

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CHANGEMENTS PHYSIOLOGIQUES CHEZ LES MICROALGUES VERTES MENANT
À LA BIOSYNTHÈSE DE CAROTÉNOÏDES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
LOUKA SIROIS

AOÛT 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Notre parcours s'agrémente toujours de rencontres inestimables. L'une d'elles fut pour moi le Dr. Radovan Popovic, mon directeur de recherche certes, mais avant tout mon mentor et ami.

Quoi dire pour qui ne l'a pas connu sur ce professeur peu orthodoxe, qu'il me fut donné de trouver sur les premiers milles de ma route universitaire ? Si parfois les Hommes se ressemblent, Radovan restera à toujours unique ! Persuadé plus que moi-même de mon aptitude pour la recherche, c'est grâce à lui, sans équivoque, que j'en suis venu à l'entreprise et à l'accomplissement d'une maîtrise en sciences de l'environnement. Son enthousiasme pour la recherche est contagieux, et ce mémoire lui est dédié.

Car, d'une façon des plus inattendues, alors que nous attendions ton retour pour festoyer ta guérison, ton départ nous a rappelé à quel point nous avons affaire à un être dévoué, original, enjoué, vaillant, généreux et complice. De tout cela, nous nous rappellerons. J'espère que tu seras content de ce mémoire, et pas trop fâché de là-haut que je n'entreprenne pas de doctorat (!). Merci Radovan, de tout coeur.

Au tour des collègues, collaborateurs et amis de l'Uqàm, tout particulièrement ceux du laboratoire de Pr. Radovan Popovic, du laboratoire de Pr. David Dewez et du laboratoire de Pr. Philippe Juneau. Une mention toute particulière pour M. François Perreault, maintenant docteur, qui par sa patience et sa sagesse m'a permis d'en apprendre beaucoup plus que je n'aurais espéré sur tout ce qui concerne l'expérimentation en laboratoire, technique et théorie confondues. Ce dernier m'a épaulé tout au long de mon travail, toujours disposé à répondre à mes nombreuses questions, tout en m'aidant en ce qui concerne l'utilisation des nombreux appareils du laboratoire. Je lui souhaite une longue et prospère carrière de professeur-chercheur. Également, un grand merci à Dr. Laura Pirastru à Dr.

Abdallah Oukarroum et à Dr. David Dewez, qui ont partagé avec moi toute leur expertise sur les microalgues, tout en m'aidant plus que généreusement pour différentes analyses. Olivier, Cyril, Mashid, Latcho, Lotfi, Luc, Annie et Charles : merci de votre constant soutien, vos différentes personnalités m'ont inspiré tout au long de mon parcours, et je vous souhaite tout le meilleur pour les années à venir.

Non les moindres ici, je tiens à remercier de tout cœur mes parents, Roseline et Marc, grâce à qui cette aventure a su trouver aboutissement. Leur soutien, sous plus d'une forme, m'a toujours aidé à progresser, tant dans les moments plus aisés que ceux plus ardues. C'est grâce à vous si j'ai su persévérer. Un clin d'œil à ma sœur Émie, que j'aime tant, et à ma chère Mine (Yvette Sirois). Enfin, comment passer sous silence celle qui m'a enduré, chaque jour ou presque, dans cette belle aventure : je veux parler de Sophie, ma perle du nord de France.

Enfin, je tiens à mentionner qu'à l'Uqàm, j'ai bénéficié d'aide ou d'assistance de la part de nombreuses personnes, particulièrement au département de Chimie/Biochimie et au sein de l'Institut des Sciences de l'Environnement. Mention spéciale à Charlotte et Benoît (magasin de chimie), pour leur aide précieuse lors de certains projets.

Nunc est bibendum!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I	
MICROALGUES : PRÉSENTATION ET APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES.....	4
1.1 Introduction.....	4
1.2 Présentation générale des microalgues	4
1.3 Classification et distribution	6
1.4 Nutriments.....	8
1.5 Les microalgues vertes.....	9
1.6 Les espèces étudiées	11
1.6.1 <i>Oocystis polymorpha</i>	11
1.6.2 <i>Scenedesmus sp.</i>	12
1.7 Les algues et l'environnement naturel.....	13
1.8 Étude et utilisation des algues.....	14
1.9 Applications biotechnologiques des microalgues	16
1.9.1 Procédé industriel.....	16
1.9.2 Intérêt biotechnologique des pigments (chlorophylles et caroténoïdes)	17
1.9.3 Biocarburants	19
1.9.4 Perspectives.....	20
CHAPITRE II	
PHYSIOLOGIE CELLULAIRE DES MICROALGUES VERTES	22
2.1 Introduction.....	22
2.2 Le cycle cellulaire	22
2.3 Ultrastructure cellulaire	25
2.4 Photosynthèse	28
2.5 Pigments photosynthétiques.....	33

2.5.1 Chlorophylles	35
2.5.2 Caroténoïdes.....	36
2.5.3 Caroténogenèse	39
CHAPITRE III PROBLÉMATIQUE.....	41
CHAPITRE IV APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	43
4.1 Introduction.....	43
4.2 Cultures-mères	43
4.3 Milieux de culture	44
4.4 Préparation des tests - matériel et vaisselle.....	44
4.5 Démarrage d'une série de tests	45
CHAPITRE V LONG-TERM PHYSIOLOGICAL STRESS INDUCED BY NITRATE DEFICIENCY AND SODIUM ACETATE ON CAROTENOGENESIS OF GREEN ALGA <i>OOCYSTIS</i> <i>POLYMORPHA</i>	48
5.1 Abstract.....	49
5.2 Résumé.....	50
5.3 Introduction.....	51
5.4 Materials and methods	53
5.4.1 Culture conditions	53
5.4.2 Cell density, total chlorophylls and carotenoids.....	53
5.4.3 Rapid chlorophyll <i>a</i> fluorescence rise measurements	54
5.4.4 Carotenoids extraction, HPLC separation and mass spectrometry analysis.....	55
5.5 Data analysis and statistics.....	57
5.6 Results and discussion.....	57
5.7 References.....	61
CHAPITRE VI CAROTENOID PRODUCTION AND CHANGE OF PHOTOSYNTHETIC FUNCTIONS IN <i>SCENEDESMUS SP.</i> EXPOSED TO NITROGEN-LIMITATION AND ACETATE TREATMENT	73
6.1 Abstract.....	74
6.2 Résumé.....	75
6.3 Introduction.....	76

6.4 Materials and methods	77
6.4.1 Culture of algal species exposed to physiological stress conditions	77
6.5 Analytical procedures	78
6.5.1 Determination of cell density, total chlorophylls, and total carotenoid content...	78
6.5.2 Fluorescence measurements	79
6.5.3 Carotenoid extraction and HPLC analysis	80
6.6 Results.....	81
6.7 Discussion.....	82
6.8 Conclusion	84
6.9 References.....	85
CHAPITRE VII	
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	95
RÉFÉRENCES	97

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Différences morphologiques entre certaines espèces de microalgues (A, F, H et J = microscopie électronique à balayage; B, C, D, E, G, I, K et L = microscopie optique; bar 10 µm) (d'après Bélair <i>et al.</i> , 2012).....	5
1.2 Différentes organisations morphologiques chez les algues vertes (d'après Pröschold et Leliaert, 2007).....	10
1.3 Photo en microscopie optique d' <i>Oocystis polymorpha</i> . La plus grande des deux cellules avoisine les 20 µm (photo de l'auteur).....	12
1.4 Photo en microscopie optique de <i>Scenedesmus</i> . (prise sur le site www.msu.edu/course/bot/423/AlgalMaster.html , consulté en janvier 2013).....	13
1.5 Schéma d'intégration des applications des microalgues (d'après Bélair, 2012).....	16
2.1 Le cycle cellulaire (d'après Taiz et Zeiger, 2006 (A) et Raven <i>et al.</i> , 2000 (B)).....	23
2.2 Différents types de mitoses-cytokinèses chez les algues vertes (d'après Pröschold et Leliaert, 2007; consulter pour détails).....	24
2.3 Structure cellulaire d'une microalgue (<i>Chlamydomonas</i> , une algue « rat de laboratoire ») et détail du chloroplaste (d'après Bélair <i>et al.</i> , 2012).....	26
2.4 (A) Micrographie électronique d'un chloroplaste d'une feuille de <i>Phleum pratense</i> (18 000x) (B) la même préparation à un agrandissement supérieur (52 000x) (d'après Taiz et Zeiger, 2006).....	27
2.5 Les deux phases de la photosynthèse selon l'expérience de Arnon, Allen et Whatley (d'après Walker, 1993).....	29
2.6 La membrane du thylacoïde, lieu du transport photosynthétique des électrons (d'après Walker, 1993).....	30
2.7 Schéma détaillant un photosystème II (PSII) (d'après Walker, 1993).....	31
2.8 Le schéma en Z (« Z-scheme ») (d'après Govindjee et Govindjee, 2000).....	31
2.9 Les quatre voies de dissipation de l'énergie de l'état singulet excité de la chlorophylle (¹ Chl ¹) du PSII. L'énergie est utilisée soit pour la photochimie (1), dissipée sous forme de chaleur (2), réémise sous forme de fluorescence (3) ou elle produit des espèces réactives de l'oxygène (4) (d'après Müller <i>et al.</i> , 2004).....	32

2.10 Structures chimiques des molécules de chlorophylles (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).....	35
2.11 Spectres d'absorption de différents pigments (tiré de http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/Zsuite/2Photosynthese/4Pigments/1Pigments.htm , consulté en janvier 2013).....	36
2.12 Structure chimique du β -carotène et des xanthophylles astaxanthine et lutéine, les principaux caroténoïdes microalgaux présentant un intérêt commercial (d'après Del Campo <i>et al.</i> , 2007).....	37
2.13 Détail de la structure chimique du β -carotène et de la lutéine (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).....	37
2.14 Représentation des structures chimiques d'autres caroténoïdes importants (d'après Scheer, 2004).....	38
2.15 Voies métaboliques pour la synthèse des caroténoïdes [<i>psy</i> (phytoène synthétase); <i>pds</i> (phytoène désaturase); <i>Crtiso</i> (caroténoïde isomérase); <i>lyc-β</i> (lycopène cyclase β); <i>lyc-ϵ</i> (lycopène cyclase ϵ); <i>bhy</i> (β -carotène hydroxylase); <i>Z ep</i> (Zéaxanthine époxidase); <i>Vdep</i> (Violaxanthine déépoxydase); <i>bkt</i> (β -carotène kétolase)] (d'après Rosa <i>et al.</i> , 2007).....	40
4.1 Photos en microscopie optique (400x) de cellules d' <i>Oocystis polymorpha</i> au début de l'expérience (en haut; bar = 20 μ m) et après 42 jours de privation en nitrates (en bas; bar = 50 μ m) (photos de l'auteur).....	46
4.2 Production de caroténoïdes microbiens en conditions contrôlées – différentes colorations des tests sur <i>Oocystis polymorpha</i> vers la fin de l'expérience (photo de l'auteur).....	47
5.1 A) Green cells (mature culture) of <i>Oocystis polymorpha</i> in BBM media, optical microscopy 400x. B) Orange cells of <i>Oocystis polymorpha</i> in BBM-N media, after 42 days, optical microscopy 400x.....	64
5.2 A) Change of cell density during 42 days for <i>Oocystis polymorpha</i> . Control in BBM media (\blacklozenge); in BBM-N media (nitrate starvation) (\blacksquare); in BBM-N media with sodium acetate of 6 mM (\blacktriangle), 30 mM (x), 60 mM (\times) and 90 mM (o). B) Change of biomass growth (dry weight in g/l).....	65
5.3 A) Change of total chlorophyll content (pg/cell) during 42 days for <i>Oocystis polymorpha</i> . Control in BBM media (clear bar); in BBM-N media (nitrate starvation) (grey bar); in BBM-N media with sodium acetate of 6 mM (more points bar), 30 mM (less points bar), 60 mM (oblique bar) and 90 mM (waved bar). B) Change of total carotenoids content (pg/cell) during 42 days for <i>Oocystis polymorpha</i>	66

5.4 Change of carotenoids pigment astaxanthin, canthaxanthin, lutein and β -caroten by HPLC analysis for <i>Oocystis polymorpha</i> , during 42 days.....	67-68
5.5 Fluorescence change (rapid kinetic) for <i>Oocystis polymorpha</i> measured with PEA. Kinetics normalized by O fluorescence level. Control in BBM media (\blacklozenge); in BBM-N media (nitrate starvation) (\blacksquare); in BBM-N media with sodium acetate of 6 mM (\blacktriangle), 30 mM (x), 60 mM (ж) and 90 mM (o). A) at day 1, B) at day 22, C) at day 42.....	69-70
5.6 Change of the PSII P.I. during 42 days under different conditions.....	71
5.7 The production of ROS for <i>Oocystis polymorpha</i> during 42 days.....	72
6.1 Visual appearance of <i>Scenedesmus sp.</i> cultures exposed 18 days to different treatments: 1 (-N, -Acetate); 2 (+N, +6 mM Acetate); 3 (+N, +60 mM Acetate); 4 (+N, +120 mM Acetate); 5 (+N, -Acetate); 6 (-N, +6 mM Acetate); 7 (-N, +60 mM Acetate); 8 (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM.....	89
6.2 Carotenoids content in <i>Scenedesmus sp.</i> exposed to 120 mM sodium acetate and 4.5 mM N for 18 days compared to control sample. Chromatogram of carotenoids was generated by HPLC-UV/VIS monitored at 450 nm. Carotenoids are indicated by numbers: (1) Astaxanthin, (1') Astaxanthin isomer, (2) Lutein, (3) Canthaxanthin, (4) β -Apo-8'-carotenal (Internal Standard), (5) β -carotene.....	90
6.3 The change of cell density and ratio carotenoid/chlorophyll in cultures of <i>Scenedesmus sp.</i> following 18 days of exposure to different treatments: x (-N, -Acetate); \square (+N, -Acetate); Δ (-N, +6 mM Acetate); \diamond (-N, +60 mM Acetate); \square (-N, +120 mM Acetate); \blacktriangle (+N, +6 mM Acetate); \blacklozenge (+N, +60 mM Acetate); \blacksquare (+N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM.....	91
6.4 Modulated fluorescence kinetics of <i>Scenedesmus sp.</i> cultures following 18 days of exposure to different treatments: A (-N, -Acetate); B (+N, -Acetate); C (+N, +120 mM Acetate); D (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM.....	92
6.5 The change of Φ_{MII} and $\Delta P700$ of <i>Scenedesmus sp.</i> cultures exposed during 18 days to different concentrations of acetate. +N: \bullet (+N, -Acetate); \blacklozenge (+N, +6 mM Acetate); \blacksquare (+N, +60 mM Acetate); \square (+N, +120 mM Acetate); -N: \bullet (-N, -Acetate); \blacklozenge (-N, +6 mM Acetate); \blacksquare (-N, +60 mM Acetate); \square (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM. During all treatments light irradiance was the same (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).....	93

- 6.6 The change of Φ'_{MII} , qP and NPQ of *Scenedesmus sp.* cultures exposed during 18 days to different concentrations of acetate. +N: ● (+N, - Acetate); ◆ (+N, +6 mM Acetate); ■ (+N, +60 mM Acetate); □ (+N, +120 mM Acetate); -N: ● (-N, - Acetate); ◆ (-N, +6 mM Acetate); ■ (-N, +60 mM Acetate); □ (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM. During all treatments light irradiance was the same ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)..... 94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Classification des différentes divisions algales (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).....	7
1.2 Distribution des différentes divisions algales (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).....	8
1.3 Classification des nutriments minéraux des végétaux en lien avec leur fonction biochimique (d'après Taiz et Zeiger, 2006).....	9
2.1 Les principaux pigments, produits de réserve et types d'enveloppes cellulaires des différentes divisions d'algues (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).....	34

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Chl	Chlorophylle
CO ₂	Dioxyde de carbone
F _M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité
F' _M	Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue
F _o	Fluorescence de base
F' _o	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans le rouge lointain (735 nm)
F _s	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F _v	Fluorescence variable
F _{50μs}	Intensité de fluorescence à 50 μs
F _{2ms}	Intensité de fluorescence à 2 ms
F _{30ms}	Intensité de fluorescence à 30 ms
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MeOH	Methanol
MTBE	Methyl tert-butyl-ether
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NPQ	Quenching non photochimique
O ₂	Oxygène moléculaire
PAM	<i>Pulse-Amplitude-Modulated</i>
PEA	<i>Plant Efficiency Analyser</i>
Pi	Phosphore inorganique
P.I.	Performance Index (photochimie du PSII)
PSII	Photosystème II
PSI	Photosystème I

P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
Q _A	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
qP	Quenching photochimique
RC/ABS	Ratio entre le nombre de centres réactionnels actifs du PSII et la valeur relative de l'absorption de la lumière par les antennes chlorophylliennes
ROS	Reactive oxygen species
SPE	Solid phase extraction
VJ	Valeur relative de la fluorescence variable de la chlorophylle <i>a</i> à la transition J (JIP - test)
Φ _{MII}	Rendement photochimique maximal du PSII

RÉSUMÉ

Les microalgues, en plus de jouer quelques rôles fondamentaux en lien avec la biosphère (oxygène atmosphérique, base des chaînes trophiques marines et d'eau douce, cycles biogéochimiques) ont la capacité de synthétiser, sous certaines conditions, des molécules d'intérêt (caroténoïdes, biocarburants). Étant rapidement renouvelable, la biomasse algale pourrait fournir de nombreux bioproduits pour des applications de nutrition, de nutraceutique, de cosmétique et dans le domaine énergétique. Dans le présent travail, deux espèces de microalgues vertes, *Oocystis polymorpha* et *Scenedesmus sp.* ont été examinées en fonction de leur habileté à synthétiser des caroténoïdes secondaires (issus d'un métabolisme de protection). Via diverses analyses, la physiologie de ces microalgues a pu être étudiée en regard de la caroténogenèse, provoquée en laboratoire sous l'effet de stress environnementaux dans les cultures. Les stress en question sont un appauvrissement en nitrates (azote), l'addition d'acétate de sodium et une intensité lumineuse continue plus élevée que celle utilisée pour maintenir normalement les cultures. Les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques (un publié et un en préparation d'être soumis) constituant les chapitres V et VI. En somme, les microalgues présentent un fort potentiel pour le futur dans le domaine des biotechnologies.

