140, doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.02.006.
467. Lepetit, B.; Volke, D.; Gilbert, M.; Wilhelm, C.; Goss, R. Evidence for the Existence of One Antenna-Associated, Lipid-Dissolved and Two Protein-Bound Pools of Diadinoxanthin Cycle Pigments in Diatoms. *Plant Physiology* **2010**, *154*, 1905–1920, doi:10.1104/pp.110.166454.
468. Blommaert, L.; Chafai, L.; Bailleul, B. The Fine-Tuning of NPQ in Diatoms Relies on the Regulation of Both Xanthophyll Cycle Enzymes. *Sci Rep* **2021**, *11*, 12750, doi:10.1038/s41598-021-91483-x.
469. Jakob, T.; Goss, R.; Wilhelm, C. Unusual PH-Dependence of Diadinoxanthin de-Epoxidase Activation Causes Chlororespiratory Induced Accumulation of Diatoxanthin in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Journal of Plant Physiology* **2001**, *158*, 383–390, doi:10.1078/0176-1617-00288.
470. Yellen, G. The Voltage-Gated Potassium Channels and Their Relatives. *Nature* **2002**, *419*, 35–42, doi:10.1038/nature00978.
471. Pfundel, E.E.; Dilley, R.A. The PH Dependence of Violaxanthin Deepoxidation in Isolated Pea Chloroplasts. *Plant Physiology* **1993**, *101*, 65–71, doi:10.1104/pp.101.1.65.
472. Lavaud, J.; Materna, A.C.; Sturm, S.; Vugrinec, S.; Kroth, P.G. Silencing of the Violaxanthin De-Epoxidase Gene in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Reduces Diatoxanthin Synthesis and Non-Photochemical Quenching. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e36806, doi:10.1371/journal.pone.0036806.
473. Niyogi, K.K.; Truong, T.B. Evolution of Flexible Non-Photochemical Quenching Mechanisms That Regulate Light Harvesting in Oxygenic Photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **2013**, *16*, 307–314, doi:10.1016/j.pbi.2013.03.011.
474. Croteau, D.; Lacour, T.; Schiffrine, N.; Morin, P.-I.; Forget, M.-H.; Bruyant, F.; Ferland, J.; Lafond, A.; Campbell, D.A.; Tremblay, J.-E.; et al. Shifts in Growth Light Optima among Diatom Species Support Their Succession during the Spring Bloom in the Arctic. *Journal of Ecology* **2022**, *110*, 1356–1375, doi:10.1111/1365-2745.13874.

475. Barnett, A.; Méléder, V.; Blommaert, L.; Lepetit, B.; Gaudin, P.; Vyverman, W.; Sabbe, K.; Dupuy, C.; Lavaud, J. Growth Form Defines Physiological Photoprotective Capacity in Intertidal Benthic Diatoms. *ISME J* **2015**, *9*, 32–45, doi:10.1038/ismej.2014.105.
476. Carrier, G.; Baroukh, C.; Rouxel, C.; Duboscq-Bidot, L.; Schreiber, N.; Bougaran, G. Draft Genomes and Phenotypic Characterization of *Tisochrysis Lutea* Strains. Toward the Production of Domesticated Strains with High Added Value. *Algal Research* **2018**, *29*, 1–11, doi:10.1016/j.algal.2017.10.017.
477. Theodorou, M.E.; Elrifi, I.R.; Turpin, D.H.; Plaxton, W.C. Effects of Phosphorus Limitation on Respiratory Metabolism in the Green Alga *Selenastrum Minutum*. *Plant Physiol* **1991**, *95*, 1089–1095, doi:10.1104/pp.95.4.1089.
478. Neidhardt, J.; Benemann, J.R.; Zhang, L.; Melis, A. Photosystem-II Repair and Chloroplast Recovery from Irradiance Stress: Relationship between Chronic Photoinhibition, Light-Harvesting Chlorophyll Antenna Size and Photosynthetic Productivity in *Dunaliella Salina* (Green Algae). *Photosynthesis Research* **1998**, *56*, 175–184.
479. Fernández, F.G.A.; Camacho, F.G.; Pérez, J.A.S.; Sevilla, J.M.S.; Grima, E.M. Modeling of Biomass Productivity in Tubular Photobioreactors for Microalgal Cultures: Effects of Dilution Rate, Tube Diameter, and Solar Irradiance. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, *58*, 605–616, doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<605::AID-BIT6>3.0.CO;2-M.
480. Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 301–312, doi:10.1039/B918763B.
481. Junghans, A.; Sies, H.; Stahl, W. Macular Pigments Lutein and Zeaxanthin as Blue Light Filters Studied in Liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *391*, 160–164, doi:10.1006/abbi.2001.2411.
482. Paiva, S.A.R.; Russell, R.M.  $\beta$ -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* **1999**, *18*, 426–433, doi:10.1080/07315724.1999.10718880.
483. Prasad, W.; Wani, A.D.; Khamrui, K.; Hussain, S.A.; Khetra, Y. Green Solvents, Potential Alternatives for Petroleum Based Products in Food Processing Industries. *Cleaner Chemical Engineering* **2022**, *3*, 100052, doi:10.1016/j.clce.2022.100052.
484. Hecky, R.E.; Mopper, K.; Kilham, P.; Degens, E.T. The Amino Acid and Sugar Composition of Diatom Cell-Walls. *Marine Biology* **1973**, *19*, 323–331, doi:10.1007/BF00348902.
485. Fajardo, A.R.; Cerdán, L.E.; Medina, A.R.; Fernández, F.G.A.; Moreno, P.A.G.; Grima, A.M. Lipid Extraction from the Microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2007**, *109*, 120–126, doi:10.1002/ejlt.200600216.
486. Garrido, J.L.; Otero, J.; Maestro, M.A.; Zapata, M. The Main Nonpolar Chlorophyll c from *Emiliania Huxleyi* (Prymnesiophyceae) Is a Chlorophyll C2-Monogalactosyldiacylglyceride Ester: A Mass Spectrometry Study. *Journal of Phycology* **2000**, *36*, 497–505, doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99135.x.
487. Jeffrey, S.W. Profiles of Photosynthetic Pigments in the Ocean Using Thin-Layer Chromatography. *Marine Biology* **1974**, *26*, 101–110, doi:10.1007/BF00388879.
488. Jeffrey, S.W. Quantitative Thin-Layer Chromatography of Chlorophylls and Carotenoids from Marine Algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1968**, *162*, 271–285, doi:10.1016/0005-2728(68)90109-6.
489. Büchel, C. Evolution and Function of Light Harvesting Proteins. *Journal of Plant Physiology* **2015**, *172*, 62–75, doi:10.1016/j.jplph.2014.04.018.

490. Correa-Galvis, V.; Redekop, P.; Guan, K.; Griess, A.; Truong, T.B.; Wakao, S.; Niyogi, K.K.; Jahns, P. Photosystem II Subunit PsbS Is Involved in the Induction of LHCSR Protein-Dependent Energy Dissipation in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 17478–17487, doi:10.1074/jbc.M116.737312.
491. Sturm, S.; Engelken, J.; Gruber, A.; Vugrinec, S.; G Kroth, P.; Adamska, I.; Lavaud, J. A Novel Type of Light-Harvesting Antenna Protein of Red Algal Origin in Algae with Secondary Plastids. *BMC Evol Biol* **2013**, *13*, 159, doi:10.1186/1471-2148-13-159.
492. Engelken, J.; Brinkmann, H.; Adamska, I. Taxonomic Distribution and Origins of the Extended LHC (Light-Harvesting Complex) Antenna Protein Superfamily. *BMC Evolutionary Biology* **2010**, *10*, 233, doi:10.1186/1471-2148-10-233.
493. Grouneva, I.; Rokka, A.; Aro, E.-M. The Thylakoid Membrane Proteome of Two Marine Diatoms Outlines Both Diatom-Specific and Species-Specific Features of the Photosynthetic Machinery. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 5338–5353, doi:10.1021/pr200600f.
494. Jiang, F.; Doudna, J.A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual review of biophysics* **2017**, *46*, doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
495. Goodwin, T.W. The Nature and Distribution of Carotenoids in Some Blue-Green Algae. *Microbiology* **1957**, *17*, 467–473, doi:10.1099/00221287-17-2-467.
496. Melnicki, M.R.; Leverenz, R.L.; Sutter, M.; López-Igual, R.; Wilson, A.; Pawlowski, E.G.; Perreau, F.; Kirilovsky, D.; Kerfeld, C.A. Structure, Diversity, and Evolution of a New Family of Soluble Carotenoid-Binding Proteins in Cyanobacteria. *Molecular Plant* **2016**, *9*, 1379–1394, doi:10.1016/j.molp.2016.06.009.
497. Vladić, J.; Jerković, I.; Radman, S.; Molnar Jazić, J.; Ferreira, A.; Maletić, S.; Gouveia, L. Supercritical CO<sub>2</sub> Extract from Microalga *Tetrademus Obliquus*: The Effect of High-Pressure Pre-Treatment. *Molecules* **2022**, *27*, 3883, doi:10.3390/molecules27123883.
498. Lu, Q.; Lu, Y. Microalga- and Yeast-Based Astaxanthin Production via Nutrient Recovery from Wastewater for Aquaculture Practice: An Emerging Technology for Sustainable Development. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2022**, *97*, 3035–3048, doi:10.1002/jctb.7164.
499. Qin, S.; Liu, G.-X.; Hu, Z.-Y. The Accumulation and Metabolism of Astaxanthin in *Scenedesmus Obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry* **2008**, *43*, 795–802, doi:10.1016/j.procbio.2008.03.010.
500. Symonds, R.C.; Kelly, M.S.; Caris-Veyrat, C.; Young, A.J. Carotenoids in the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus*: Occurrence of 9'-Cis-Echinenone as the Dominant Carotenoid in Gonad Colour Determination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2007**, *148*, 432–444, doi:10.1016/j.cbpb.2007.07.012.
501. Zapata, M.; Edvardsen, B.; Rodríguez, F.; Maestro, M.; Garrido, J. I. Chlorophyll C2 Monogalactosyldiacylglyceride Ester (Chl C2-MGDG). A Novel Marker Pigment for *Chrysochromulina* Species (Haptophyta). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2001**, *219*, 85–98, doi:10.3354/meps219085.
502. Zapata, M.; Jeffrey, S.W.; Wright, S.W.; Rodriguez, F.; Garrido, J.L.; Clementson, L. Photosynthetic Pigments in 37 Species (65 Strains) of Haptophyta. *Current Biology* **2004**, *7*, R126, doi:10.1016/S0960-9822(97)70976-X.
503. Lavaud, J.; Lepetit, B. An Explanation for the Inter-Species Variability of the Photoprotective Non-Photochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching in Diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827*, 294–302, doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.012.

504. Marchal, L.; Legrand, J.; Foucault, A. Centrifugal Partition Chromatography: A Survey of Its History, and Our Recent Advances in the Field. *Chem Rec* **2003**, *3*, 133–143, doi:10.1002/tcr.10057.
505. Boudesocque, L. Nouvelles Méthodologies de Purification de Peptides Par Chromatographie de Partage Centrifuge : Application à l'isolement et à La Purification de Peptides Bio-Actifs. These de doctorat, Reims, 2010.
506. Marchal, L.; Foucault, A.; Patissier, G.; Rosant, J.M.; Legrand, J. Influence of Flow Patterns on Chromatographic Efficiency in Centrifugal Partition Chromatography. *J Chromatogr A* **2000**, *869*, 339–352, doi:10.1016/s0021-9673(99)01184-x.
507. Sutherland, I.A. Recent Progress on the Industrial Scale-up of Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1151*, 6–13, doi:10.1016/j.chroma.2007.01.143.
508. Morais Fernandes, J.; Ortiz, S.; Padilha M. Tavares, R.; Mandova, T.; Rodrigues D. Araújo, E.; L. Andrade, A.W.; Michel, S.; Grougnet, R.; Zucolotto, S.M. *Bryophyllum Pinnatum* Markers: CPC Isolation, Simultaneous Quantification by a Validated UPLC-DAD Method and Biological Evaluations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2021**, *193*, 113682, doi:10.1016/j.jpba.2020.113682.
509. Dantas-Medeiros, R.; Zanatta, A.C.; Canário de Souza, L.B.F.; Morais Fernandes, J.; Amorim-Carmo, B.; Torres-Rêgo, M.; Fernandes-Pedrosa, M.; Vilegas, W.; de Sousa Araújo, T.A.; Michel, S.; et al. Antifungal and Antibiofilm Activities of B-Type Oligomeric Procyanidins From *Commiphora Leptophloeos* Used Alone or in Combination With Fluconazole Against *Candida* Spp. *Frontiers in Microbiology* **2021**, *12*.
510. Kim, B.-R.; Thapa, P.; Kim, H.M.; Jin, C.H.; Kim, S.H.; Kim, J.-B.; Choi, H.; Han, A.-R.; Nam, J.-W. Purification of Phenylpropanoids from the Scaly Bulbs of *Lilium Longiflorum* by CPC and Determination of Their DPP-IV Inhibitory Potentials. *ACS Omega* **2020**, *5*, 4050–4057, doi:10.1021/acsomega.9b03649.
511. Kim, C.Y.; Kim, J. Preparative Isolation and Purification of Geniposide from Gardenia Fruits by Centrifugal Partition Chromatography. *Phytochemical Analysis* **2007**, *18*, 115–117, doi:10.1002/pca.958.
512. Duval, J.; Destandau, E.; Pecher, V.; Poujol, M.; Tranchant, J.-F.; Lesellier, E. Selective Enrichment in Bioactive Compound from *Kniphofia Uvaria* by Super/Subcritical Fluid Extraction and Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1447*, 26–38, doi:10.1016/j.chroma.2016.04.029.
513. Jeon, J.-S.; Kim, S.-M.; Lee, H.J.; Um, B.H.; Kim, H.K.; Kim, C.Y. Preparative Isolation and Purification of Prenylated Isoflavonoids from *Cudrania Tricuspidata* Fruits Using Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2012**, *35*, 1607–1615, doi:10.1080/10826076.2011.621151.
514. Marchal, L.; Mojaat-Guemir, M.; Foucault, A.; Pruvost, J. Centrifugal Partition Extraction of  $\beta$ -Carotene from *Dunaliella Salina* for Efficient and Biocompatible Recovery of Metabolites. *Bioresource Technology* **2013**, *134*, 396–400, doi:10.1016/j.biortech.2013.02.019.