Mots-clefs : Microalgues, caroténoïdes, pigments, photosynthèse, biotechnologies, *Oocystis polymorpha*, *Scenedesmus sp.*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'environnement naturel représente une immense source d'où l'être humain peut puiser certains produits, certaines molécules de grand intérêt. En étudiant divers organismes de différents règnes, des découvertes surviennent qui s'avèrent tantôt bénéfiques, ou parfois dangereuses, pour notre existence et celle d'autres espèces vivantes.

Le présent projet de recherche, s'inscrivant dans le domaine des « biotechnologies », utilise les microalgues vertes comme organismes de choix dans la production de certaines substances recherchées pour des aspects de santé, humaine et animale. Vu l'énorme biodiversité des microalgues et les développements récents en génétique, ce groupe d'organismes constitue l'une des plus prometteuses sources de nouveaux produits et d'applications écologiques (Pulz et Gross, 2004; Harun *et al.* 2010). En ce qui concerne le présent travail, l'expérimentation en laboratoire s'est beaucoup orientée vers la production de caroténoïdes par les espèces de microalgues *Scenedesmus sp.*¹ et *Oocystis polymorpha*.

Plus spécifiquement, les produits recherchés dans le présent projet sont des caroténoïdes, surtout secondaires (astaxanthine), qui sont synthétisés par des microalgues vertes en réponse à des stress environnementaux. Ces molécules constituent en outre de puissants antioxydants. L'astaxanthine et la cantaxanthine sont, d'un point de vue biotechnologique, les caroténoïdes les plus importants (Margalith, 1999). En plus de leur rôle comme colorants alimentaires naturels utilisés surtout en aquaculture, des études en nutrition ont démontré leur effet positif quant à la prise en charge des radicaux libres, quant à l'immunomodulation et en lien avec la prévention de cancers et autres maladies (Margalith, 1999; Del Campo *et al.*, 2004). D'autres caroténoïdes sont aussi intéressants à obtenir, notamment la lutéine. Bien qu'à ce jour la majeure partie de la lutéine sur le marché

¹ L'espèce n'a pu être clairement identifiée, le genre s'apparentant visuellement à *Chlorella* d'abord, puis à *Scenedesmus* après analyse. Il ne s'agit pas de cellules "classiques" de *Scenedesmus* (comme sur la figure 1.4). L'identification a été menée par le "Canadian Phycological Culture Center, University of Waterloo".

provienne de la fleur de *Marigold oleoresin*, plusieurs espèces de microalgues en ont un contenu plus élevé, en plus d'offrir un rendement des centaines de fois supérieur par mètre carré (Fernandez-Sevilla *et al.*, 2010).

Bien que le focus soit mis ici sur la production de caroténoïdes secondaires, les microalgues peuvent synthétiser plusieurs molécules d'intérêt, dont des biocarburants, des polysaccharides ou d'autres pigments.

Pour réaliser l'article scientifique principal de ce mémoire, la microalgue *Oocystis polymorpha* a été sélectionnée, de même que certains traitements à l'acétate de sodium, menant à la formation de caroténoïdes (caroténogénèse). Ce processus survient lorsque l'algue, en réponse aux stress environnementaux imposés (par exemple modification du milieu de culture et haute intensité lumineuse), modifie son activité physiologique et métabolique pour se prémunir de dommages que peuvent causer de tels stress.

Afin de suivre les effets des traitements sur *Oocystis polymorpha* au niveau physiologique, différentes analyses ont été menées dans le temps : comptage cellulaire, détermination du poids sec (matière sèche), contenu en pigments (chlorophylles et caroténoïdes), espèces réactives de l'oxygène, mesures de fluorescence chlorophyllienne, photos en microscopie pour montrer l'aspect visuel de la cellule (particulièrement au tout début et à la fin de l'expérience d'une durée de 42 jours). Il a été ainsi possible d'examiner, d'un côté plus fondamental, les changements qui surviennent au sein de l'algue lorsqu'elle modifie son activité normale pour synthétiser des caroténoïdes, molécules de protection.

Le premier chapitre présente les microalgues, ce qu'elles sont en tant qu'organismes ainsi que les applications biotechnologiques qu'on en fait. Sur ce dernier point, l'attention est surtout portée sur la biosynthèse de caroténoïdes. Le deuxième chapitre présente des aspects physiologiques des microalgues, à savoir le cycle cellulaire, l'ultrastructure de l'organisme, la photosynthèse et les pigments photosynthétiques. La problématique, abordée au chapitre 3, explicite les objectifs de la recherche. Il est question au chapitre 4 d'aspects méthodologiques. Le chapitre 5 présente l'article principal du mémoire : « Long-term

physiological stress induced by nitrate deficiency and sodium acetate on carotenogenesis of green alga *Oocystis polymorpha* ». Le chapitre 6 est dédié à un second article : « Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus sp.* exposed to nitrogen-limitation and acetate treatment ». Enfin, une conclusion générale est présentée en chapitre 7.

CHAPITRE I

MICROALGUES : PRÉSENTATION ET APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES

1.1 INTRODUCTION

Afin de mieux connaître le matériel biologique avec lequel furent accomplies les expériences pour le présent travail, il s'avère de mise d'en faire la présentation (structure, organisation, principales fonctions, applications biotechnologiques que l'on en fait). Le chapitre qui s'amorce vise à accomplir cette tâche.

1.2 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES MICROALGUES

On regroupe sous le terme « microalgues » les algues microscopiques et les cyanobactéries, couramment (quoiqu'à tort) appelées « algues bleu-vert ». Ces dernières sont des organismes photosynthétiques procaryotes (bactéries effectuant la photosynthèse), alors que les microalgues à proprement parler sont des organismes photosynthétiques eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés. Le terme phytoplancton s'avère plus juste lorsqu'il est question à la fois d'algues et de cyanobactéries. Dans l'environnement naturel, les algues peuvent coloniser les eaux douces ou marines, mais aussi le sol ou de simples surfaces humides, en autant que la lumière y parvienne. On en retrouve même près des sources hydrothermales, et elles peuvent coloniser la neige et les couverts de glace (Bélair *et al.*, 2012).

Une très grande diversité existe chez les microalgues, ce qui se reflète par une panoplie de formes, de grosseurs et d'arrangements des cellules. La présence ou non de flagelles peut caractériser certaines espèces : à cet effet durant leur stade motile, la plupart

des algues possèdent deux ou plusieurs flagelles, bien que quelques lignées aient perdu cette caractéristique soit d'un coup dès le début de leur évolution (Rhodophyta), soit en plusieurs séquences durant leur évolution (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) (Bhattacharya et Medlin, 1998). Aussi, les différentes thèques (plaques rigides de cellulose incrustée de silice) que produisent les diatomées, permettent d'en distinguer les différentes espèces. En somme on peut retrouver les algues sous forme unicellulaire microscopique, en arrangements macroscopiques lâches (« loose ») ou en films, en colonies tapissées ou en branches, ou encore en formes plus complexes de feuilles et de lames (Barsanti et Gualtieri, 2006).

On peut voir sur la figure 1.1 différentes morphologies de certaines espèces de microalgues.

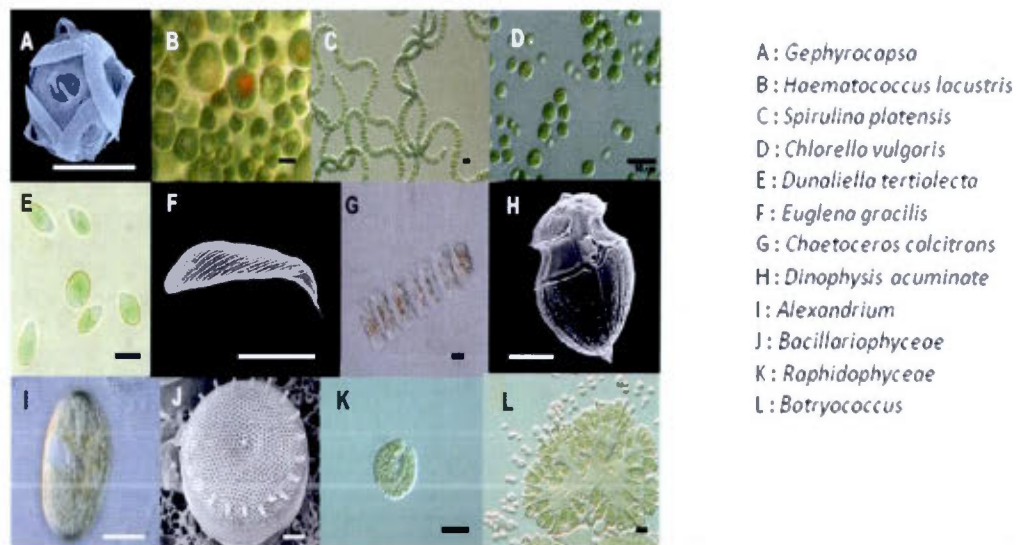


Figure 1.1 : Différences morphologiques entre certaines espèces de microalgues (A, F, H et J = microscopie électronique à balayage; B, C, D, E, G, I, K et L = microscopie optique; bar 10 μ m) (d'après Bélair *et al*, 2012).

Les principales lignées chez les algues sont les Chlorophyta (algues vertes), Rhodophyta (algues rouges), Glaucocystophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Haptophyta, Heterokonta, Cryptophyta et les dinoflagellés (Alveolata), aussi on regroupe sous l'appellation « chromophytes » les quatre derniers groupes en raison de leur contenu en chlorophylles *a* et *c* et de leurs xanthophylles variés leur donnant une apparence jaune ou brune (Bhattacharya et Medlin, 1998).

1.3 CLASSIFICATION ET DISTRIBUTION

Il y aurait dans l'environnement naturel entre 200 000 et plusieurs millions d'espèces de microalgues (Cadoret et Bernard, 2008; ARVAM, 2012). Le tableau 1.1 montre la classification générale des différentes divisions et classes de microalgues (incluant les Procaryotes). Fait à noter, la microalgue *Oocystis* utilisée dans le présent projet de recherche fait usuellement partie de la division des Chlorophyta, classe des Trebouxiophyceae, mais est parfois intégrée à même les Chlorophyceae (comme dans le tableau 1.1). Des études récentes au niveau moléculaire ont démontré l'aspect polyphylétique des genres entre les Chlorophyceae et les Trebouxiophyceae (Bock *et al.*, 2011). La classification des algues vertes est un sujet de plusieurs publications, spécialement dans le contexte de l'origine des plantes terrestres, et demeure un élément de controverse (Pröschold et Leliaert, 2007).

Tableau 1.1 : Classification des différentes divisions algales (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).

Kingdom	Division	Class		
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae		
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae		
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae		
	Rhodophyta	Bangiophyceae Florideophyceae		
	Heterokontophyta	Heterokontophyta	Chrysophyceae	
			Xanthophyceae	
			Eustigmatophyceae	
			Bacillariophyceae	
			Raphidophyceae	
			Dictyochophyceae	
			Phaeophyceae	
			Haptophyta	Haptophyceae
			Cryptophyta	Cryptophyceae
			Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae		
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae		
	Chlorophyta	Chlorophyta	Prasinophyceae	
			Chlorophyceae	
			Ulvophyceae	
			Cladophorophyceae	
			Bryopsidophyceae	
			Zygnematophyceae	
Trentepohliophyceae				
Klebsormidiophyceae				
Charophyceae				
Dasycladophyceae				

En plus de se présenter sous plusieurs arrangements cellulaires différents et de posséder divers cycles de vie, les algues colonisent une multitude d'habitats (Bhattacharya et Medlin, 1998). Les algues peuvent être aquatiques, retrouvées presque partout dans les sources d'eau fraîches jusque dans les eaux salées (avec une tolérance pour une large gamme de pH, température, turbidité et concentration d'O₂ et de CO₂) ou subaériennes (exposées à l'atmosphère plutôt que submergées). Elles peuvent être planctoniques (comme la plupart des espèces unicellulaires) ou benthiques (vivant sur ou dans les sédiments); les algues benthiques peuvent se retrouver attachées sur la pierre (épilithiques), sur le sable ou la boue (épipéliques), sur d'autres algues ou plantes (épiphytiques) ou sur des animaux (épizoïques) (Barsanti et Gualtieri, 2006). Le tableau 1.2 donne une vue d'ensemble de la distribution des

microalgues dans l'environnement. On constate que la plupart des groupes possèdent des représentants marins, d'eau douce, terrestres et pouvant vivre en symbiose avec un autre organisme.

Tableau 1.2 : Distribution des différentes divisions algales (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).

Division	Common Name	Habitat			
		Marine	Freshwater	Terrestrial	Symbiotic
Cyanophyta	Blue-green algae	Yes	Yes	Yes	Yes
Prochlorophyta	n.a.	Yes	n.d.	n.d.	Yes
Glaucophyta	n.a.	n.d.	Yes	Yes	Yes
Rhodophyta	Red algae	Yes	Yes	Yes	Yes
Heterokontophyta	Golden algae	Yes	Yes	Yes	Yes
	Yellow-green algae				
	Diatoms				
	Brown algae				
Haptophyta	Coccolithophorids	Yes	Yes	Yes	Yes
Cryptophyta	Cryptomonads	Yes	Yes	n.d.	Yes
Chlorarachniophyta	n.a.	Yes	n.d.	n.d.	Yes
Dinophyta	Dinoflagellates	Yes	Yes	n.d.	Yes
Euglenophyta	Euglenoids	Yes	Yes	Yes	Yes
Chlorophyta	Green algae	Yes	Yes	Yes	Yes

Note: n.a., not available; n.d., not detected.

1.4 NUTRIMENTS

Tout comme les plantes supérieures, les microalgues ont besoin de certains nutriments essentiels pour leur métabolisme. Les éléments minéraux essentiels sont classés en macronutriments ou micronutriments, en fonction de leur concentration relative dans les tissus végétaux (Taiz et Zeiger, 2006). En laboratoire, les algues sont en conséquence cultivées dans différents milieux de culture contenant diverses solutions nutritives (sels, métaux, vitamines). Pour la plupart des cultures d'algues, l'azote sous forme de nitrates, les phosphates, le magnésium, le calcium et le potassium représentent les macronutriments de

base. Le tableau 1.3 montre les quatre principaux groupes de nutriments (et leurs éléments respectifs) selon leur fonction dans la cellule.