---

# ANNEXES

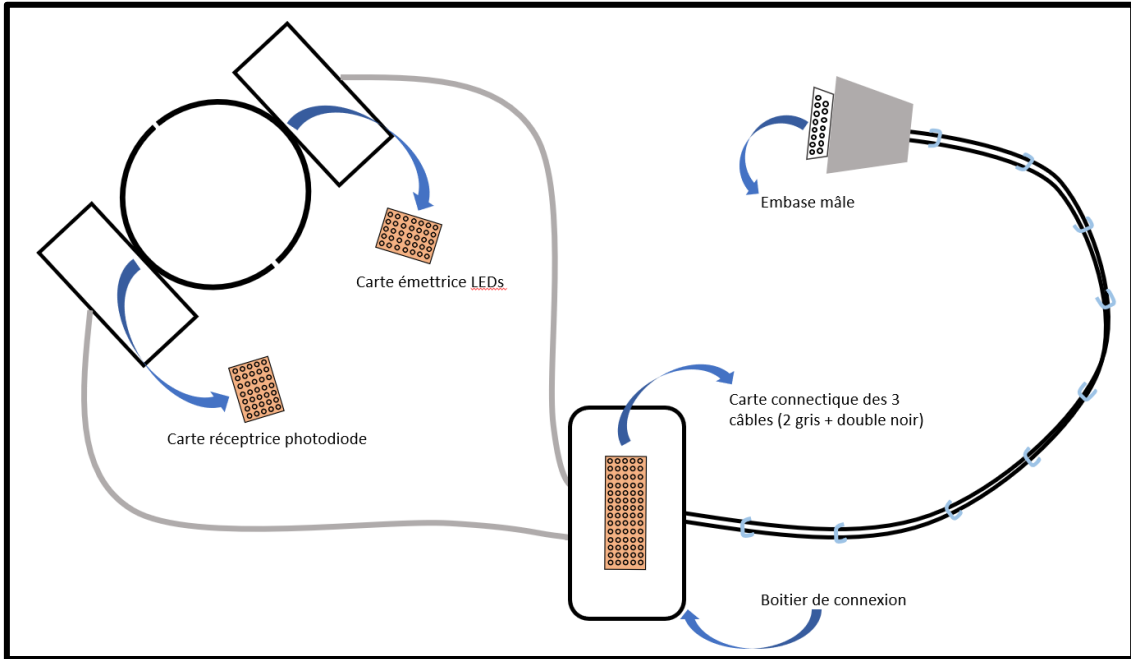
---



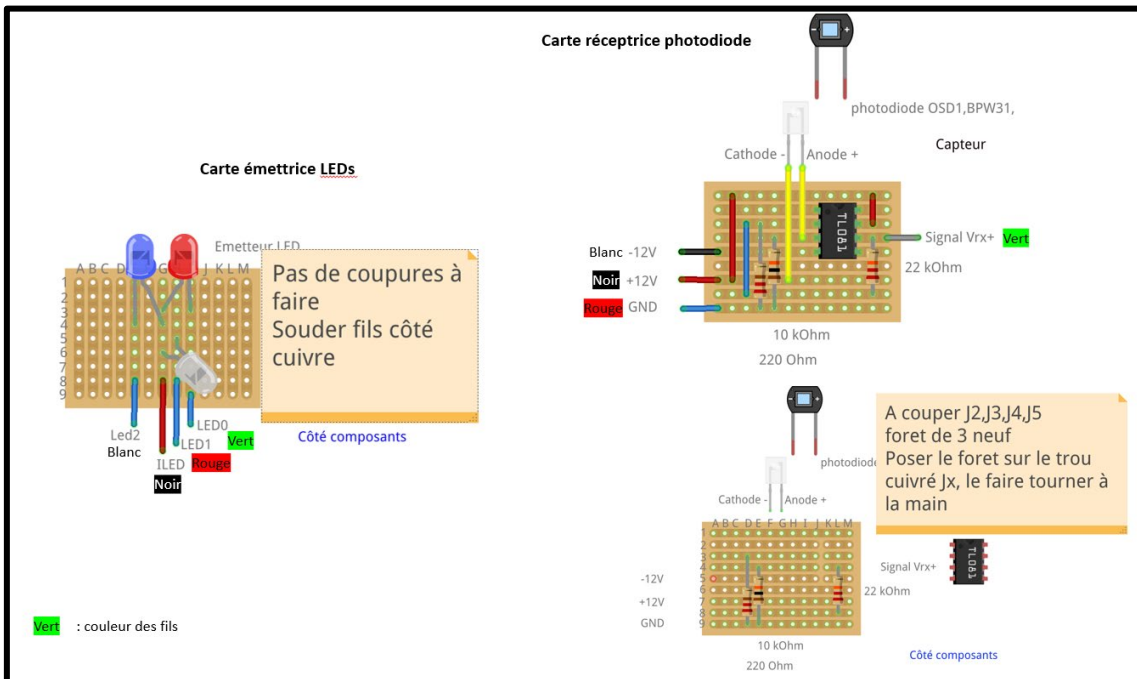
# Annexes

## Annexe I. Capteurs de densité optique

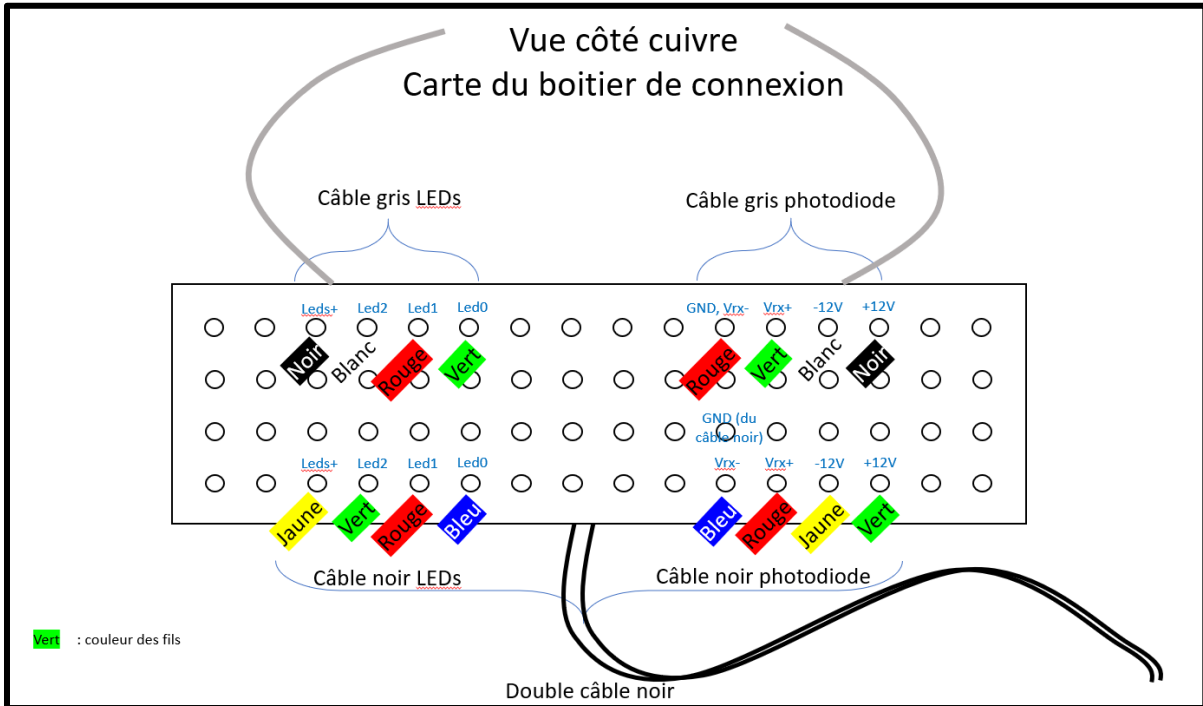
Annexe I.1. Schéma général d'un capteur de densité optique et de ses principaux composants.



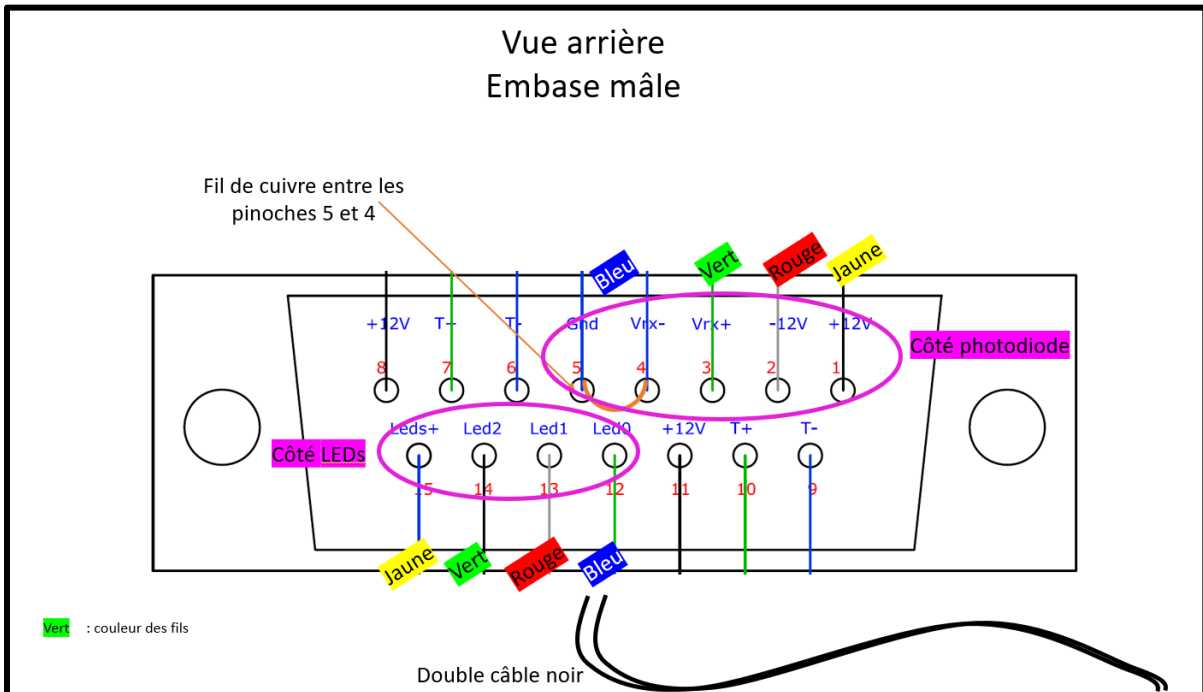
Annexe I.2. Détail des cartes émettrice et réceptrice des demi-cercles du capteur de densité optique.