Tableau 1.3 : Classification des nutriments minéraux des végétaux en lien avec leur fonction biochimique (d'après Taiz et Zeiger, 2006).

Mineral nutrient	Functions
Group 1	Nutrients that are part of carbon compounds
N	Constituent of amino acids, amides, proteins, nucleic acids, nucleotides, coenzymes, hexoamines, etc.
S	Component of cysteine, cystine, methionine, and proteins. Constituent of lipoic acid, coenzyme A, thiamine pyrophosphate, glutathione, biotin, adenosine-5'-phosphosulfate, and 3-phosphoadenosine.
Group 2	Nutrients that are important in energy storage or structural integrity
P	Component of sugar phosphates, nucleic acids, nucleotides, coenzymes, phospholipids, phytic acid, etc. Has a key role in reactions that involve ATP.
Si	Deposited as amorphous silica in cell walls. Contributes to cell wall mechanical properties, including rigidity and elasticity.
B	Complexes with mannitol, mannan, polymannuronic acid, and other constituents of cell walls. Involved in cell elongation and nucleic acid metabolism.
Group 3	Nutrients that remain in ionic form
K	Required as a cofactor for more than 40 enzymes. Principal cation in establishing cell turgor and maintaining cell electroneutrality.
Ca	Constituent of the middle lamella of cell walls. Required as a cofactor by some enzymes involved in the hydrolysis of ATP and phospholipids. Acts as a second messenger in metabolic regulation.
Mg	Required by many enzymes involved in phosphate transfer. Constituent of the chlorophyll molecule.
Cl	Required for the photosynthetic reactions involved in O ₂ evolution.
Mn	Required for activity of some dehydrogenases, decarboxylases, kinases, oxidases, and peroxidases. Involved with other cation-activated enzymes and photosynthetic O ₂ evolution.
Na	Involved with the regeneration of phosphoenolpyruvate in C ₄ and CAM plants. Substitutes for potassium in some functions.
Group 4	Nutrients that are involved in redox reactions
Fe	Constituent of cytochromes and nonheme iron proteins involved in photosynthesis, N ₂ fixation, and respiration.
Zn	Constituent of alcohol dehydrogenase, glutamic dehydrogenase, carbonic anhydrase, etc.
Cu	Component of ascorbic acid oxidase, tyrosinase, monoamine oxidase, uricase, cytochrome oxidase, phenolase, laccase, and plastocyanin.
Ni	Constituent of urease. In N ₂ -fixing bacteria, constituent of hydrogenases.
Mo	Constituent of nitrogenase, nitrate reductase, and xanthine dehydrogenase.

1.5 LES MICROALGUES VERTES

Les algues vertes (Chlorophyta) sont des organismes eucaryotes photosynthétiques caractérisés par la présence de chloroplastes contenant deux enveloppes membranaires, des thylakoïdes empilés (grana) et des chlorophylles *a* et *b*. Toutes les algues vertes produisent de l'amidon comme réserve principale de polysaccharides, s'accumulant dans les plastides

(Pröschold et Leliaert, 2007). Les plastides sont des organites cellulaires des végétaux contenant souvent un pigment ou de la nourriture.

Bien que les différentes espèces ne les possèdent pas toutes, on peut résumer les principales composantes des microalgues vertes à un noyau bien défini, une paroi cellulaire, des chloroplastes contenant chlorophylles et autres pigments, des pyrénoides, une région contenant en surface une forte densité de grains d'amidon, des stigma et des flagelles (Singh et Sharma, 2012). À propos, le stigma est une tache orangée agissant comme photorécepteur, sorte d'œil primitif qui réagit à la lumière pour guider la cellule dans ses déplacements.

Chez les organismes eucaryotes, les algues vertes représentent l'un des groupes les plus diversifiés. Il est possible de les retrouver en différentes symbioses (lichens, protozoaires, foraminifères) ou comme parasites des plantes tropicales, et il est estimé y avoir au moins 600 genres et 10 000 espèces d'algues vertes existantes (Pröschold et Leliaert, 2007). Une hypothèse suggère que les algues vertes soient à l'origine des plantes supérieures. Phylogénétiquement, les plantes sont de toute évidence un groupe d'algues adaptées à la vie sur terre (Barsanti et Gualtieri, 2006). On peut voir sur la figure 1.2 certaines morphologies cellulaires des algues vertes.

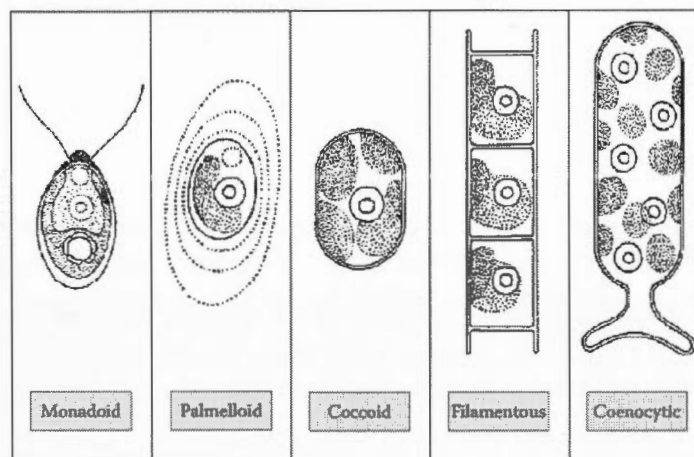


Figure 1.2 : Différentes organisations morphologiques chez les algues vertes (d'après Pröschold et Leliaert, 2007).

Il y a présence chez les algues vertes de reproduction asexuée et sexuée, bien que de manière générale la reproduction asexuée domine (reproduction végétative ou division cellulaire, production d'une descendance identique à l'unique parent). Lors de la division cellulaire, une cellule forme deux « cellules-filles » identiques, deux cellules forment quatre cellules et ainsi de suite, menant à une prolifération typique d'une population d'algues. Les microalgues qui pour leur part usent de reproduction sexuée occasionnent des échanges génétiques, ce qui permet de maintenir une certaine variation au sein de la population (Blackburn et Parker, 2005). Le cycle cellulaire est présenté au chapitre 2.

1.6 LES ESPÈCES ÉTUDIÉES

Les deux principales espèces étudiées dans le présent travail (voir articles) sont *Oocystis polymorpha* et *Scenedesmus sp.*, deux microalgues vertes. La littérature fait certes état de recherches concernant *Scenedesmus*, notamment au niveau de la production de biocarburants, mais en ce qui concerne *Oocystis* la recherche se fait plutôt rare, d'où un aspect original du projet.

1.6.1 *Oocystis polymorpha*

Division Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae ou Chlorophyceae, ordre Chlorococcales, famille Oocystaceae.

Les espèces appartenant au genre *Oocystis*, retrouvées dans plusieurs plans d'eau, sont particulièrement communes dans le plancton des petits lacs et des étangs, et peuvent aussi se retrouver dans des habitats terrestres (Stoyneva *et al.*, 2007). Selon ce même auteur, la taxonomie actuelle de la majorité des taxa pour *Oocystis* est problématique et demande une révision. Les travaux de Hepperle *et al.* (2000) démontrent que les Oocystaceae sont une lignée des Trebouxiophyceae. Les Oocystaceae, de formes plus ou moins sphérique,

ellipsoïdale ou en fuseau, sont caractérisées par des parois cellulaires composées de plusieurs couches, et plus encore par le fait que la direction des fibrilles de cellulose dans chaque couche est perpendiculaire à celle des couches adjacentes (Hepperle *et al.*, 2000).

L'espèce *Oocystis polymorpha* a été isolée pour la première fois par le Dr. Richard L. Miller (USAF School of Aerospace Medicine, Brooks Air Force Base, Texas) et s'est avérée être au départ un contaminant remarqué dans un échangeur de gaz photosynthétique d'une culture de *Chlorella sorokiniana* (Groover et Bold, 1968). L'aspect d'*O. polymorpha* est présenté à la figure 1.3.

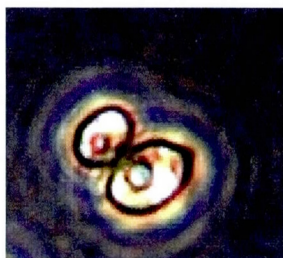


Figure 1.3 : Photo en microscopie optique d'*Oocystis polymorpha*. La plus grosse des deux cellules avoisine les 20 μm (photo de l'auteur).

1.6.2 *Scenedesmus* sp.

Division Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordre Chlorococcales, famille Scenedesmaceae.

Comprenant des centaines d'espèces, *Scenedesmus* est l'un des genres d'algues d'eau douce les plus répandus. Les cellules de *Scenedesmus* se présentent généralement en rangées de 2, 4 ou 8 cellules (ce nombre peut atteindre 12 ou 16, très rarement plus), et la colonie « typique » de 4 cellules s'organise ainsi : les deux cellules du milieu sont ovales ou plutôt

carrées alors que les cellules des extrémités possèdent des épines et peuvent se présenter sous la forme de croissants (Wong, 2012). *Scenedesmus* est planctonique, flottant dans la colonne d'eau ou est attachée au périphyton.



Figure 1.4: Photo en microscopie optique de *Scenedesmus*. (prise sur le site www.msu.edu/course/bot/423/AlgalMaster.html, consulté en janvier 2013).

1.7 LES ALGUES ET L'ENVIRONNEMENT NATUREL

L'importance des microalgues dans l'environnement est telle qu'elles sont à l'origine de 40 à 50% de l'oxygène de l'atmosphère, en plus d'être indispensables pour la vie marine : les algues sont les seuls producteurs primaires des océans (71% de la surface terrestre) (Andersen, 2005). Les *Bacillariophycinées* (Diatomées), microalgues du phytoplancton, seraient responsables du quart de la production photosynthétique mondiale (Jupin et Lamant, 1999). De façon plus générale, les microalgues jouent un rôle dans les cycles biogéochimiques des lacs et des océans. Leur rôle est crucial dans le cycle du carbone, et elles présentent un potentiel élevé pour la séquestration du CO₂ (Dah-Wei Tsai *et al.*, 2012; Cadoret et Bernard, 2008). Les algues sont également la source originale de carbone fossile retrouvé dans le pétrole brut et le gaz naturel (Andersen, 2005).

Toutefois, les microalgues peuvent être à l'origine de toxines, particulièrement dangereuses en épisodes de fleurs d'eau ou efflorescences (« blooms ») se produisant lors de conditions environnementales et climatiques particulières. Les principales efflorescences toxiques sont dues aux Dinophyta (dinoflagellés) et quelques espèces sont toxiques chez les Haptophyta; aussi les Raphidophyta pouvant produire des efflorescences massives sont susceptibles de mettre en péril les élevages de poissons (Cadoret et Bernard, 2008). Des dizaines parmi les milliers d'espèces d'algues marines microscopiques constituant le phytoplancton peuvent produire des toxines, espèces appartenant aux classes des cyanophycées, dinophycées et diatomées, et ces toxines peuvent induire des symptômes d'irritation cutanée et respiratoire et des intoxications chez l'humain après consommation d'animaux contaminés (poissons, mollusques, crustacés) (ARVAM, 2012). Sans même produire des toxines, les efflorescences d'algues occasionnées par une trop grande concentration de nitrates et de phosphates (pollution) peuvent réduire la transparence de l'eau, causant la mort d'autres organismes photosynthétiques (Barsanti et Gualtieri, 2006).

1.8 ÉTUDE ET UTILISATION DES ALGUES

L'étude et l'utilisation des algues ne datent pas d'hier, encore que leur développement d'un point de vue biotechnologique ne remonte qu'aux années 1950. La première utilisation des microalgues par l'humain remonte à 2000 ans en Chine, où *Nostoc* aida à survivre à la famine (Spolaore *et al.*, 2005). Dès l'an 530, un premier « rapport » quant à l'utilisation de « nori » (*Porphyra*) aurait été fait, et cette espèce, maintenant cultivée depuis 1640, est à la base d'une industrie en Asie qui génère près d'un milliard de dollars U.S. par année (Pulz et Gross, 2004). D'autres exemples historiques pourraient être : l'utilisation des algues brunes durant le 18^e siècle pour l'iode et le soda, l'utilisation par Alfred Nobel de biomasse fossilisée de diatomées dans la confection de la dynamite (adsorption de la nitroglycérine) et, l'une des espèces cultivée de nos jours à grande échelle, la cyanobactérie *Spirulina arthrospira*, était déjà connue de la population aztèque (Pulz et Gross, 2004). Les premières cultures d'algues unicellulaires (avec *Chlorella vulgaris*) ont été

réalisées par Beijerinck en 1890, et l'utilisation de telles cultures pour l'étude de la physiologie végétale a été développée au début des années 1900 par Warburg (Borowitzka, 1999). En somme, plusieurs des méthodes et milieux de culture de base utilisés encore aujourd'hui ont été développés à la fin des années 1800 et au début des années 1900 (Andersen, 2005).

De nos jours, la biotechnologie des microalgues est en émergence, vu tout ce qu'on peut tirer de ces microorganismes : biomasse à des fins de nourriture ou de fourrage, produits extraits de la biomasse incluant des triglycérides qui peuvent être convertis en biodiésel, pigments utilisés dans plusieurs domaines (nutraceutique, cosmétique), etc. Bien qu'en plein développement, ce qui implique que les procédés de production soient économiquement modérément viables, la biotechnologie des microalgues peut s'avérer une voie intéressante pour satisfaire, du moins en partie, à la forte demande industrielle en ce qui concerne nourriture, énergie et pharmacopée (Harun *et al.*, 2010). Qui plus est, certaines problématiques environnementales liées à notre utilisation actuelle des ressources naturelles exigent que nous trouvions des sources alternatives (et plus écologiques) d'approvisionnement. Les microalgues se présentent donc en candidates tout-à-fait légitimes.

L'aspect de santé/nutrition via la production de caroténoïdes par les microalgues est l'épine dorsale de l'actuel projet : un intérêt croissant se présente de nos jours pour des nourritures dites « fonctionnelles », soit apportant des effets bénéfiques supplémentaires pour la santé, et souvent ces nourritures sont des aliments traditionnels enrichis d'un ingrédient, idéalement d'origine naturelle comme des plantes et des microalgues, ingrédient capable d'une action spécifique bénéfique pour la santé (Cerøn *et al.*, 2007). C'est ce qui nous intéresse dans ce projet, et l'ingrédient recherché est caroténoïde.

1.9 APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES MICROALGUES

1.9.1 Procédé industriel

Les microalgues sont utilisées en industrie dans les domaines énergétique, pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique et alimentaire. Sous des conditions spécifiques, ces microorganismes sont en mesure de biosynthétiser des molécules de grand intérêt. La figure 1.5 illustre le procédé industriel général (grande échelle), en passant du système de culture à la production de pâte d'algues jusqu'aux différentes utilisations que l'on peut faire de cette pâte. Outre cette pâte, il est possible de recueillir des algues sous forme d'extraits lyophilisés (poudre) ou d'huiles. Il est à retenir que les expériences menées à l'échelle du laboratoire et la production industrielle d'une biomolécule à partir des microalgues sont deux terrains bien distincts : ce qui se passe sous certaines conditions en erlenmeyers de 125 ml ne se reproduira pas nécessairement dans de plus gros photobioréacteurs.

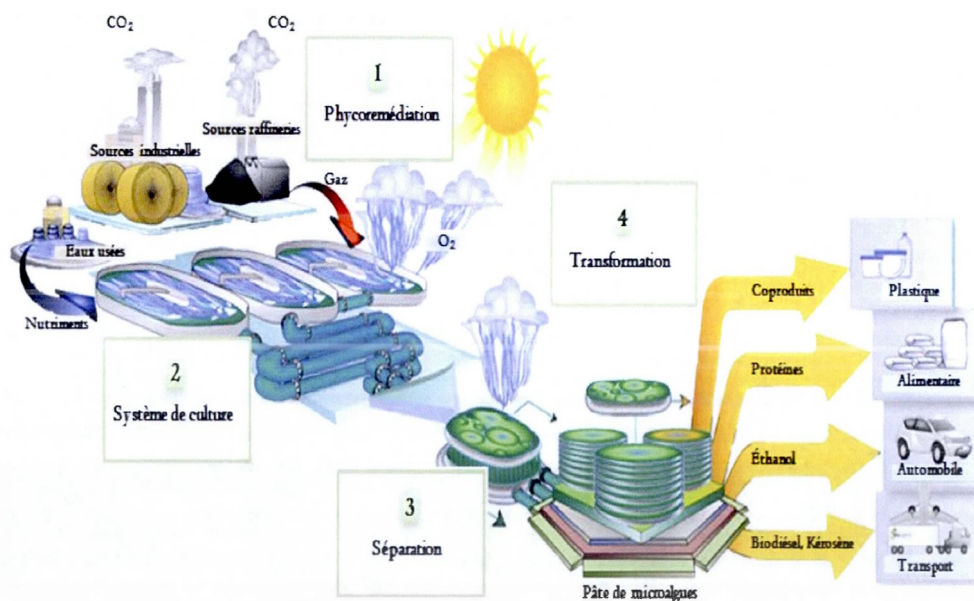


Figure 1.5 : Schéma d'intégration des applications des microalgues (d'après Bélair, 2012).

1.9.2 Intérêt biotechnologique des pigments (chlorophylles et caroténoïdes)

Chlorophylles

Les chlorophylles non modifiées sont trop labiles pour la plupart des applications pratiques, mais quelques dérivés sont utilisés comme colorants pour la nourriture et les cosmétiques, ainsi que pour la thérapie photodynamique de tumeurs (Scheer, 2004). Aussi, la « chlorophylle » utilisée pour certains soins de santé est un mélange complexe de produits de dégradation. La meilleure source de chlorophylle *a*, disponible commercialement, provient de la cyanobactérie *Spirulina platensis* (Scheer, 2004).

Caroténoïdes

Parmi les composés d'intérêt que peuvent synthétiser les microalgues, les caroténoïdes primaires et secondaires en sont d'importants. En faveur de cet énoncé, ces molécules essentielles doivent être puisées dans l'alimentation, les vertébrés n'ayant que la capacité de modifier structurellement les caroténoïdes, et non de les synthétiser (Lemoine et Schoefs, 2010).

En raison de leurs propriétés physicochimiques et leur haute valeur comme ingrédient ajouté, les caroténoïdes sont largement utilisés par les industries à titre de colorant alimentaire « naturel », comme additifs alimentaires pour l'aquaculture, pour la coloration du saumon ou des oeufs dans l'industrie de la volaille, ainsi que dans les cosmétiques et comme ingrédients actifs dans la médecine/pharmaceutique (Lemoine et Schoefs, 2010). De plus, les caroténoïdes sont d'un grand intérêt dans plusieurs disciplines scientifiques en raison de leur vaste distribution, leurs diverses fonctions, et d'intéressantes propriétés; des évidences épidémiologiques et des résultats expérimentaux suggèrent que les caroténoïdes (spécialement l'astaxanthine) dans la diète inhibent la mise en place de plusieurs maladies dans lesquelles des radicaux libres sont suspectés de jouer un rôle dans l'enclenchement, à savoir de l'artériosclérose, de diverses scléroses, des cataractes, de dégénérescences

maculaires liées à l'âge et, non sans reste, de cancers (Bhosale, 2004; Del Campo *et al.*, 2004; Boussiba, 2000; Margalith, 1999). En somme, certains caroténoïdes, particulièrement l'astaxanthine, sont d'excellents agents antioxydants.

Bien qu'il existe des sources naturelles et synthétiques de caroténoïdes, un regain d'intérêt voit le jour pour ceux provenant de microorganismes, le grand public étant plus soucieux envers les ajouts alimentaires synthétiques, et aussi en raison de la disponibilité d'une source alternative de ces molécules via les microalgues (Bhosale, 2004). Qui plus est, la production de caroténoïdes de sources « microbiennes » (microalgues, levures²) fait l'objet de plusieurs recherches et a un grand potentiel industriel et de marché, vu la grande demande commerciale pour plusieurs types de caroténoïdes, et aussi en raison du fait que des sous-produits issus de la synthèse chimique de telles molécules peuvent avoir des effets indésirables pour la consommation (Bhosale, 2004). Afin d'illustrer l'importance de marché des caroténoïdes, la lutéine, en grande partie consommée à des fins de colorant alimentaire, génère aux États-Unis des ventes annuelles de 150 millions de dollars (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010).

Astaxanthine

Plus spécifiquement, certains caroténoïdes secondaires représentent un grand intérêt, et l'astaxanthine trône parmi les molécules à haute valeur que peuvent produire les microalgues (pour une bonne description sur d'autres pigments de valeur comme la cantaxanthine et la lutéine consulter Ralley *et al.*, 2004). L'astaxanthine, un caroténoïde à haute valeur pour diverses applications, est disponible commercialement en tant que supplément alimentaire antioxydant (approuvé par le « Swedish Health Food Council Advisory Board ») et est produit à l'échelle industrielle (outre par l'industrie chimique), surtout par la microalgue *Haematococcus pluvialis* (Cerøn *et al.*, 2007).

² *Xanthophyllomyces dendrohous* (Wang et Chen, 2008).

L'astaxanthine montre un pouvoir antioxydant plus élevé que le β -carotène (10 fois plus) et que le α -tocophérol (plus de 500 fois) (Lemoine et Schoefs, 2010; Cerøn *et al.*, 2007). L'astaxanthine, proposé comme étant la supervitamine E, a une dose recommandée dans la nutrition de 4 mg/jour (Cerøn *et al.*, 2007). Parmi les fonctions biologiques essentielles que procure l'astaxanthine, notons la protection contre des dommages à l'ADN, contre les effets des rayons ultraviolets et contre la peroxydation des membranes lipidiques des acides gras polyinsaturés essentiels et des protéines (Cerøn *et al.*, 2007). Pour une revue des effets de l'astaxanthine sur la santé humaine, consulter l'article de Guerin *et al.*, 2003.

L'astaxanthine d'origine naturelle est donc un composé recherché, et *Haematococcus pluvialis* est à ce jour la souche algale la plus étudiée et utilisée pour la production industrielle. Toutefois, bien que réalisable, sa production à grande échelle n'est pas aisée, pour des raisons physiologiques et techniques : faible taux de croissance, température pour la croissance relativement basse, cultures propices à la contamination, apparence de la nécessité d'une culture en deux étapes (Del Campo *et al.*, 2004). Tout cela fait en sorte d'augmenter les coûts de production, ce qui fait que l'astaxanthine d'*Haematococcus* ne peut rivaliser, au niveau du prix, avec les pigments d'origine synthétiques (Del Campo *et al.*, 2004). Or les avis semblent partagés sur ce point, comme le laisse voir Guerin *et al.* (2003).

1.9.3 Biocarburants

L'un des principaux secteurs de recherche concernant les microalgues est celui de l'énergie et des biocarburants. Certaines espèces et certains genres de microalgues sont actuellement étudiés comme producteurs de biodiésel, bioéthanol et biohydrogène (Singh et Sharma, 2012). Parmi ces genres, *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.* présentent un bon potentiel (Makareviciene *et al.*, 2011). Les microalgues ont l'avantage sur ce point de ne pas compétitionner avec les cultures alimentaires (Tadashi *et al.*, 2009).

Le biodiésel est fait d'huiles végétales et de gras animal (triglycérides). Pour pouvoir remplacer les énergies fossiles conventionnelles, la production de biodiésel doit montrer les

caractéristiques suivantes : (1) posséder une matière de base suffisante pour produire du carburant à l'échelle commerciale; (2) s'offrir à moindre coût que les énergies conventionnelles; (3) rejoindre les standards sur la qualité du carburant. Les microalgues ont donc le potentiel d'être utilisées comme matériel de base pour la production de biodiésel, comme elles présentent un fort taux de croissance et sont en mesure de fournir les lipides nécessaires à la production de biodiésel, lipides qui pourraient s'avérer un remplacement aux énergies fossiles (Harun *et al.*, 2010).

1.9.4 Perspectives

Les microalgues ont le potentiel de synthétiser une grande variété de produits en raison de leurs fortes teneurs naturelles en protéines, lipides, glucides, vitamines, pigments et contenu enzymatique (Harun *et al.*, 2010). Même s'il est impressionnant de voir tout ce que l'on peut tirer des microalgues, un problème subsiste quant à l'échelle de la commercialisation des produits. À ce jour, l'industrie des algues est concentrée autour d'un nombre limité de produits, comme ceux de spécialité à faible volume/haute valeur, mais il serait envisageable de poursuivre en parallèle ce type d'industrie et l'industrie à plus grande échelle de la production de biocarburants : il s'agit du concept de « bioraffinerie », tel qu'illustré par Foley *et al.* (2011).

Pour l'avenir, plusieurs aspects devront être résolus à l'échelle commerciale, dont une certaine inertie de l'industrie et le statut légal des caroténoïdes provenant des microalgues (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010). Aussi, la production à l'échelle industrielle se heurte souvent à de trop faibles rendements. Des recherches futures devraient tendre vers l'amélioration des systèmes de production et vers la modification génétique des souches : les produits issus des microalgues deviendraient ainsi plus diversifiés et économiquement plus compétitifs (Spolaore *et al.*, 2006).

Le secteur biotechnologique verrait donc avantage à trouver de nouvelles espèces algales offrant le meilleur compromis productivité/croissance, ainsi qu'à optimiser les coûts de production pour optimiser la culture de ces microorganismes (ARVAM, 2012).

CHAPITRE II

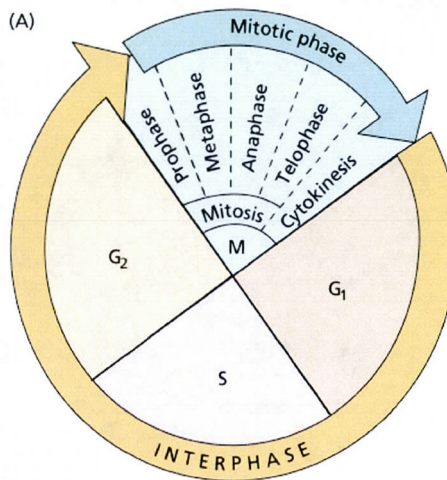
PHYSIOLOGIE CELLULAIRE DES MICROALGUES VERTES

2.1 INTRODUCTION

Le chapitre qui débute illustre certains aspects de la physiologie cellulaire des microalgues vertes : cycle cellulaire, ultrastructure de la cellule, et photosynthèse. Aussi, les chlorophylles et les caroténoïdes sont analysés d'un point de vue structurel et fonctionnel. Cela aura pour conséquence une meilleure compréhension du fonctionnement de la cellule végétale ainsi que des processus biochimiques ayant cours durant les changements physiologiques cellulaires.

2.2 LE CYCLE CELLULAIRE

Les cellules eucaryotes qui se divisent passent par une séquence d'étapes : c'est le cycle cellulaire. La figure 2.1 illustre ce cycle, alors que la figure 2.2 s'attarde plus spécifiquement à illustrer la mitose chez certaines espèces d'algues vertes.



(B) Définition des phases :

G₁ : le volume de la cellule double, augmentation du nombre d'organites, d'enzymes et autres molécules.

S : réplication de l'ADN et synthèse des protéines associées → il existe maintenant deux exemplaires de l'information génétique cellulaire.

G₂ : début de l'assemblage des structures nécessaires à la division cellulaire, les chromosomes commencent à se condenser.

M (Mitotic phase) : les deux lots de chromosomes se séparent (mitose) et la cellule se divise (cytokinèse).

Fig. 2.1 : Le cycle cellulaire (d'après Taiz et Zeiger, 2006 (A) et Raven *et al.*, 2000 (B)).

Le cycle cellulaire est habituellement divisé en une interphase précédant la mitose, l'interphase étant elle-même divisée en trois stades, représentés par G₁, S et G₂ (définis en B à la figure 2.1). L'achèvement du cycle est d'une durée variable, soit de quelques heures à plusieurs jours, dépendamment du type de cellule et des facteurs externes tels que les éléments nutritifs disponibles et la température (Raven *et al.*, 2000).

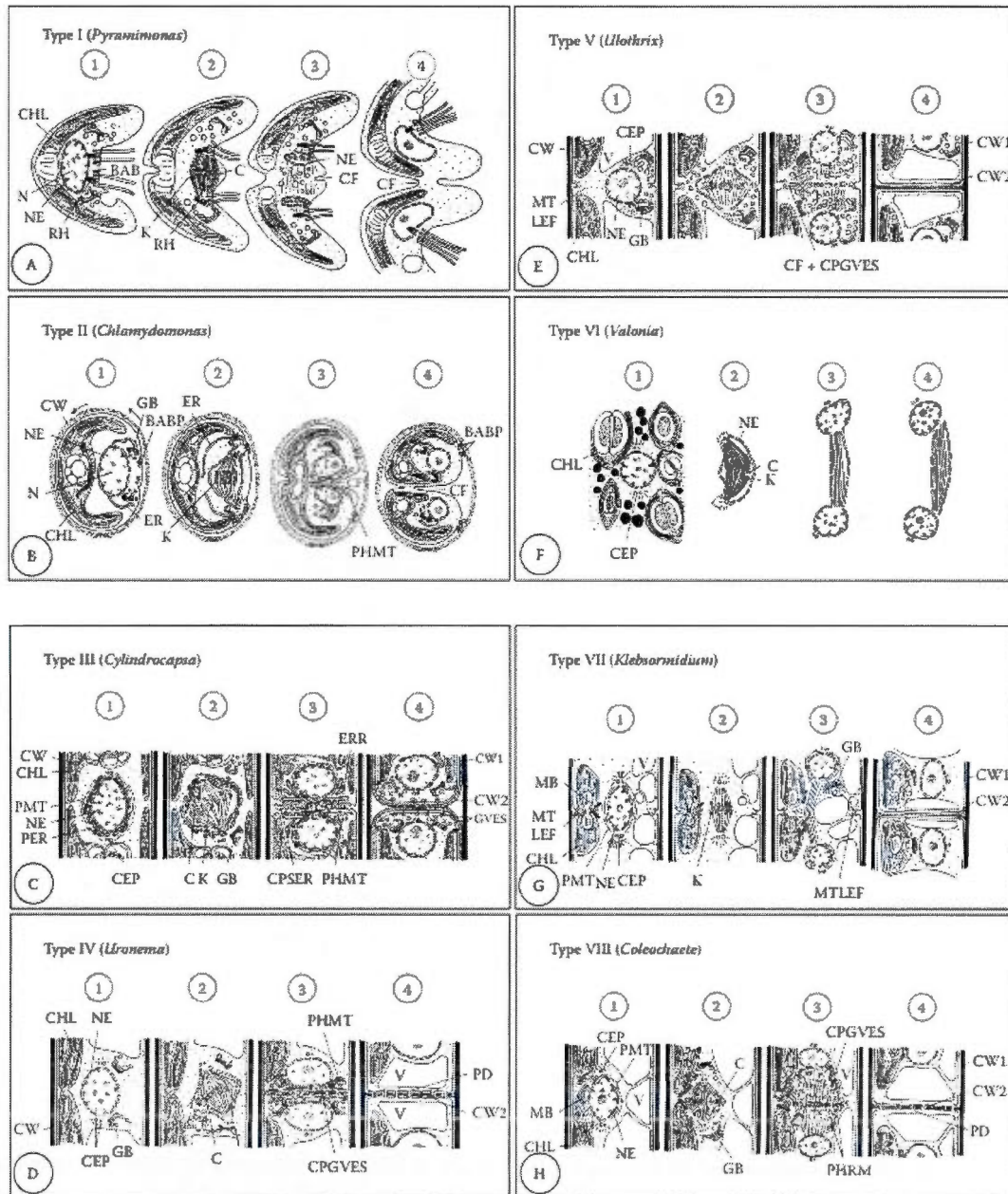


Figure 2.2 : Différents types de mitoses-cytocinèses chez les algues vertes (d'après Pröschold et Leliaert, 2007; consulter pour détails).