Annexe I.3. Détail de la carte électronique du boîtier de connexion reliant les cartes émettrices et réceptrices (câbles gris) à l'embase (double câble noir).

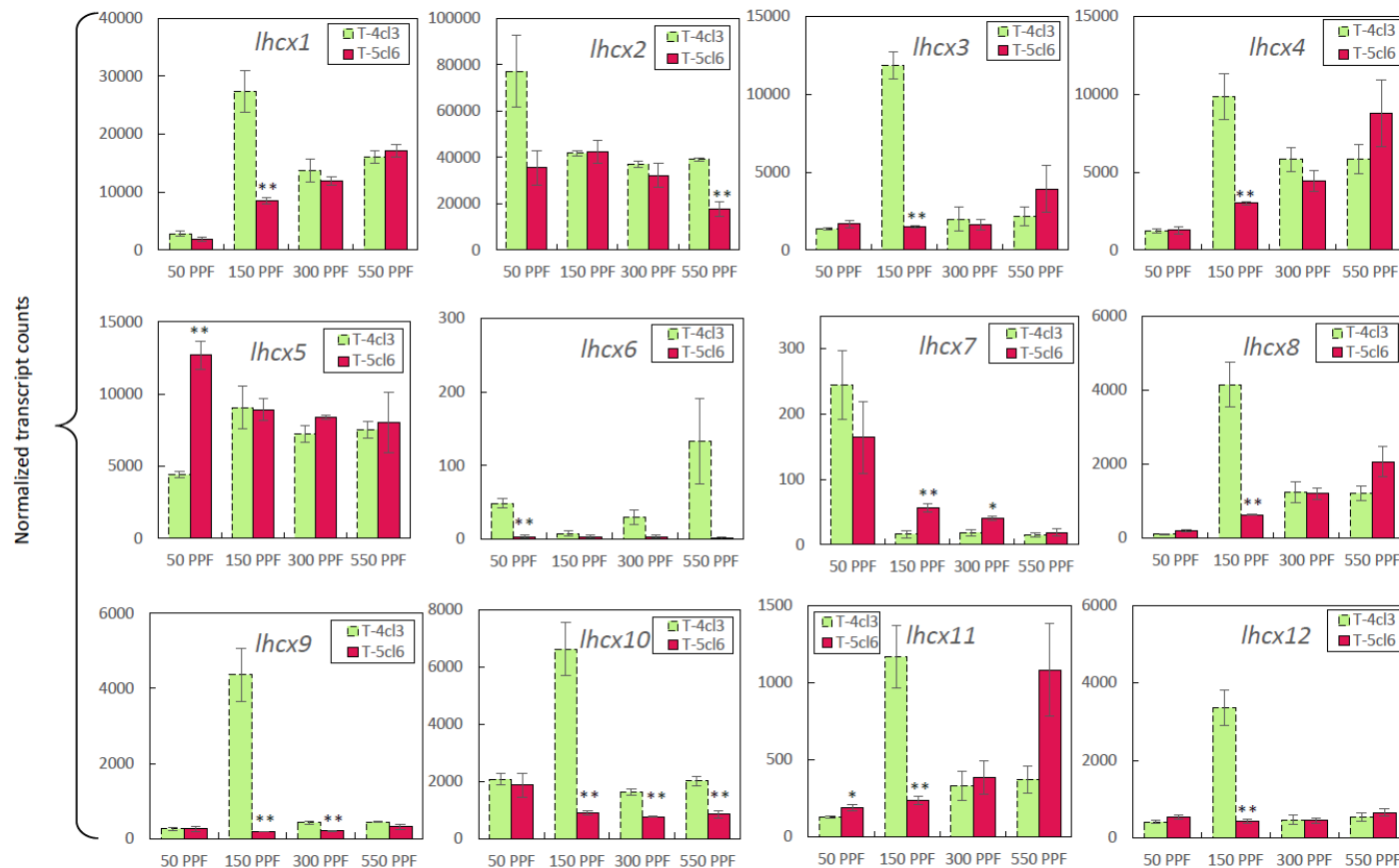


Annexe I.4. Détail de l'embase et des fils soudés reliant le capteur au système d'acquisition du photobioréacteur.



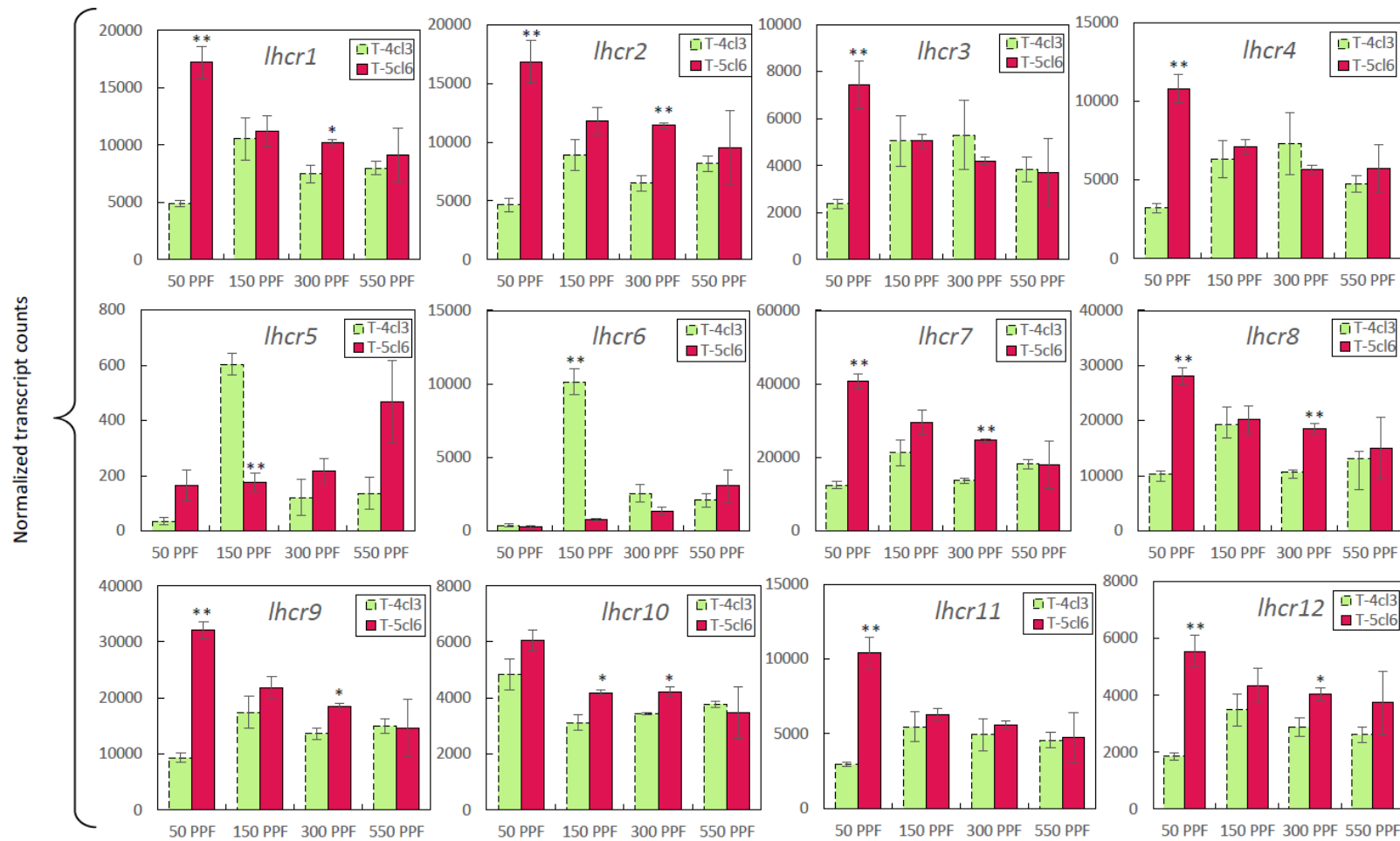
## Annexe II. Supplementary Material de l'article "Light-response in two clonal strains of the haptophyte *Tisochrysis lutea*: evidence for different photoprotection strategies" (soumis dans Algal Research le 26/08/2022, ALGAL-D-22-00647, révisé et re-soumis le 20/10/2022.)