2.3 ULTRASTRUCTURE CELLULAIRE

Chaque cellule d'algue possède une paroi cellulaire, le plus souvent composée de cellulose. Une exception cependant pour le groupe des Euglènes (Euglenophyta), qui ne possèdent pas de paroi rigide, ce qui occasionne lors de leurs déplacements un mouvement caractéristique nommé « mouvement euglénoïde ». Seuls les organismes eucaryotes possèdent un noyau. Les organelles responsables de la photosynthèse sont les chloroplastes (contenant les thylacoïdes), alors que les mitochondries sont affectées à la respiration cellulaire et à la récupération d'ATP. Une autre particularité concernant les Euglènes est qu'elles peuvent perdre leurs chloroplastes et générer des individus dépigmentés hétérotrophes (*Peranema*), très semblables aux protozoaires flagellés. Présent chez certaines espèces d'algues unicellulaires mobiles (*Chlamydomonas*, Euglènes), le stigma (tache photoréceptrice orangée) permet à la cellule de se diriger. Enfin, les flagelles peuvent être soit absents, présents uniquement sur les spores ou présents en permanence (*Chlamydomonas*, Euglènes) sur la cellule algale.

La cellule de *Chlamydomonas* a été choisie afin d'illustrer les principales structures de la cellule algale (figure 2.3), puisqu'elle s'avère un bon modèle général de même qu'une algue fortement utilisée dans les laboratoires de recherche, particulièrement en toxicologie. Dans cette partie seront présentées certaines structures cellulaires importantes surtout au niveau de la photosynthèse (chloroplaste, thylacoïde), alors que la photosynthèse en tant que telle sera abordée plus en détail dans la section suivante.

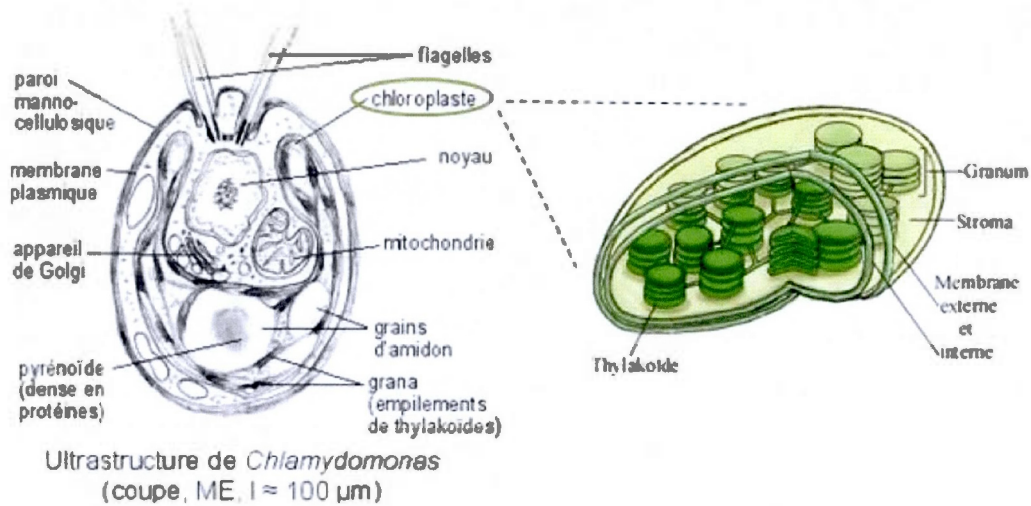


Figure 2.3 : Structure cellulaire d'une microalgue (*Chlamydomonas*, une algue « rat de laboratoire ») et détail du chloroplaste (d'après Bélair *et al.*, 2012).

Le chloroplaste

Le chloroplaste est caractérisé par la présence de pigments photosynthétiques et une structure lamellaire spéciale formée par les thylacoïdes. Les différentes phases primaires du processus photosynthétique se déroulent seulement dans les chloroplastes, soit de la capture des photons à la conversion de l'énergie moléculaire des pigments excités en énergie chimique jusqu'à la synthèse de l'ATP; ce dernier composé peut être transporté hors du chloroplaste ou transformé sur place en polymères glucidiques insolubles constituant l'amidon, qui s'accumule dans le chloroplaste (Farineau et Morot-Gaudry, 2006). Capable d'effectuer seul une part de ses synthèses protéiques, lipidiques et glucidiques, le chloroplaste est un organe semi-autonome constitué d'un complexe membranaire très architecturé. Son action est d'intervenir dans la photosynthèse, mais aussi dans de nombreux autres phénomènes métaboliques (Jupin et Lamant, 1999).

Le chloroplaste est limité structurellement par une « enveloppe » formée de deux membranes presque appliquées l'une contre l'autre, enveloppe contenant une substance ressemblant au cytoplasme : le stroma. Le stroma contient des grains d'amidon, des globules lipidiques, des acides nucléiques (ADN et ARN), de nombreux ribosomes (plastoribosomes) et surtout un réseau de membranes constituant la paroi des thylacoïdes. Les systèmes membranaires que sont les thylacoïdes sont généralement disposés suivant le grand axe du chloroplaste, et on peut distinguer les empilements d'une dizaine de thylacoïdes (grana) des lamelles intergranaires reliant ces grana entre eux (Jupin et Lamant, 1999).

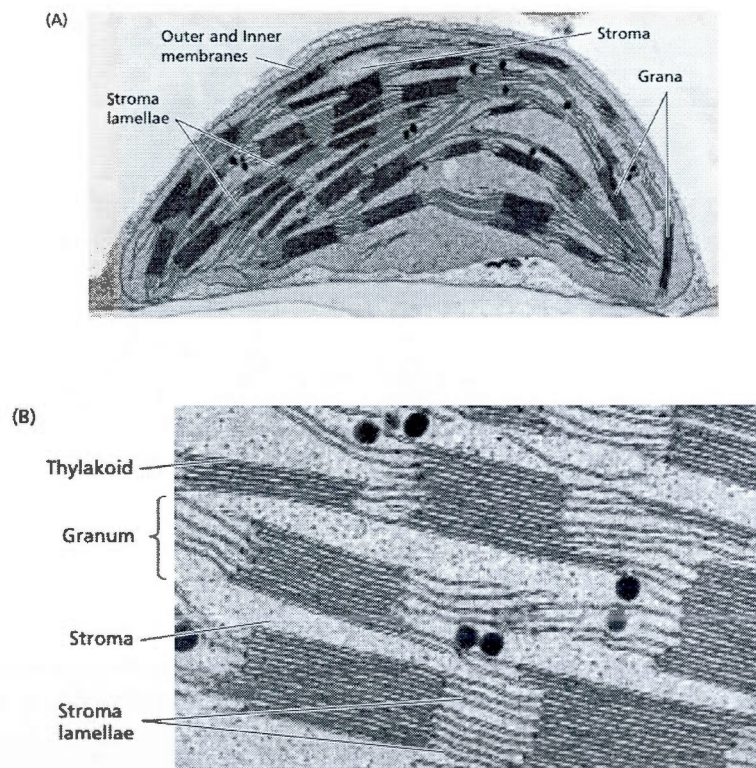


Figure 2.4 : (A) Micrographie électronique d'un chloroplaste d'une feuille de *Phleum pratense* (18 000x) (B) la même préparation à une magnification supérieure (52 000x) (d'après Taiz et Zeiger, 2006).

2.4 PHOTOSYNTHÈSE

On appelle photosynthèse le processus par lequel les plantes, les algues et les organismes procaryotes utilisent directement l'énergie de la lumière pour synthétiser des composés organiques. Tout en fournissant de la nourriture, de la biomasse et des combustibles fossiles, la photosynthèse est à l'origine d'un important sous-produit : l'oxygène requis pour la respiration par tous les organismes multicellulaires et plusieurs organismes unicellulaires (Buchanan *et al.*, 2001). L'équation générale de la photosynthèse oxygénique peut être représentée, au plus simple, par (Barsanti et Gualtieri, 2006) :



où $(\text{CH}_2\text{O})_n$ représente le carbone organique. (La formule chimique de base des glucides est $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Le processus biologique appelé photosynthèse (*phôtos*, lumière et *sunthesis*, réunion, composition) daterait d'au moins 3,8 milliards d'années (Brack et Mathis, 2000). Bien que son objectif puisse paraître simple, à savoir le développement d'organismes vivants à partir de l'énergie de la lumière et de molécules simples, une machinerie enzymatique complexe est mise en œuvre pour y parvenir. En somme, la photosynthèse consiste d'une part en une complexe série de réactions impliquant l'absorption de la lumière, la conversion d'énergie, le transfert d'électrons, et d'autre part une séquence enzymatique convertissant l'eau et le dioxyde de carbone (en plusieurs étapes) en sucres simples (« carbohydrates » ou biochimiquement nommés saccharides) (Buchanan *et al.*, 2001).

L'ensemble des réactions de la photosynthèse se divise en deux phases, ayant cours dans le chloroplaste : la phase lumineuse, dépendante du concours de la lumière et la phase biochimique ou « obscure », indépendante de la lumière. La phase lumineuse implique les réactions photochimiques à l'origine de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, réactions liées au transport d'électrons et de protons menant à la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) et de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate); la phase biochimique représente l'ensemble des réactions liées au cycle de Calvin, où l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la transformation du CO_2 en glucides (Blankenship, 2002).

La figure 2.5, tirée de l'expérience de Arnon, Allen et Whatley (Walker, 1993), démontre la séparation de la photosynthèse en ces deux phases photochimique (« light ») et biochimique (« dark »). D'une part, l'illumination des thylacoïdes mène à la formation d'ATP et de NADPH_2 (à gauche sur la figure), alors que les enzymes du chloroplaste utilisent, à l'obscurité, l'ATP et le NADPH_2 pour réduire le CO_2 en CH_2O .

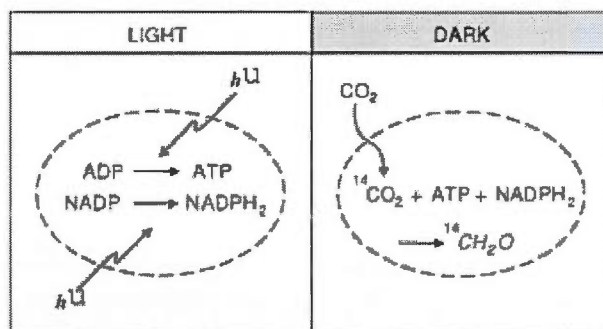


Figure 2.5 : Les deux phases de la photosynthèse selon l'expérience de Arnon, Allen et Whatley (d'après Walker, 1993).

La membrane du thylacoïde, où s'effectue le transport des électrons photosynthétiques engendrant le gradient de protons, est détaillée à la figure 2.6. Les antennes collectrices de lumière (« light harvesting chlorophyll protein ») dirigent, à la manière d'entonnoir, l'énergie d'excitation jusqu'au centre réactionnel du photosystème II (PSII), P_{680} . Ce dernier redirige les électrons vers Q_A , puis les électrons passent par la plastoquinone et le cytochrome b_6/f jusqu'au P_{700} , le centre réactionnel du photosystème I (PSI). L'énergie d'excitation du PSI redirige ensuite les électrons vers l'accepteur primaire du PSI, un complexe de protéines fer-soufre, avant que les électrons soient renvoyés, via la ferrédoxine, au NADP. Le transport d'électrons crée un gradient de protons (H^+) dans la membrane du thylacoïde qui se « décharge » via l'ATPsynthétase (CF_1 et CF_0 sur la figure 2.6), ce qui génère de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) (Walker, 1993).

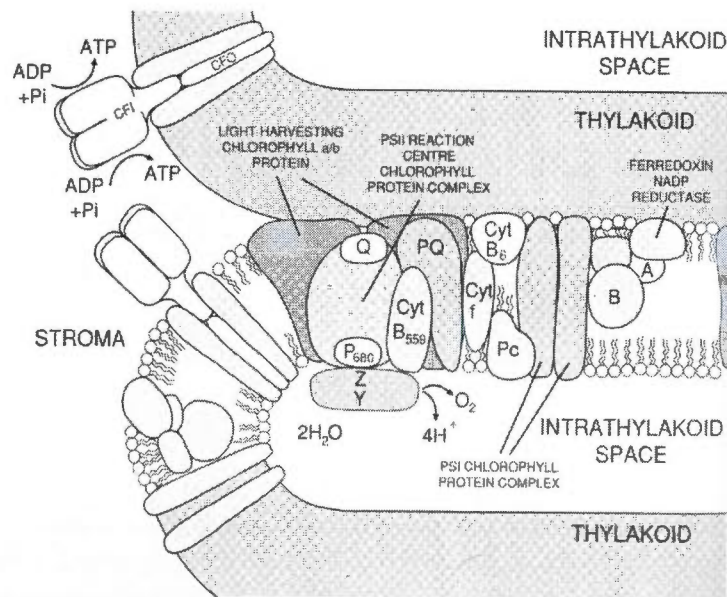


Figure 2.6 : La membrane du thylacoïde, lieu du transport photosynthétique des électrons (d'après Walker, 1993).

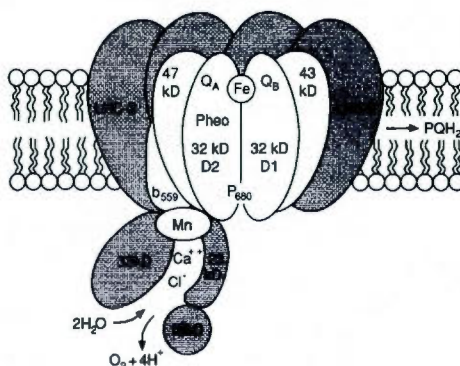


Figure 2.7 : Schéma détaillant un photosystème II (PSII) (d'après Walker, 1993).

Lorsque les molécules acceptent ou donnent un électron, cela implique de l'énergie. Le schéma en Z (« Z-scheme », fig. 2.8) illustre le transfert d'électrons ayant lieu lors des réactions photochimiques en tenant compte des niveaux d'énergie impliqués.

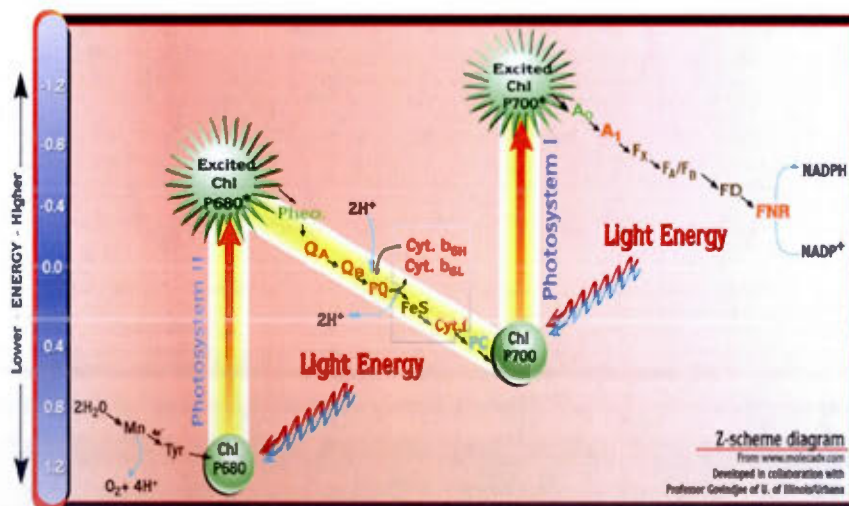


Figure 2.8 : Le schéma en Z (« Z-scheme ») (d'après Govindjee et Govindjee, 2000).

Les voies de dissipation de l'énergie

Il arrive que l'énergie arrive au centre réactionnel du PSII en trop grande quantité (par exemple lors de fortes intensités d'excitation lumineuse), et le donneur d'électron ne peut pas évacuer la charge vers un accepteur : l'énergie reçue est alors perdue essentiellement sous forme de chaleur et de fluorescence (Farineau et Morot-Gaudry, 2006). Cette fluorescence chlorophyllienne est utilisée notamment en écotoxicologie pour examiner l'état de l'appareil photosynthétique suite à diverses expérimentations en laboratoire. Strasser et Strasser ont formulé en 1995 un groupe de paramètres (« JIP-test ») pour l'étude de la fluorescence chlorophyllienne et qui sont discutés dans Force *et al.* (2003). L'analyse de la fluorescence chlorophyllienne est à ce jour l'une des plus puissantes et populaires techniques pour les écophysiolgistes et les physiologistes traitant des végétaux (Maxwell et Johnson, 2000). La figure 2.9 illustre les quatre voies de dissipation de l'énergie.