Annexe II.1. Figure S1, Evolution of *lhcx* normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Note that the Y axis is different from one gene to another. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.



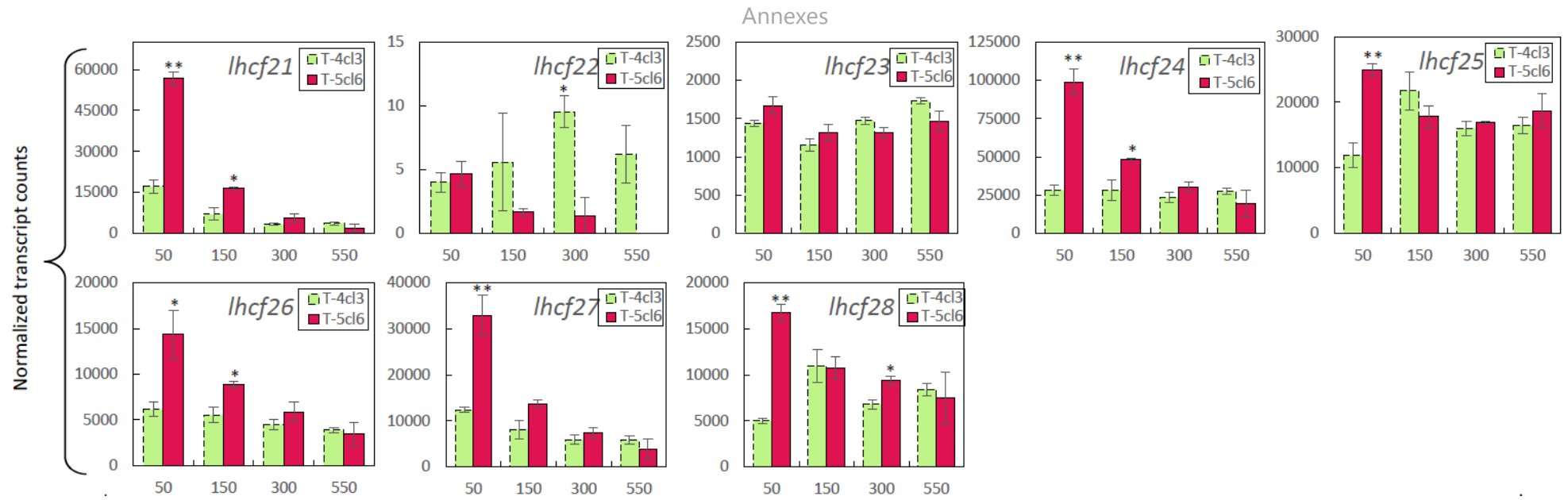
Annexes

Annexe II.2. Figure S2, Evolution of *lhcr* normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Note that the Y axis is different from one gene to another. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.



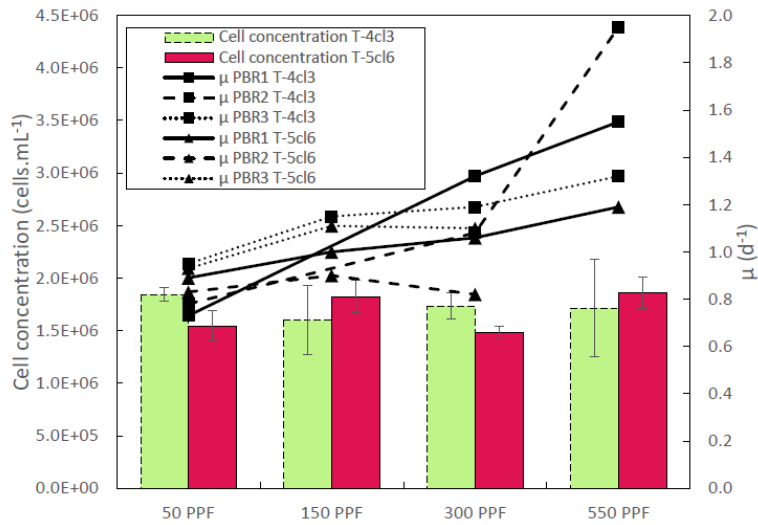
Annexe II.3. Figure S3, Evolution of *lhcf* normalized transcripts counts (average  $\pm$  the confidence interval) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Note that the Y axis is different from one gene to another. \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.



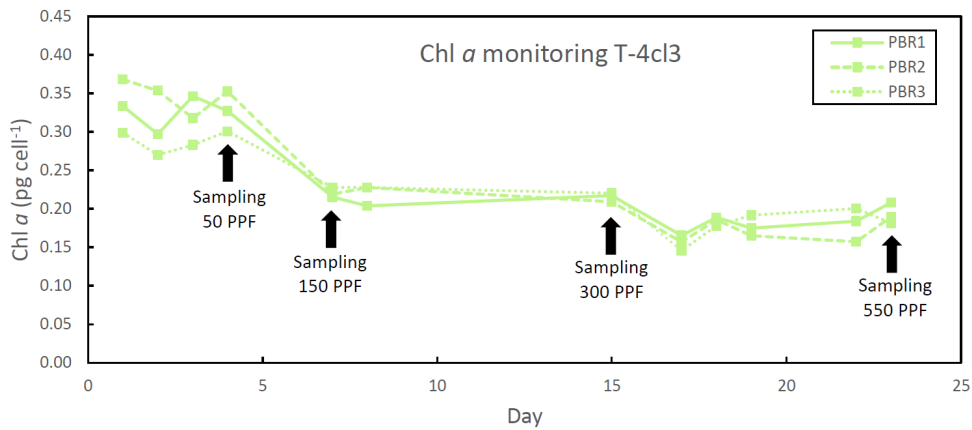




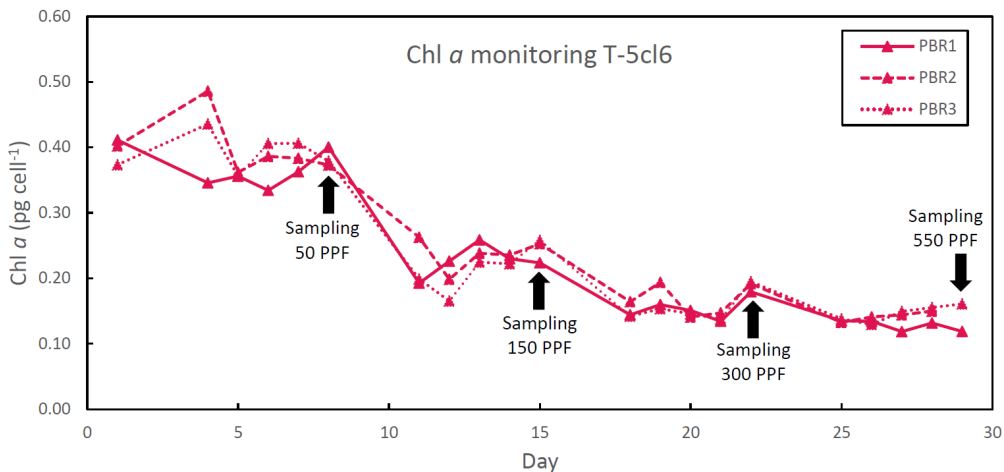
Annexe II.4. Figure S4, Evolution of growth rate (curves,  $d^{-1}$ ) and cell concentration (histograms, average  $\pm$  the confidence interval, cells  $mL^{-1}$ ) relatively to growth irradiance (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu mol m^2 s^{-1}$ ). Growth rates were calculated during the last 24 hours before sampling and are displayed for each replicate.



Annexe II.5. Figure S5, Evolution of Chl a content ( $pg cell^{-1}$ ) in T-4c3 during the whole experiment for the three replicates.



Annexe II.6. Figure S6, Evolution of Chl a content ( $pg cell^{-1}$ ) in T-5c6 during the whole experiment for the three replicates.



Annexe II.7. Table S1, VDE-DDE diatoms.