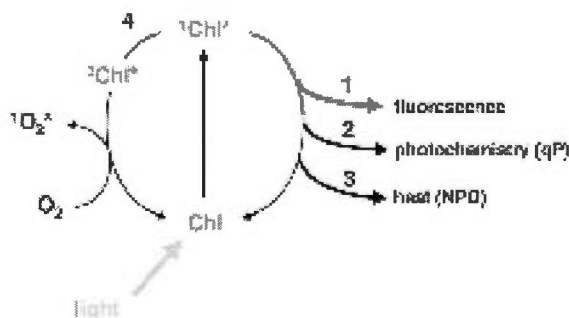


Figure 2.9 : Les quatre voies de dissipation de l'énergie de l'état singulet excité de la chlorophylle ($^1\text{Chl}^*$) du PSII. L'énergie est utilisée soit pour la photochimie (1), dissipée sous forme de chaleur (2), réémise sous forme de fluorescence (3) ou elle produit des espèces réactives de l'oxygène (4) (Müller *et al.*, 2004).

Le principe d'émission de la fluorescence

La fluorescence chlorophyllienne est due à la dé-excitation du premier état singulet des molécules de chlorophylle *a*. La chlorophylle *b* n'émet pas de fluorescence car son énergie d'excitation est très rapidement et efficacement transmise à la chlorophylle *a*. Il est admis que la fluorescence chlorophyllienne est émise surtout (environ 90%) à partir des complexes chlorophylliens du PSII (Roháček *et al.*, 2008, Popovic *et al.*, 2003), et elle représente seulement de 2 à 5% de l'énergie absorbée (Roháček *et al.*, 2008).

2.5 PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES

Nous nous intéresserons principalement aux pigments photosynthétiques. On y distingue trois types à savoir les chlorophylles, les caroténoïdes (ces deux types présents chez tous les végétaux autotrophes au carbone) et les phycobilines (exclusivement chez les algues et les cyanobactéries).

Un pigment est une substance absorbant la lumière visible, et le pigment possède la couleur des radiations qu'il n'absorbe pas (Jupin et Lamant, 1999). Ainsi, les chlorophylles nous apparaissent de couleur verte et les caroténoïdes de couleurs jaune, orange et rouge, alors que les phycobilines apparaissent bleues ou rouges. Les phycobilines sont des chromophores présents uniquement chez les cyanophytes, glaucophytes, cryptophytes et rhodophytes (algues rouges). Le tableau 2.1 présente les principaux pigments, produits de réserve et types d'enveloppes cellulaires des différentes divisions d'algues.

Tableau 2.1 : Les principaux pigments, produits de réserve et types d'enveloppes cellulaires des différentes divisions d'algues (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).

Division	Pigments				Storage Products
	Chlorophylls	Phycobilins	Carotenoids	Xanthophylls	
Cyanophyta	<i>a</i>	<i>c</i> -Phycoerythrin <i>c</i> -Phycocyanin Allophycocyanin Phycoerythrocyanin	β -Carotene	Myxoxanthin Zeaxanthin	Cyanophycin (argine and asparagine polymer) Cyanophycean starch (α -1,4-glucan)
Prochlorophyta	<i>a, b</i>	Absent	β -Carotene	Zeaxanthin	Cyanophycean starch (α -1, 4-glucan)
Glaucophyta	<i>a</i>	<i>c</i> -Phycocyanin Allophycocyanin	β -Carotene	Zeaxanthin	Starch (α -1,4-glucan)
Rhodophyta	<i>a</i>	<i>r, b</i> -Phycoerythrin <i>r</i> -Phycocyanin Allophycocyanin	α - and β -Carotene	Lutein	Floridean starch (α -1,4-glucan)
Cryptophyta	<i>a, c</i>	Phycoerythrin-545 <i>r</i> -Phycocyanin	α -, β -, and ϵ -Carotene	Alloxanthin	Starch (α -1,4-glucan)
Heterokontophyta	<i>a, c</i>	Absent	α -, β -, and ϵ -Carotene	Fucoxanthin, Violaxanthin	Chrysolaminaran (β -1,3-glucan)
Haptophyta	<i>a, c</i>	Absent	α - and β -Carotene	Fucoxanthin	Chrysolaminaran (β -1,3-glucan)
Dinophyta	<i>a, b, c</i>	Absent	β -Carotene	Peridinin, Fucoxanthin, Diadinoxanthin Dinoxanthin Gyroxanthin	Starch (α -1,4-glucan)
Euglenophyta	<i>a, b</i>	Absent	β - and γ -Carotene	Diadinoxanthin	Paramylon (β -1,3-glucan)
Chlorarachniophyta	<i>a, b</i>	Absent	Absent	Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin	Paramylon (β -1,3-glucan)
Chlorophyta	<i>a, b</i>	Absent	α -, β -, and γ -Carotene	Lutein Prasincoxanthin	Starch (α -1,4-glucan)

2.5.1 Chlorophylles

Les chlorophylles sont des molécules à structure cyclique, comportant un atome central de magnésium et quatre cycles pyrroles, d'où leur appellation de molécules tétrapyrroliques où chaque cycle pyrrole est formé de quatre atomes de carbone et d'un atome d'azote (Brack et Mathis, 2000). Elles jouent un rôle de premier plan dans la photosynthèse. La plupart des chlorophylles, tant en termes de quantité que de diversité structurale, servent à collecter la lumière (Scheer, 2004). Les deux figures qui suivent montrent respectivement la structure de la molécule de chlorophylle et les spectres d'absorption de différents pigments photosynthétiques.

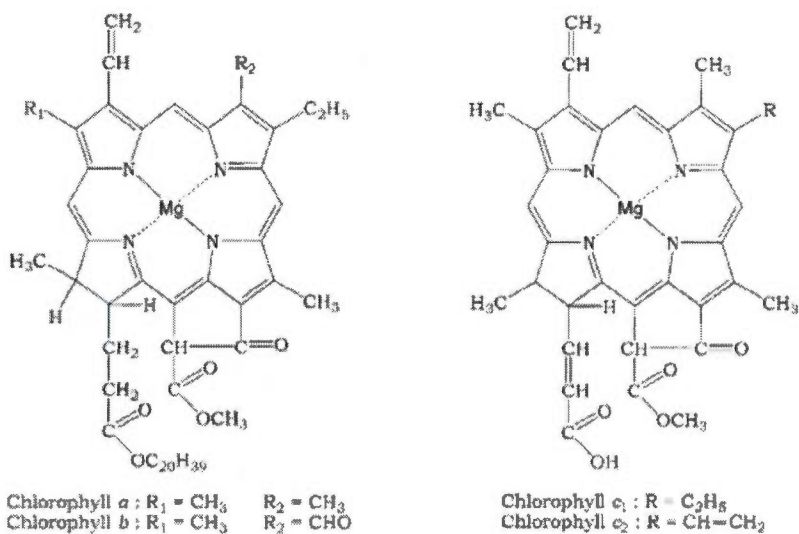


Figure 2.10 : Structures chimiques des molécules de chlorophylles (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).

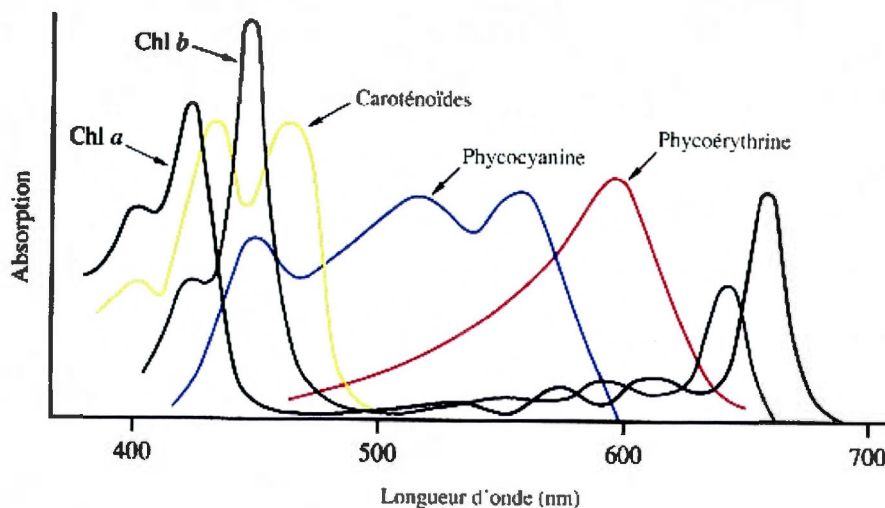


Figure 2.11 : Spectres d'absorption de différents pigments (tiré de <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/Zsuite/2Photosynthese/4Pigments/1Pigments.htm>, consulté en janvier 2013).

2.5.2 Caroténoïdes

Dans la photosynthèse, les caroténoïdes jouent plusieurs rôles essentiels : ils contribuent à la collecte de l'énergie lumineuse, maintiennent la structure et la fonctionnalité des complexes photosynthétiques, s'occupent des espèces réactives de l'oxygène et des états triplets de la chlorophylle (lorsque deux des électrons de la molécule de chlorophylle ont leur moment magnétique en parallèle) et dissipent l'excès d'énergie (Del Campo *et al.*, 2007).

Les caroténoïdes sont des polyènes, c'est-à-dire qu'ils comportent un arrangement linéaire de doubles-liaisons conjuguées. Présent chez tous les organismes effectuant la photosynthèse oxygénique, le β -carotène est le caroténoïde le plus ubiquitaire, alors que d'autres caroténoïdes comportent des substituants variés (notamment des groupements hydroxyles (-OH)); la fonction essentielle des caroténoïdes est d'agir à titre d'agents protecteurs, empêchant la formation dans les thylacoïdes des espèces réactives de l'oxygène (Brack et Mathis, 2000). Notamment, l'oxygène singulet est très réactif et peut causer

d'importants dommages à l'organisme (Peterman *et al.*, 1995). Les structures chimiques des principaux caroténoïdes sont présentées dans les figures suivantes.

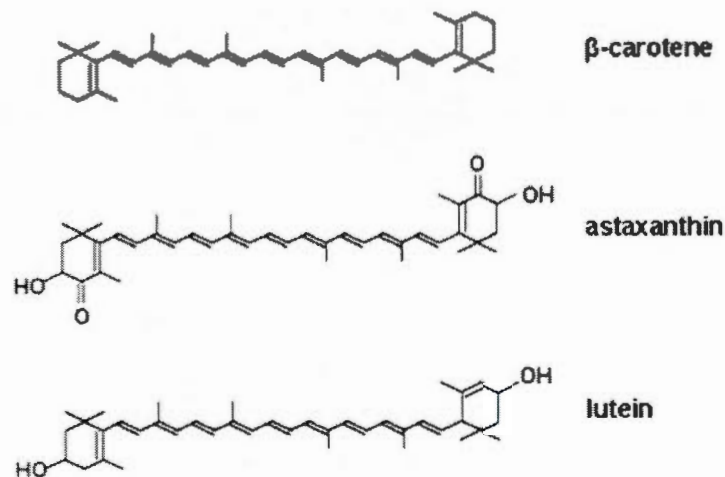


Figure 2.12 : Structure chimique du β -carotène et des xanthophylles astaxanthine et lutéine, les principaux caroténoïdes microalgaux présentant un intérêt commercial (d'après Del Campo *et al.*, 2007).

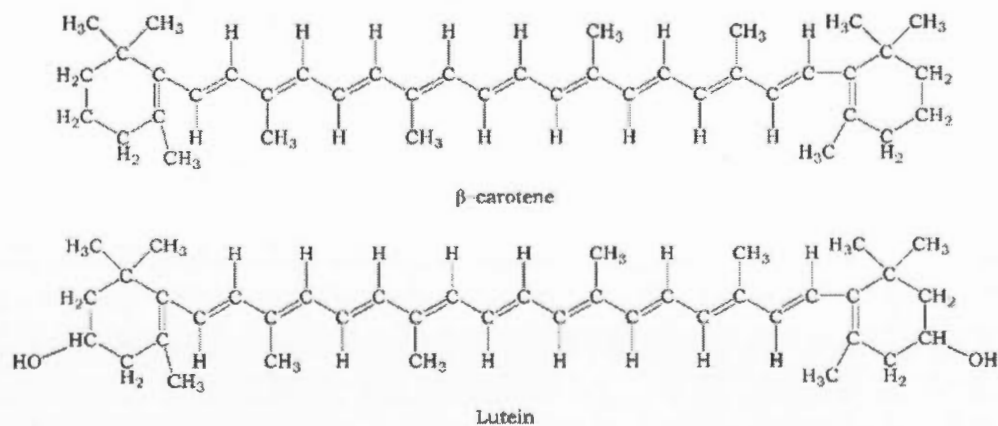


Figure 2.13 : Détail de la structure chimique du β -carotène et de la lutéine (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).

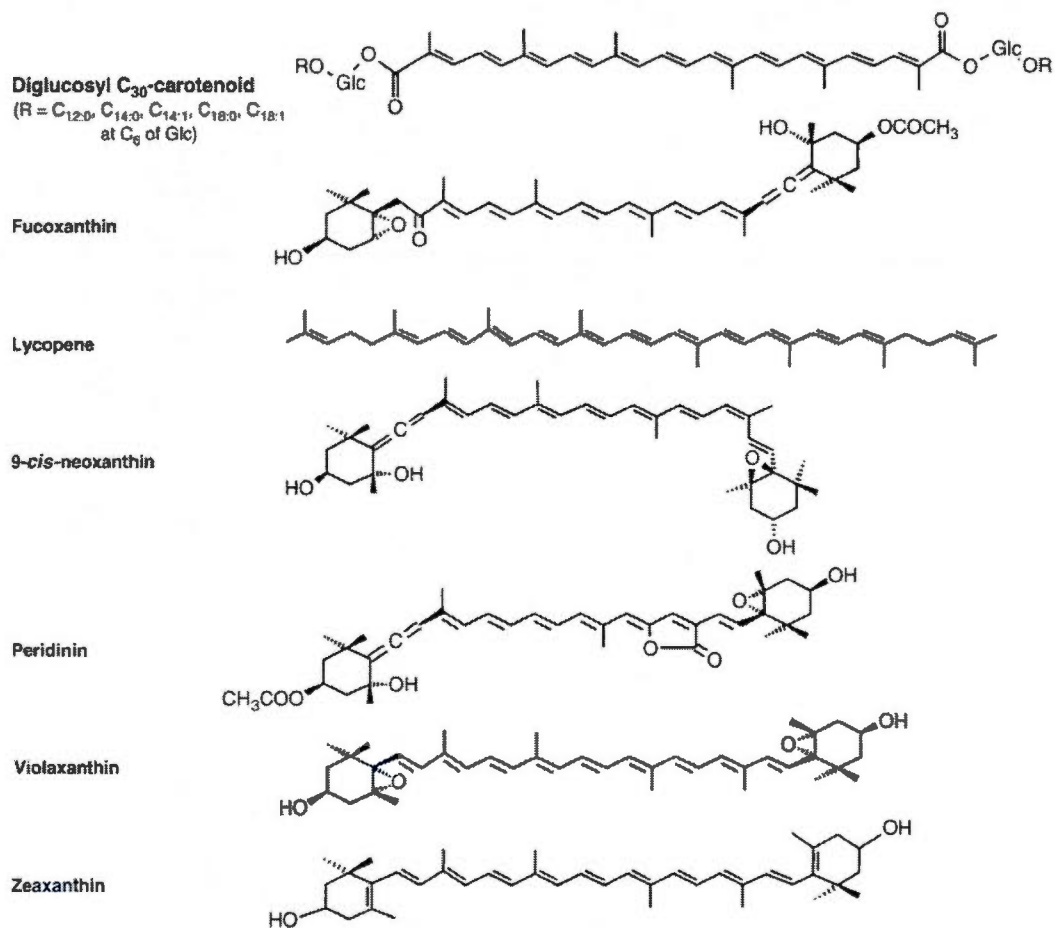


Figure 2.14: Représentation des structures chimiques d'autres caroténoïdes importants (d'après Scheer, 2004).

Les xanthophylles (dont fait partie la lutéine) sont une famille de caroténoïdes oxygénés contenant des groupements hydroxyles ou carbonyles qui contribuent à la solubilité et ainsi à la distribution de la molécule dans les tissus animaux (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010).

2.5.3 Caroténogénèse

Ce qui se produit au niveau de la caroténogénèse pour les microalgues pourrait s'illustrer de cet exemple avec *Haematococcus* : sous des conditions optimales de croissance, les cellules végétatives de l'algue persistent et l'algue possède des caroténoïdes normalement retrouvés chez les Chlorophytes et dans les chloroplastes des plantes supérieures, soit β -carotène, lutéine, violaxanthine, néoxanthine et zéaxanthine (ensemble formant les caroténoïdes primaires); or lorsque l'algue est exposée à des conditions environnementales extrêmes (conditions limitant la croissance), les cellules végétatives commencent à synthétiser l'astaxanthine et à l'accumuler en grande quantité, tout en subissant des changements au niveau de la morphologie cellulaire résultant en la formation de plus grosses cellules, rouges, nommées aplanospores, résistantes à ces conditions environnementales extrêmes (Harker *et al.*, 1996). La présence d'une grande quantité d'astaxanthine augmente la résistance cellulaire face aux stress oxydatifs générés par les conditions environnementales défavorables, telles une illumination excessive, un stress au niveau de la nutrition et une irradiation aux rayons UV (Lemoine et Schoefs, 2010). Aussi, l'accumulation d'astaxanthine constitue un moyen d'entreposer énergie et carbone, qui seront utilisés lorsque les conditions redeviendront plus favorables.

Enfin, la figure 2.14 illustre les différentes voies métaboliques pour la synthèse des caroténoïdes chez les microalgues et les plantes supérieures.

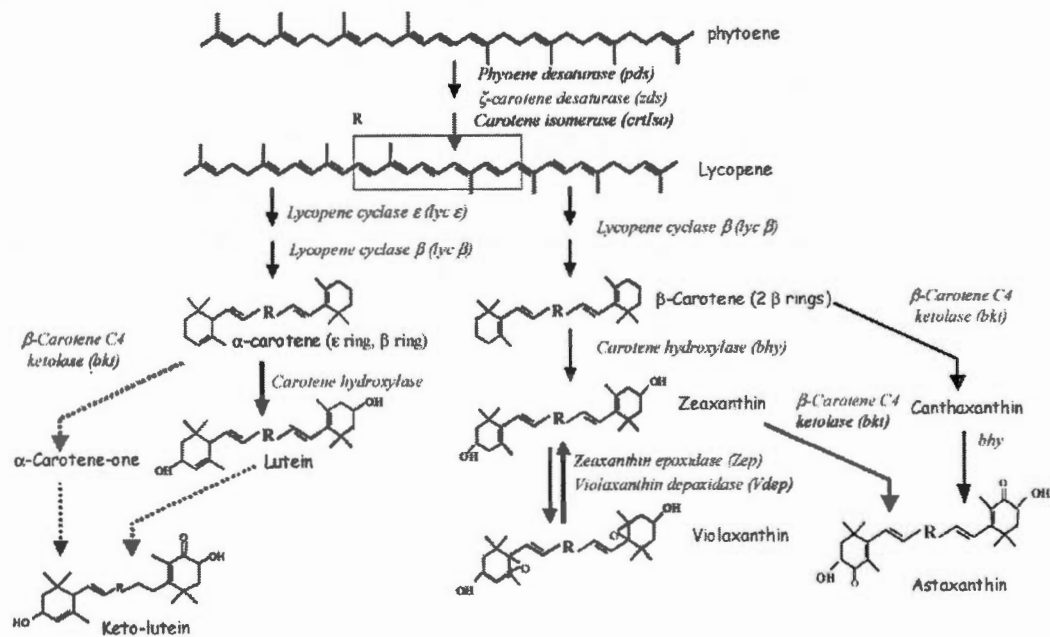


Figure 2.15 : Voies métaboliques pour la synthèse des caroténoïdes [*psy* (phytoène synthase); *pds* (phytoène désaturase); *Crtiso* (caroténoïde isomérase); *lyc- β* (lycopène cyclase β); *lyc- ϵ* (lycopène cyclase ϵ); *bhy* (β -carotène hydroxylase); *Zep* (Zéaxanthine époxydase); *Vdep* (Violaxanthin déépoxydase); *bkt* (β -carotène kétolase)] (d'après Rosa *et al.*, 2007).

CHAPITRE III

PROBLÉMATIQUE

La nature du présent projet de recherche consiste à utiliser des cultures d'algues, en particulier *Oocystis polymorpha* et *Scenedesmus sp.*, dans le but d'examiner les changements physiologiques concomitants avec la biosynthèse de caroténoïdes. Pour que l'algue entre en caroténogénèse, il s'agit avec une espèce donnée de modifier les conditions de culture avec divers traitements, en appauvrissant ou en enrichissant le milieu de culture de différentes substances et nutriments essentiels (particulièrement les nitrates). L'aspect d'exposition à la lumière des échantillons en cours d'expérience, tout comme la température, jouent un rôle clef.

Comme il existe un très grand nombre de souches et d'espèces de microalgues, chacune ayant ses propres préférences quant aux conditions de culture et réagissant différemment, d'un point de vue métabolique, à différents stress/traitements imposés, il y a sans doute des espèces plus « conviviales », c'est-à-dire plus aisées à manipuler dans le but d'obtenir l'astaxanthine ou d'autres caroténoïdes d'intérêt. Cela représente une motivation indéniable dans le présent projet, à savoir de découvrir différentes espèces pouvant synthétiser, à l'instar d'*Haematococcus*, de l'astaxanthine commercialement utilisable.

À ce jour, bien que quelques espèces (relativement peu) aient été utilisées pour des expériences visant la production d'astaxanthine, la grande majorité des travaux semble avoir été faite sur *Haematococcus*, en raison d'un certain succès dans la production.

La nécessité d'une étude réside en partie dans l'énorme potentiel qu'ont les algues de fournir un « matériel » renouvelable et généralement facile à cultiver, ainsi que dans leur capacité à procurer en quantités intéressantes une panoplie de molécules utiles pour la santé et pour l'environnement. Qui plus est, peu d'espèces ont à ce jour été bien étudiées. À titre d'exemple, un peu comme dans les travaux de Cerøn *et al.* (2007) pour *Haematococcus* et de Del Campo *et al.* (2004) pour *Chlorella*, l'objectif du projet est de déterminer l'influence des conditions de culture sur une espèce d'algue par des modifications environnementales menant à la production de caroténoïdes spécifiques. En somme, les effets de différents stress sur l'activité photosynthétique/métabolique d'*Oocystis polymorpha* et de *Scenedesmus sp.* menant à la caroténogénèse sont étudiés.

CHAPITRE IV

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

4.1 INTRODUCTION

Voici comment il faut s'y prendre pour procéder à la culture des microalgues en laboratoire, ainsi que les procédures nécessaires au démarrage d'une série de tests. Pour les différentes analyses, consulter les chapitres V et VI. Deux ouvrages s'imposent en ce qui concerne la culture des microalgues, il s'agit d'Andersen (2005) et de Richmond (2004).

4.2 CULTURES-MÈRES

Avant de pouvoir effectuer quelque test que ce soit, il est primordial d'avoir une culture en bon état physiologique de l'algue sélectionnée, et à cet effet il est nécessaire de connaître les conditions dans lesquelles l'algue en question croît le mieux (→ milieux de culture). Pour prendre possession d'une espèce de microalgue choisie, il est possible de la commander via certaines collections (ex. UTEX...), et la microalgue arrive généralement sur gélose dans un tube. L'algue peut ainsi être repiquée sur gélose en plat de pétri, ou encore en milieu liquide, d'abord dans un faible volume du milieu propre à sa culture. Par la suite, l'algue peut être repiquée dans un volume plus grand, et maintenue un certain temps en culture, en l'entretenant à l'occasion (ajout de milieu pour revitaliser la culture), avant de devoir la repiquer à nouveau lorsqu'elle devient trop concentrée et âgée. Toute manipulation concernant ces cultures, que l'on pourrait nommer « solutions-mères », doit être faite en conditions stériles, sous hotte stérile avec flamme et en utilisant des instruments préalablement stérilisés, lorsqu'applicable (pointes de pipettes, vaisselle, anses d'inoculation, etc.). Dépendamment des préférences de l'espèce, les cultures peuvent être simplement maintenues en erlenmeyers (125 ml – 1000 ml) sous éclairage, ou en aération, avec ou sans

agitation. Il est possible aussi de maintenir certaines cultures avec lesquelles nous prévoyons travailler dans de plus grands volumes. Des chambres de croissances avec différentes caractéristiques sont disponibles pour les différentes cultures.

4.3 MILIEUX DE CULTURE

Différents milieux de culture doivent être préparés, les différentes espèces de microalgues ayant des préférences variées. Certains milieux sont couramment utilisés pour plusieurs espèces, généralement riches en nutriments (BBM, BG-11, HSM, MAM, TAP, etc.). Certains milieux doivent être « salés », pour la culture d'algues marines, dont *Dunaliella* et *Porphyridium*. Les milieux peuvent être enrichis de solutions vitaminiques, et modifiés quant à certaines composantes. Chaque milieu possède son lot plus ou moins important de solutions-stock, qui doivent être préparées individuellement et conservées, de façon générale, au réfrigérateur. Ces solutions sont sorties quelques heures avant la fabrication du milieu, pour prendre les volumes nécessaires à la température de la pièce. Pour la stérilisation du produit final, la plupart des milieux sont autoclavables, mais ceux qui ne le sont pas doivent être filtrés, avec l'équipement nécessaire à cette tâche préalablement stérilisé. Le milieu BBM, autoclavable, convient à *Oocystis polymorpha*, alors que *Scenedesmus sp.* croîtra bien dans le milieu BG-11 (modifié), qui précipite à l'autoclave et doit être filtré.

4.4 PRÉPARATION DES TESTS – MATÉRIEL ET VAISSELLE

La notion de stérilité est essentielle lorsque l'on prévoit effectuer des expériences avec une espèce de microalgue déterminée. Tout ce qui servira à différentes manipulations pour préparer les échantillons doit être exempt de toute contamination ; vont donc à l'autoclave : erlenmeyers pour les tests, béchers, cylindres gradués, bouteilles (dans le cas de cultures en aération), pointes de pipettes (pour différents volumes), barreaux magnétiques. Également, les différentes solutions préparées spécialement pour effectuer certains tests

doivent être stériles, filtrées si non autoclavables. Certains éléments peuvent être stérilisés via des solvants (éthanol, méthanol) ou exposés aux rayons UV.

4.5 DÉMARRAGE D'UNE SÉRIE DE TESTS

Une fois choisies l'espèce d'algue et les expérimentations à essayer, et le matériel préparé, il faut concentrer la culture d'algues par centrifugation, afin de récupérer un inoculum qui servira dans le démarrage des tests. Aussi, cette étape permet l'élimination du milieu de culture de l'algue, car de façon générale les tests seront effectués dans un milieu de culture appauvri (d'ordinaire en azote). L'inoculum ainsi récupéré, il faut ensuite effectuer un comptage cellulaire, cela permettra de démarrer les tests avec un nombre de cellules voulu (densité cellulaire). Pour ce faire, il est possible d'utiliser, si la taille des cellules le permet, un appareil du type Multisizer III (Coulter Counter, Beckman). Autrement, un comptage à l'aide d'un hémacytomètre (lame de comptage pour microscopie) représente une technique fréquemment utilisée.

Lorsque tout est prêt, les tests sont démarrés sous hotte stérile, en ajoutant aux erlenmeyers préalablement identifiés le milieu de culture, les traitements choisis, puis l'inoculum. Les échantillons peuvent ensuite être placés sous les conditions déterminées (éclairage, agitation, aération) et l'expérimentation débute. La plupart du temps, il est nécessaire d'agiter manuellement quelques fois par jour les échantillons, même s'ils sont sur une plaque agitatrice. Un suivi est ensuite réalisé, incluant des observations macro et microscopiques, et chaque semaine une série d'analyses est menée : comptage cellulaire, dosage des pigments, matière sèche (biomasse et éventuelle caractérisation des pigments), activité photosynthétique, capacité antioxydante, etc. Cela permet de suivre l'état physiologique des cultures-tests. Pour plus de détails, consulter les chapitres V et VI.

Il est de mise lors du prélèvement hebdomadaire des échantillons d'observer une grande prudence en ce qui concerne les conditions de stérilité. Il ne faut pas introduire une source de contamination dans les cultures-test. Aussi, certains échantillons ont été faits en

parallèle recouverts de papier d'aluminium, afin d'empêcher la lumière de pénétrer, ce qui permit de démontrer que les caroténoïdes produits ne l'étaient pas par un tiers microorganisme (une bactérie par exemple).

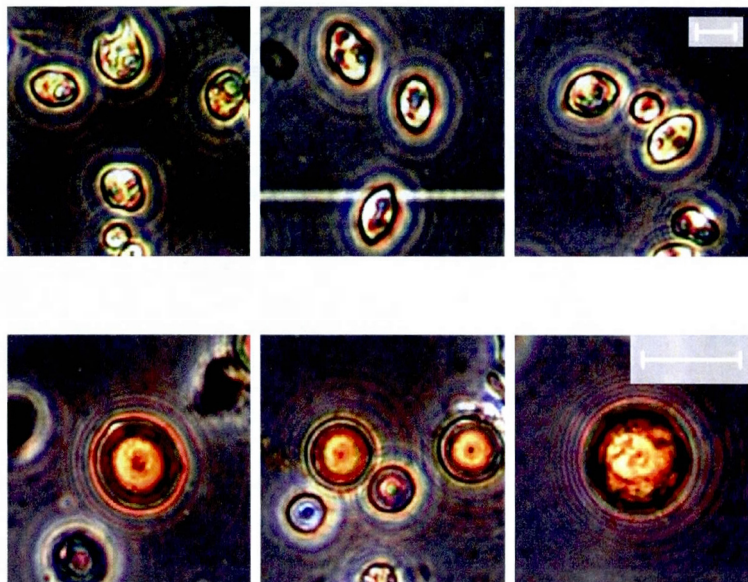


Figure 4.1 : Photos en microscopie optique (400x) de cellules d'*O. polymorpha* au début de l'expérience (en haut; bar = 20 μm) et après 42 jours de privation en nitrates (en bas; bar = 50 μm) (photos de l'auteur).



Figure 4.2 : Production de caroténoïdes microbiens en conditions contrôlées - différentes colorations des tests sur *Oocystis polymorpha* vers la fin de l'expérience (photo de l'auteur).

CHAPITRE V

LONG-TERM PHYSIOLOGICAL STRESS INDUCED BY NITRATE DEFICIENCY AND SODIUM ACETATE ON CAROTENOGENESIS OF GREEN ALGA *OOCYSTIS* *POLYMORPHA*

Louka Sirois, Laura Pirastru, Julie-Anne Jauffrit, Lekha Sleno‡, Radovan Popovic† and
David Dewez*

Département de chimie, Université du Québec à Montréal (UQAM), PO Box 8888, Suc.
Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8 Canada.

‡ Pharmaqam, UQAM, Montréal, QC, Canada.

† This work was dedicated in memory of Radovan Popovic (1940-2012).

* Corresponding author: David Dewez (e-mail: dewez.david@uqam.ca)

Contribution dans ce chapitre: j'ai participé au démarrage de l'expérience, aux différentes analyses ainsi qu'à la collecte et à l'interprétation des données, et à la rédaction de l'article.

N.B.: Article en préparation d'être soumis.

5.1 ABSTRACT

Carotenoids are essential molecules in human diet that can only be taken from other sources, and microorganisms such as microalgae presents the potential to be a number one source in the future regarding to industrial production. At this day, research on carotenoid production from microorganisms have not yet been through intensive look. Therefore, since potential of some microalgae species to biosynthesize particular molecules of interest is evident, such as secondary carotenoids, the need to use different species for study mechanisms and further obtain the bioproduct is righ here. In this study, we selected the green microalga *Oocystis polymorpha* as a species capable of producing valuable carotenoid molecules. Thus, to understand carotenogenesis and follow the changes in physiological activity of the algae, we went through different analysis each week during the lenght of experiment, 42 days, wich is also a feature different from most studies, usually going on around 18 days. *Oocystis polymorpha* was given a limited nitrogen (nitrates) media, in addition of sodium acetate treatment and higher light irradiance. The analysis that were conducted each week to follow physiological changes in the alga concerned in: optic microscopy observation, cell density measurement, dry weight, chlorophyll and carotenoid content by spectrophotometry, carotenoid determination by HPLC, photosynthetic activity by PEA and reactive oxygen species determination. Results shows that under stress conditions, the tolerant microalga *Oocystis polymorpha* undergoes a modification in photosynthetic activity that lead to carotenoid production that is interesting enough to pursue studies with this species.