Query Seq-id (ID of your sequence)	Subject Seq-id	Percentage of identical matches	Expectation value	Bit score
DDE_Thalassiosira_pseudonana_DDE	TISO_01606	25.556	1.67E-15	78.2
DDE_Thalassiosira_pseudonana_DDE	TISO_02731	21.645	6.18E-07	51.6
DDE_Thalassiosira_pseudonana_DDE	TISO_23949	33.48	1.44E-29	117
<b>DDE_Thalassiosira_pseudonana_DDE</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>39.433</b>	<b>3.92E-82</b>	<b>259</b>
<b>VDE_DCP_Fistulifera</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>41.737</b>	<b>1.28E-86</b>	<b>273</b>
<b>VDE_DCP_Fistulifera</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>41.837</b>	<b>1.90E-18</b>	<b>88.6</b>
VDE_DCP_Fistulifera	TISO_02731	32.584	1.03E-08	57.8
VDE_DCP_Fistulifera	TISO_23949	22.5	2.72E-08	55.5
<b>VDE_DCP_Fistulifera</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>19.551</b>	<b>7.25E-07</b>	<b>51.2</b>
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_10Hh272	TISO_08461	37.197	4.03E-66	221
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_10Hh272	TISO_23949	26.022	1.20E-13	72
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_10Lh272	TISO_08461	36.745	1.26E-66	222
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_10Lh272	TISO_23949	26.568	9.88E-16	78.2
<b>VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Hh008</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>39</b>	<b>1.56E-57</b>	<b>192</b>
<b>VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Hh008</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>42.745</b>	<b>1.28E-52</b>	<b>186</b>
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Hh008	TISO_23949	24.125	2.38E-16	79
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Hh008	TISO_37047	22.581	1.16E-10	62.4
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Lh008	TISO_01606	38.667	2.49E-57	192
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Lh008	TISO_02731	41.132	2.12E-52	185
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Lh008	TISO_23949	25.191	1.22E-15	77
<b>VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_17Lh008</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>21.708</b>	<b>9.35E-10</b>	<b>59.7</b>
<b>VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_22Hh163</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>42.197</b>	<b>1.46E-86</b>	<b>273</b>
<b>VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_22Hh163</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>41.837</b>	<b>1.52E-18</b>	<b>89</b>
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_22Hh163	TISO_02731	32.927	1.48E-08	57
VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_22Hh163	TISO_23949	23.645	8.73E-09	57
<b>VDE_DCP_Fistulifera_solaris_FisN_22Hh163</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>20.857</b>	<b>3.50E-07</b>	<b>52.4</b>

## Annexes

VDE_DCP_Fragilariopsis_cylindrus_FRACYDRAFT_269417	TISO_08461	46.154	1.63E-21	91.3
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_21914</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>42.515</b>	<b>1.33E-81</b>	<b>263</b>
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_21914</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>35.345</b>	<b>1.22E-14</b>	<b>77</b>
VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_21914	TISO_02731	39.024	9.76E-10	61.2
VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_21914	TISO_23949	24.39	2.85E-05	46.2
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_21914</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>27.778</b>	<b>8.07E-06</b>	<b>48.1</b>
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_31281</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>34.936</b>	<b>2.41E-50</b>	<b>175</b>
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_31281</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>36.071</b>	<b>1.22E-46</b>	<b>170</b>
VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_31281	TISO_23949	24.254	1.28E-13	71.2
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_31281</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>20.345</b>	<b>1.03E-04</b>	<b>43.9</b>
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_36204</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>25.14</b>	<b>1.48E-05</b>	<b>44.7</b>
VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_36204	TISO_08461	51.546	3.44E-21	90.1
VDE_DCP_Thalassiosira_oceanica_THAOC_36204	TISO_23949	29.167	4.15E-06	46.2
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_11707</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>41.092</b>	<b>2.12E-80</b>	<b>259</b>
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_11707</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>36.207</b>	<b>2.85E-16</b>	<b>82.4</b>
VDE_DCP_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_11707	TISO_02731	39.024	2.69E-10	63.2
VDE_DCP_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_11707	TISO_23949	25.397	2.62E-07	52.8
<b>VDE_DCP_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_11707</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>20.645</b>	<b>1.43E-05</b>	<b>47.4</b>
<b>VDE_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_3</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>40.443</b>	<b>1.91E-79</b>	<b>255</b>
<b>VDE_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_3</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>38.776</b>	<b>1.35E-14</b>	<b>76.6</b>
VDE_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_3	TISO_02731	34.653	3.28E-10	62.4
VDE_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_3	TISO_23949	28.03	1.61E-07	53.1
<b>VDE_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_3</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>25.153</b>	<b>1.68E-05</b>	<b>47</b>
<b>VDE_Phaeodactylum_tricornutum_VDE</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>25.373</b>	<b>1.23E-15</b>	<b>78.2</b>
<b>VDE_Phaeodactylum_tricornutum_VDE</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>25</b>	<b>2.33E-08</b>	<b>56.2</b>
VDE_Phaeodactylum_tricornutum_VDE	TISO_23949	33.188	3.65E-30	119
<b>VDE_Phaeodactylum_tricornutum_VDE</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>45.211</b>	<b>3.56E-74</b>	<b>238</b>
<b>VDE1_Fistulifera_solaris_FisN_2Hh491</b>	<b>TISO_01606</b>	<b>24.535</b>	<b>3.43E-13</b>	<b>70.9</b>
<b>VDE1_Fistulifera_solaris_FisN_2Hh491</b>	<b>TISO_02731</b>	<b>25.306</b>	<b>2.31E-10</b>	<b>62.8</b>
VDE1_Fistulifera_solaris_FisN_2Hh491	TISO_23949	30.065	3.76E-31	122
<b>VDE1_Fistulifera_solaris_FisN_2Hh491</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>39.2</b>	<b>3.07E-79</b>	<b>252</b>

## Annexes

VDE1_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_1	TISO_01606	24.269	1.11E-14	75.5
VDE1_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_1	TISO_02731	22.041	1.37E-04	44.3
VDE1_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_1	TISO_23949	33.48	2.37E-28	114
<b>VDE1_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_1</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>37.94</b>	<b>6.29E-75</b>	<b>240</b>
VDE2_Fistulifera_solaris_FisN_2Lh491	TISO_01606	24.535	2.23E-13	70.9
VDE2_Fistulifera_solaris_FisN_2Lh491	TISO_02731	25.105	3.89E-10	61.6
VDE2_Fistulifera_solaris_FisN_2Lh491	TISO_23949	30.392	5.72E-32	123
<b>VDE2_Fistulifera_solaris_FisN_2Lh491</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>39.2</b>	<b>1.84E-79</b>	<b>251</b>
VDE2_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_2	TISO_01606	34.615	1.98E-50	176
VDE2_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_2	TISO_02731	60.87	6.72E-127	385
VDE2_Fragilariopsis_cylindrus_VDE_2	TISO_23949	25.483	9.24E-20	89.7
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL1	TISO_01606	34.591	1.17E-48	172
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL1	TISO_02731	36.525	1.95E-42	159
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL1	TISO_23949	24.028	2.82E-15	76.6
<b>VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL1</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>21.246</b>	<b>2.14E-05</b>	<b>46.2</b>
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL2_PHATRDRAFT_45846	TISO_01606	40.483	7.29E-83	265
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL2_PHATRDRAFT_45846	TISO_02731	35.345	4.84E-15	78.2
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL2_PHATRDRAFT_45846	TISO_02731	39.474	1.53E-08	57.4
VDEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_VDL2_PHATRDRAFT_45846	TISO_23949	23.81	1.05E-05	47.4
VDEL1_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_22076	TISO_01606	35.336	2.78E-46	164
VDEL1_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_22076	TISO_02731	37.778	3.58E-46	169
VDEL1_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_22076	TISO_23949	22.109	2.94E-12	67
<b>VDEL1_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_22076</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>21.453</b>	<b>2.04E-05</b>	<b>46.2</b>
VDEL2_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_270211	TISO_08461	39.788	1.89E-74	242
VDEL2_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_270211	TISO_23949	27.547	1.45E-08	56.2
VDERelated_Phaeodactylum_tricornutum_VDR	TISO_01606	24.476	3.27E-06	49.7
VDERelated_Phaeodactylum_tricornutum_VDR	TISO_08461	38.346	1.41E-73	241
VDERelated_Phaeodactylum_tricornutum_VDR	TISO_23949	23.711	5.68E-09	57.8

Annexe II.8. Table S2, VDE haptophytes.

Query Seq-id (ID of your sequence)	Subject Seq-id	Percentage of identical matches	Alignment length	Expectation value	Bit score
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_000428	TISO_01606	35.535	318	1.76E-49	171
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_000428	TISO_02731	66.775	307	7.11E-141	418
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_000428	TISO_23949	21.673	263	7.51E-15	74.3
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_000428	TISO_37047	23.043	230	8.62E-10	59.7
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001664	TISO_01606	59.85	401	7.17E-164	469
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001664	TISO_02731	28.326	233	2.56E-24	106
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001664	TISO_23949	28.099	121	1.03E-10	62.8
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004216	TISO_01606	22.727	264	3.81E-17	82.4
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004216	TISO_02731	22.128	235	7.36E-09	57.4
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004216	TISO_23949	31.923	260	1.21E-30	119
VDE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004216	TISO_37047	51.225	408	9.64E-129	376
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_200654	TISO_01606	23.86	285	1.67E-11	63.9
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_200654	TISO_23949	25	272	7.11E-13	67.8
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_200654	TISO_37047	31.102	254	3.47E-29	114
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_365129	TISO_01606	21.212	330	9.69E-12	65.9
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_365129	TISO_02731	26.119	268	7.35E-10	60.5
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_365129	TISO_23949	26.715	277	1.29E-19	88.6
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_365129	TISO_37047	62.274	387	1.07E-174	493
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_434525	TISO_01606	34.426	305	9.23E-46	163
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_434525	TISO_02731	60.79	329	7.07E-133	400
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_434525	TISO_23949	21.898	274	1.35E-11	65.1
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_434525	TISO_37047	21.053	323	2.58E-07	52.4
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_445463	TISO_01606	34.426	305	6.11E-46	164
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_445463	TISO_02731	61.094	329	1.28E-132	400
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_445463	TISO_23949	21.898	274	1.31E-11	65.1
VDE_DCP_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_445463	TISO_37047	21.362	323	2.18E-07	52.8

## Annexes

VDE_Emiliana_huxleyi_VDE	TISO_01606	21.19	420	3.88E-11	63.9
VDE_Emiliana_huxleyi_VDE	TISO_02731	25.182	274	2.27E-08	55.8
VDE_Emiliana_huxleyi_VDE	TISO_23949	26.056	284	2.25E-19	88.2
<b>VDE_Emiliana_huxleyi_VDE</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>61.168</b>	<b>394</b>	<b>6.74E-172</b>	<b>486</b>
VDE2_Emiliana_huxleyi_VDE2	TISO_01606	69.021	439	0	600
VDE2_Emiliana_huxleyi_VDE2	TISO_02731	30.224	268	6.49E-29	120
VDE2_Emiliana_huxleyi_VDE2	TISO_23949	24.427	262	1.42E-12	68.6
<b>VDE2_Emiliana_huxleyi_VDE2</b>	<b>TISO_37047</b>	<b>22.293</b>	<b>314</b>	<b>1.56E-07</b>	<b>53.1</b>
VDEL2_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_012539	TISO_08461	58.424	368	9.67E-145	423
VDEL2_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_012539	TISO_23949	22.662	278	1.53E-06	50.1

## Annexe II.9. Table S3, ZE diatoms.

Query Seq-id (ID of your sequence)	Subject Seq-id	Percentage of identical matches	Alignment length	Expectation value	Bit score
ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390	TISO_00964	68.772	285	2.05E-129	379
ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390	TISO_09094	40.086	464	5.31E-85	271
ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390	TISO_11444	25.217	230	7.26E-05	45.4
ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390	TISO_21174	24.838	463	6.66E-13	70.5
ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390	TISO_25933	24.494	445	1.00E-11	66.6
ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390	TISO_28055	31.556	450	2.44E-66	226
<b>ZE_Thalassiosira_pseudonana_THAPSDRAFT_261390</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>46.585</b>	<b>410</b>	<b>1.54E-116</b>	<b>352</b>
ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_00964	41.98	293	1.16E-59	201
ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_09094	40.547	439	4.65E-90	285
ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_11444	25	224	1.53E-04	44.3
ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_21174	25.823	395	6.74E-11	64.3
ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_25933	24.211	285	2.49E-06	49.7
ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_28055	33.034	445	1.01E-68	233
<b>ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>59.534</b>	<b>472</b>	<b>0</b>	<b>554</b>

## Annexes

ZE1_Fistulifera_solaris_FisN_16Hh172	TISO_35099	38.961	77	2.48E-05	46.6
ZE1_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_1	TISO_00964	48.387	279	3.35E-64	213
ZE1_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_1	TISO_09094	40.541	407	2.30E-91	289
ZE1_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_1	TISO_11444	26.638	229	4.13E-06	49.7
ZE1_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_1	TISO_21174	24.675	385	5.43E-11	64.7
ZE1_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_1	TISO_28055	31.963	438	7.00E-71	240
<b>ZE1_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_1</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>62.864</b>	<b>447</b>	<b>0</b>	<b>556</b>
ZE1_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP1_PHATRDRAFT_45845	TISO_00964	35.333	300	4.98E-30	121
ZE1_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP1_PHATRDRAFT_45845	TISO_09094	31.2	500	7.66E-58	201
ZE1_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP1_PHATRDRAFT_45845	TISO_21174	44.776	67	2.06E-07	53.5
ZE1_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP1_PHATRDRAFT_45845	TISO_28055	67.076	489	0	618
<b>ZE1_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP1_PHATRDRAFT_45845</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>34.375</b>	<b>448</b>	<b>2.87E-74</b>	<b>246</b>
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_00964	40.984	305	1.41E-59	201
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_09094	40.774	439	6.40E-91	288
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_11444	25	224	1.22E-04	44.7
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_21174	25.635	394	1.32E-11	66.6
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_25933	25	284	5.81E-07	52
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_28055	33.034	445	1.08E-67	231
<b>ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>59.746</b>	<b>472</b>	<b>0</b>	<b>555</b>
ZE2_Fistulifera_solaris_FisN_16Lh172	TISO_35099	38.961	77	2.54E-05	46.6
ZE2_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_2	TISO_00964	32.566	304	3.16E-31	125
ZE2_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_2	TISO_09094	32.812	448	2.29E-58	204
ZE2_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_2	TISO_21174	36.364	66	7.21E-05	45.4
ZE2_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_2	TISO_28055	79.926	538	0	838
<b>ZE2_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_2</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>34.899</b>	<b>447</b>	<b>1.39E-70</b>	<b>237</b>
ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_00964	62.658	316	8.68E-121	361
ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_09094	38.085	470	1.95E-86	278
ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_11444	25.61	246	7.92E-06	48.9
ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_14436	37.179	78	8.31E-04	42
ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_21174	27.413	259	1.41E-13	72.8
ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_25933	24.736	473	1.22E-06	51.2

## Annexes

ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348	TISO_28055	33.857	446	5.08E-71	241
<b>ZE3_Fistulifera_solaris_FisN_4Hh348</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>42.704</b>	<b>466</b>	<b>8.03E-112</b>	<b>344</b>
ZE3_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_3	TISO_00964	60.952	315	3.34E-124	370
ZE3_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_3	TISO_09094	37.112	547	9.92E-87	279
ZE3_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_3	TISO_11444	28.235	170	2.53E-05	47.4
ZE3_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_3	TISO_21174	25.221	452	1.51E-14	76.3
ZE3_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_3	TISO_28055	31.195	452	2.61E-65	226
<b>ZE3_Fragilariopsis_cylindrus_ZEP_3</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>43.376</b>	<b>468</b>	<b>1.80E-113</b>	<b>348</b>
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_00964	44.375	320	7.92E-66	218
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_09094	38.229	497	5.25E-86	276
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_11444	27.155	232	1.56E-06	50.8
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_21174	24.878	410	1.23E-11	66.6
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_25933	24.723	271	2.03E-07	53.5
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_28055	32.093	430	1.35E-64	223
<b>ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>58.4</b>	<b>500</b>	<b>0</b>	<b>556</b>
ZE3_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP3	TISO_35099	35.065	77	4.20E-04	42.7
ZEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP2	TISO_00964	64.038	317	7.55E-129	383
ZEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP2	TISO_09094	40.084	474	2.67E-89	286
ZEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP2	TISO_11444	26.642	274	3.60E-07	53.1
ZEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP2	TISO_21174	26.027	438	3.49E-14	75.1
ZEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP2	TISO_28055	33.85	452	1.57E-70	241
<b>ZEL_Precursor_Phaeodactylum_tricornutum_ZEP2</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>39.961</b>	<b>518</b>	<b>1.52E-108</b>	<b>336</b>

## Annexe II.10. Table S4, ZE haptophytes.

Query Seq-id (ID of your sequence)	Subject Seq-id	Percentage of identical matches	Alignment length	Expectation value	Bit score
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_00964	34.146	328	2.51E-34	132
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_06081	22.704	392	1.05E-04	45.1
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_09094	60	420	2.46E-172	496



## Annexes

ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_11444	36.842	95	2.02E-06	50.4
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_14436	33.333	123	5.07E-04	42.4
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_21174	27.294	425	6.10E-08	54.7
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_25933	24.9	249	8.59E-10	60.8
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129	TISO_28055	37.079	445	2.18E-71	240
<b>ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_001129</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>43.084</b>	<b>441</b>	<b>3.63E-95</b>	<b>298</b>
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_00964	38.346	266	1.93E-44	159
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_06081	26.791	321	8.40E-07	51.6
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_09094	61.505	465	0	578
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_11444	33.813	139	2.06E-07	53.5
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_14436	37.647	85	7.71E-05	45.1
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_21174	25.201	373	2.02E-13	71.6
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_25933	24.181	397	4.69E-06	48.5
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879	TISO_28055	35.294	425	2.71E-72	241
<b>ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_002879</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>41.201</b>	<b>483</b>	<b>1.02E-97</b>	<b>303</b>
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_003597	TISO_00964	74.39	328	6.62E-168	481
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_003597	TISO_06081	61.765	34	1.79E-04	44.3
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_003597	TISO_09094	38.866	476	1.62E-80	261
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_003597	TISO_21174	27.248	367	4.89E-09	58.5
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_003597	TISO_28055	31.739	460	5.86E-52	189
<b>ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_003597</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>43.096</b>	<b>478</b>	<b>1.12E-105</b>	<b>327</b>
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_00964	42.763	304	1.90E-57	196
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_06081	47.727	44	3.54E-04	43.5
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_09094	41.646	401	3.31E-86	276
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_11444	25.725	276	2.08E-06	50.4
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_14436	47.541	61	2.84E-04	43.5
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_21174	22.338	385	5.62E-07	52
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_28055	34.615	442	9.09E-71	240
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_30349	62.913	515	0	640
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_004214	TISO_35099	25.088	283	2.62E-06	50.1
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_006155	TISO_00964	31.773	299	2.48E-30	122

## Annexes

ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_006155	TISO_09094	34.521	449	3.66E-61	212
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_006155	TISO_21174	40.909	66	4.55E-06	49.3
ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_006155	TISO_28055	84.432	546	0	889
<b>ZE_Chrysochromulina_tobinii_Ctob_006155</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>35.056</b>	<b>445</b>	<b>1.63E-71</b>	<b>239</b>
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_00964	37.868	272	4.01E-35	134
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_04312	34.783	115	3.21E-05	46.2
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_06081	45.455	44	5.72E-04	42.4
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_09094	36.919	409	1.88E-63	215
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_11444	29.927	137	2.07E-04	43.9
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_14436	36.937	111	2.15E-05	47
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_21174	25.668	374	8.89E-08	54.3
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_28055	36.649	191	1.76E-30	125
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_28055	38.462	117	2.77E-19	90.9
<b>ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>57.677</b>	<b>508</b>	<b>0</b>	<b>568</b>
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_456674	TISO_35099	32.824	131	2.24E-07	53.1
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_00964	37.5	272	3.19E-34	131
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_04312	33.913	115	3.67E-04	42.7
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_06081	45.455	44	6.15E-04	42.4
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_09094	36.919	409	1.96E-63	214
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_11444	29.927	137	8.56E-05	45.1
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_14436	36.937	111	3.56E-05	45.8
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_21174	25.798	376	1.90E-08	56.2
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_28055	36.126	191	9.58E-30	122
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_28055	37.607	117	4.14E-18	87
<b>ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120</b>	<b>TISO_30349</b>	<b>58.7</b>	<b>477</b>	<b>0</b>	<b>543</b>
ZE_Emiliania_huxleyi_EMIHURAFT_457120	TISO_35099	32.824	131	4.99E-07	52

Annexe II.11. Table S5, Interproscan.

Source	Gene number TISO_	Proposed name	Protein family membership	Biological process	Molecular function	Cellular component
BLAST DDE	37047	DDE_L	Violaxanthin de-epoxidase	xanthophyll cycle (GO:0010028)	violaxanthin de-epoxidase activity (GO:0046422)	none predicted
BLAST VDE	23949		Violaxanthin de-epoxidase	xanthophyll cycle (GO:0010028)	violaxanthin de-epoxidase activity (GO:0046422)	none predicted
BLAST VDE	1606	VDE_L1	Violaxanthin de-epoxidase	xanthophyll cycle (GO:0010028)	violaxanthin de-epoxidase activity (GO:0046422)	none predicted
BLAST VDE	2731	VDE_L2	Voltage-gated potassium channel	potassium ion transport (GO:0006813) ion transport (GO:0006811) transmembrane transport (GO:0055085)	voltage-gated potassium channel activity (GO:0005249) ion channel activity (GO:0005216) violaxanthin de-epoxidase activity (GO:0046422)	none predicted
BLAST VDEL, VDER	8461		Violaxanthin de-epoxidase	xanthophyll cycle (GO:0010028)	violaxanthin de-epoxidase activity (GO:0046422)	none predicted
BLAST ZE	9064		none predicted	none predicted	oxidoreductase activity (GO:0016491)	none predicted
BLAST ZE	9094		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted
BLAST ZE	11444		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949) protein binding (GO:0005515)	none predicted
BLAST ZE	14436		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted
BLAST ZE	21174		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted
BLAST ZE	25933		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted
BLAST ZE	28055		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted
BLAST ZE	30349	ZE_L	none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted
BLAST ZE	35099		none predicted	none predicted	FAD binding (GO:0071949)	none predicted





---

**Titre :** La photosynthèse et la photoprotection chez *Tisochrysis lutea*, de la synthèse à l'extraction de fucoxanthine.

**Mots clés :** photosynthèse ; photoprotection ; microalgue ; fucoxanthine ; extraction ; purification

**Résumé :** La fucoxanthine est le caroténoïde le plus abondant dans les océans. Elle est produite par les algues brunes, les meilleures productrices étant les microalgues. Parmi eux, la microalgue haptophyte *Tisochrysis lutea* est connue pour sa forte teneur en fucoxanthine. Dans les cellules de mammifères, ce pigment a des propriétés anticancéreuses, antidiabétiques, anti-inflammatoires, etc. Le potentiel de la fucoxanthine en tant que nutraceutique et en tant que molécule bioactive en pharmacologie est donc intéressant. Cette thèse porte dans un premier temps sur l'étude expérimentale de l'antenne collectrice de lumière et des gènes de la photosynthèse et de la photoprotection chez *T. lutea*.

Puis, l'influence de l'irradiance et des nutriments sur la bioproduction de fucoxanthine ont été étudiés à différentes échelles. Enfin, une approche des techniques d'extraction et de purification pour la récupération des biomolécules a été proposée, dans le respect des principes de la chimie verte et d'éco-conception. La dernière partie de la thèse intègre à la production de biomasse le développement d'une méthode d'extraction de pigments de *T. lutea* avec un solvant vert, suivie du fractionnement et de la purification de la fucoxanthine par chromatographie de partage centrifuge pour atteindre une récupération et une pureté (>99%) élevées de la fucoxanthine.

---

**Title :** Photosynthesis and photoprotection in *Tisochrysis lutea*, from synthesis to extraction of fucoxanthin.

**Keywords :** photosynthesis ; photoprotection ; microalgae ; fucoxanthin ; extraction ; purification

**Abstract:** Fucoxanthin is the most abundant carotenoid in the oceans. It is produced by brown algae, the best producers being microalgae. Among them, the haptophyte microalga *Tisochrysis lutea* is known for its high fucoxanthin content. In mammalian cells, this pigment has anti-cancer, anti-diabetic, anti-inflammatory, etc. properties. The potential of fucoxanthin as a nutraceutical and as a bioactive molecule in pharmacology is therefore interesting. This thesis initially focuses on the experimental study of the light-harvesting antenna and the photosynthesis and photoprotection genes in *T. lutea*.

Then, the influence of irradiance and nutrients on the bioproduction of fucoxanthin were studied at different scales. Finally, an approach of extraction and purification techniques for the recovery of biomolecules has been proposed, respecting the principles of green chemistry and eco-design. The last part of the thesis integrates the production of biomass with the development of a method for the extraction of pigments from *T. lutea* with a green solvent, followed by the fractionation and purification of fucoxanthin by centrifugal partition chromatography to achieve a high recovery and purity (>99%) of fucoxanthin.