Key words: green algae, *Oocystis polymorpha*, secondary carotenoids, acetate, carotenogenesis.

Abbreviations: PSII, Photosystem II; PSI, Photosystem I; Chl, Chlorophyll; RC/ABS, Ratio between the number of active PSII reaction centers and relative value of light absorption by

chlorophyll antenna; Φ_{MII} , Maximal quantum yield of PSII photochemistry; VJ, Relative value of variable Chl *a* fluorescence yield at J transient; P.I., Performance Index of PSII photochemistry; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; SPE, solid phase extraction; MTBE, methyl tert-butyl-ether; MeOH, methanol; ROS, reactive oxygen species.

5.2 RÉSUMÉ

Les caroténoïdes sont des molécules essentielles à la diète humaine, et doivent nécessairement être puisées dans l'alimentation. Les microorganismes comme les microalgues présentent un grand potentiel de production industrielle pour le futur. À ce jour, la recherche sur la production de caroténoïdes par les microorganismes semble en être encore à ses balbutiements. En conséquence, vu le potentiel évident de certaines espèces de microalgues à synthétiser diverses molécules d'intérêt, notamment des caroténoïdes secondaires, le besoin d'utiliser de nouvelles espèces pour l'étude des mécanismes physiologiques menant à la caroténogénèse est justifié. Dans cette étude, la microalgue verte *Oocystis polymorpha* a été sélectionnée. Pour comprendre la caroténogénèse et suivre les changements physiologiques chez l'algue, nous avons procédé de façon hebdomadaire à une batterie d'analyses durant l'entière durée de l'expérience, soit 42 jours, ce qui en fait une expérience particulièrement longue en comparaison à ce qui se fait habituellement dans le domaine (environ 18 jours). *Oocystis polymorpha* a été mise à l'épreuve dans un milieu limité en azote (nitrates) dans lequel nous avons ajouté différentes concentrations d'acétate de sodium, en plus d'une illumination continue plus forte qu'à l'ordinaire. Les analyses hebdomadaires visant à illustrer les changements physiologiques de l'algue ont été: observation en microscopie optique, mesure de la densité cellulaire, poids sec, contenu en chlorophylles et en caroténoïdes par spectrophotométrie, analyses des caroténoïdes par HPLC, activité photosynthétique par PEA et détermination des espèces réactives de l'oxygène. Les résultats démontrent que sous des conditions de stress, la microalgue tolérante *Oocystis polymorpha* module son activité photosynthétique, ce qui mène à la production de caroténoïdes. Cette espèce s'avère intéressante pour d'éventuelles études.

5.3 INTRODUCTION

Carotenoids are natural and lipophilic compounds found as colour pigments and synthesized in all photosynthetic organisms (Cunningham and Gantt 1998). In chloroplasts, carotenoids participate in energy transfer with chlorophyll molecules and in photoprotection by quenching triplet excited states of chlorophylls and dissipating the excess excitation energy as heat (Niyogi *et al.* 1997). Under physiological conditions, algal cells can synthesize different carotenoids such as β -carotene, neoxanthin, violaxanthin and zeaxanthin, having structural and functional regulatory roles in the chloroplast (Jin *et al.* 2003). Under environmental stress conditions such as high irradiance, temperature, ionic metals, salts or and nutrient deficiency (e.g., nitrogen), many species of green algae can synthesise large quantities of ketocarotenoids such as canthaxanthin and astaxanthin (Masojidek *et al.* 2000; Bhosale 2004). Known as secondary carotenoids, these carotenoids accumulate in lipid bodies located outside the chloroplast controlled by cytosolic processes (Boussiba 2000), but their functions are different from primary photosynthetic pigment (Jin *et al.* 2006). Some green algae such as *Haematococcus* can accumulate high amounts of secondary carotenoids (e.g., astaxanthin) when exposed to high light irradiance and nitrogen, iron, phosphate or sulphur starvation (Boussiba 2000; He *et al.* 2007). However, it is of interest to determine stress conditions that affect the physiological regulation of ketocarotenoids production in different algal species.

Under physiological stress caused by nitrogen (nitrates) deficiency and high light stress, carotenoid biosynthesis is associated with changes in cell morphology, pigment composition and the alteration of photosynthetic activity. When green algae *Chlorococcum sp.* were exposed to nitrogen deficiency, 0.2 M of NaCl and high light irradiance, the chlorophyll content and Photosystem II (PSII) activity were decreased while the amount of xanthophyll-cycle pigments and secondary carotenoids were increased as an adaptation mechanism to intracellular stress (Masojideck *et al.* 2000). When nitrogen deficient *Haematococcus pluvialis* culture was grown into tubular photobioreactor and exposed to light irradiance typical in outdoor conditions, primary and secondary carotenoid contents changed

as seen by the appearance of red color due to the decrease of chlorophylls and the increase of total carotenoids (Torzillo *et al.* 2003). In a previous study by Hagen *et al.* (2000) with *H. pluvialis*, the accumulation of secondary carotenoids was linked to increase of photosynthetic activity during the first and second day of exposure to nitrogen deficiency and high light stress. Under this experimental condition, the highest rate of carotenoid biosynthesis was related with the highest rate of cell division and chlorophyll biosynthesis. However, one may notice that these studies concerning the effect of environmental stresses on secondary carotenoid production were obtained under very different experimental conditions (laboratory or outdoors, fluctuating light and temperature), and they are hardly comparable with each other. Therefore, it is still of interest to investigate the relation between primary and secondary carotenoid production and cellular physiological processes in algal species.

Carotenoid production from microalgae represents a current research orientation in biotechnology, since it is an important market demand for natural pigments. In this context, the use of *Oocystis polymorpha* in comparison to *Haematococcus pluvialis* may offer some advantages due to its rapid growth and simple cultivation protocol. In this work, the green alga *Oocystis polymorpha* was exposed to a long-term physiological stress induced by nitrogen deficiency, different concentrations of acetate and high light irradiance. Under these conditions, the change of PSII photochemical reactions of photosynthesis and cellular growth were investigated during carotenogenesis for 42 days. The relationship between the variation in the performance index of PSII photochemistry and the change in total chlorophylls or total carotenoids was analyzed for *Oocystis polymorpha* exposed to different concentrations of acetate. Our investigation on the structural and functional change of the photosynthetic apparatus during carotenoid accumulation showed the possibility to use this change as an indicator of the state of carotenoid accumulation. These changes were used to indicate optimal accumulation of secondary carotenoids astaxanthin and canthaxanthin.

5.4 MATERIALS AND METHODS

5.4.1 Culture conditions

Green alga *Oocystis polymorpha* was provided by the UTEX Culture Collection of Algae (UTEX no 1645, University of Texas at Austin). Cultures were grown in 250 mL bottle bioreactor with sterile BG11 liquid medium which contained 1.5 g/L (17.6 mM) of nitrate (as NaNO_3), according to Rippka *et al.* (1979). Algal stock cultures were maintained with bubbling air, at 23 °C under continuous light irradiance of 100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. When algal cell population reached an exponential growth phase, cells were harvested and concentrated by centrifugation (4000 g) for 15 min at 4 °C. Prior to treatment, algal cells were washed with sterile ultrapure water and resuspended in BG11 medium missing nitrate. Algal cells were exposed to acetate concentrations of 6, 30, 60 and 90 mM in BG11 medium without nitrate to provoke a physiological stress inducing the accumulation of secondary carotenoids. It has been shown that nitrate limitation or deficiency is an environmental factor responsible for causing carotenoids accumulation in green microalgae (Orosa *et al.* 2000; Hagen *et al.* 2001). Treatment of acetate was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 60 mL of culture testing medium. Algal cultures growing in BG11 medium without nitrate and acetate were used as control. The initial cell density used in all tested cultures was 24×10^6 cells/mL. Algal cells were exposed during a 40 day period at 23 °C to a light irradiance of 150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, which is known to have a pronounced effect on carotenoid biosynthesis in green algae (Harker *et al.* 1996; Li *et al.* 2009). All tested cultures were done in triplicate. During experiments, testing Erlenmeyer flasks were placed on an agitation plate set to 100 rpm. Pigment analysis and photosynthetic activity were determined at regular intervals during this 42 day experimental period.

5.4.2 Cell density, total chlorophylls and carotenoids

Algal cell density was determined with a Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc) equipped with a 30 μm aperture as well as with a hemocytometer. Total chlorophylls and carotenoids were extracted from 100 μL of algal culture added to 1 mL of 100 % methanol

with glass beads (N° G-1759 type X 1000-1050 μ) and was vortexed during 20 min to induce complete cell disruption. Extracts were heated at 65 °C for 10 min and separated by centrifugation. Absorbance measurements of total chlorophylls and carotenoids were done by using a UV/VIS spectrophotometer (Lambda 40, Perkin Elmer), and quantitative determination was calculated according to equations of Lichtenthaler (1987).

5.4.3 Rapid chlorophyll *a* fluorescence rise measurements

Prior to fluorescence measurements, algal samples were dark-adapted for 15 min. Algal samples at a concentration of 20×10^6 cells were uniformly placed on glass fibre filters (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration to avoid physiological stress and to obtain reproducible results. The 'Plant Efficiency Analyzer' fluorometer (PEA, Hansatech Ltd., UK) was used to measure the rapid and polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence during 6 sec under a light intensity of 3500 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. Fluorescence yield (F) at 50 μs ($F_{50\mu\text{s}}$), 100 μs ($F_{100\mu\text{s}}$), 300 μs ($F_{300\mu\text{s}}$), 2 ms ($F_{2\text{ms}}$) and 30 ms ($F_{30\text{ms}}$) were determined according to Strasser et al. (2004). The fluorescence yield at 50 μs was considered as the basal fluorescence level when all reaction centers of PSII are in open state. The maximal fluorescence yield, F_M was determined at P transient under saturating light irradiance. Fluorescence yields $F_{2\text{ms}}$ and $F_{30\text{ms}}$ were respectively indicating variable fluorescence yields related to J and I transients. Fluorescence kinetics were normalized with $F_{50\mu\text{s}}$ value to allow comparison of variable fluorescence proportion between different samples. Photosynthetic-based fluorescence parameters related to the functional state of PSII were calculated according to Strasser et al. (2004). The number of active PSII reaction centers (PSII RC) per relative unit of light absorption by chlorophylls of light-harvesting complexes (ABS) was determined as the ratio $\text{PSII RC/ABS} = [(F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}) / 4 \times (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}})] \times (F_M - F_{50\mu\text{s}}) / F_M$. The maximum quantum yield of PSII photochemistry, indicating the photochemical efficiency by which an absorbed photon will be trapped by PSII reaction centers, was determined as the ratio $\Phi_{\text{MII}} = (F_M - F_{50\mu\text{s}}) / F_M$. The relative value of variable chlorophyll fluorescence yield at J transient, indicating the accumulation of reduced PSII primary electron acceptor, Q_A was determined as the ratio $V_J = (F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}) / (F_M - F_{50\mu\text{s}})$. The

performance index of PSII, giving a global estimation of PSII photochemical reactions efficiency, was determined as $P.I. = RC/ABS \times \Phi_{MII} \times ((1 - V_J) / V_J)$.

5.4.4 Carotenoids extraction, HPLC separation and mass spectrometry analysis

Pigments β -carotene, lutein, astaxanthin and canthaxanthin were separated by liquid chromatography (HPLC) and analyzed by mass spectrometry according to Chu *et al.* 2011. To a quantity of 5 mg (lyophilized dry weight) of algae was added 40 μ L of β -apo-80-carotenal stock solution (0.1 mg/mL), serving as internal standard (IS), for relative quantitation purposes. The samples were extracted with a mixture of dichloromethane/methanol (75:25). The extraction was repeated until no color was further extracted and pellets were almost colorless (approximately 5-7 mL total). The samples were dried in a Thermo Scientific Lindberg/Blue M vacuum chamber and then reconstituted in 1.5 mL of 75% methanol/25% water prior to solid-phase extraction (SPE) using Water Oasis HLB (30 mg) cartridges (Milford, MA). Samples were loaded and then cartridges washed with methanol/water (75:25). Carotenoids were eluted with 1 mL of MTBE/methanol/water (60:37:3) containing 3 mM ammonium acetate. The samples were lyophilized using a Thermo Scientific Savant SPD131DDA SpeedVac concentrator and a UVS800DDA Universal Vacuum Source (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and reconstituted with 0.5 mL of 90% MeOH, 10% H₂O, 10 mM ammonium acetate prior to sample injection. Samples were consistently stored at -30 °C between processing steps and before sample analysis.

Carotenoid analysis was conducted on an Agilent 1200 series high-performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a diode array detector (UV-vis) coupled online with an Agilent 6410 triple-quadrupole (QqQ) instrument (Santa Clara, CA). Liquid chromatography was performed and optimized on a Phenomenex Gemini-NX 150 \times 2 mm C18 column (Torrance, CA) filled with 3 μ m particles, and absorbance was monitored at 450 nm. The HPLC separation was performed using the mobile phases A, 90% MeOH, 10% H₂O, 10 mM ammonium acetate; and B, 85% MTBE, 15% MeOH. The following elution gradient (min/% B) was used: 0-2/5%, 20/65%, 22-27/85%, at a flow rate of 0.2 mL/min and

column temperature of 30 °C. The volume of injection was 10 μ L. Nominal mass spectra (unit resolution) for the carotenoids and free astaxanthin were obtained online with UV detection (above) by positive electrospray ionization (ESI) using a multimode (MMI) source, with a scan range of m/z 400-650 and the following source parameters: gas temperature, 300 °C; vaporizer, 200 °C; gas flow, 5 mL/min; nebulizer pressure, 60 psi; capillary voltage, 3000 V; fragmentor, 100 V.

Accurate mass data were obtained on an Agilent 6210 electrospray-time-of-flight (ESI-TOF), using the same HPLC conditions as above with an injection volume of 15 μ L. The dual ESI source was operated with the following source parameters: gas temperature, 350 °C; flow, 11.5 L/min (ultrapure nitrogen); nebulizer pressure, 35 psi; capillary voltage, 4000 V; fragmentor, 100 V; skimmer voltage, 60 V. Data were acquired from m/z 100 to 1000 with internal calibration using the reference masses m/z 121.050873 and 922.009798, sprayed continuously through the reference electrospray needle. Raw ESI-TOF data were processed by molecular feature extraction (MFE) in MassHunter Qualitative Analysis software (version B.02.00) for compounds eluting from 2 to 25 min with m/z 300-1000 and a signal threshold of 200 counts. The resulting MHD files, containing compound IDs (based on neutral mass and retention times), were then amenable to further filtering and comparison of samples. Agilent MassHunter Mass Profiler software version B.02 was then employed for comparison of differentially expressed carotenoids in treated samples compared to controls.

Carotenoid identification was performed by comparing retention times with available standards: astaxanthin (free and ester forms), canthaxanthin, lutein, and β -carotene. Tentative identifications were made for other carotenoid compounds based on accurate mass data and molecular formula assignments as well as elution order.

5.5 DATA ANALYSIS AND STATISTICS

Experiments were done in triplicates for all treatments. Means and standard deviations were estimated for each treatment. Statistics were done by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey multiple comparison test amongst the means. Linear regressions were performed for correlation analysis. Significant differences between control and treated samples were determined for p values less than 0.05.

5.6 RESULTS AND DISCUSSION

When *Oocystis polymorpha* was grown under nitrate deficiency under a light irradiance of 150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, carotenogenesis was monitored over a 42 day period. Under nitrate deficiency, the accumulation of total carotenoids in algal cultures appeared to be highly induced as indicated by the intensity of orange color (Fig. 1). Furthermore, these algal cells were much bigger compared to green cells of *Oocystis polymorpha* grown in BBM media. The green coloration did not change during 42 days for control cultures grown under optimal nutrient conditions (Fig. 1). During this 42 day time-course study, cell density *Oocystis polymorpha* grown in BBM-N media (nitrate starvation) significantly diminished compared to the control due to the physiological stress (Fig. 2). However, this decrease in cell density was not significant for algal cultures treated to acetate (from 6 mM to 90 mM) compared to the nitrate deficient culture, which indicated that the inhibition of cell division was mostly due to the deficiency in nitrate. Furthermore, the change of total biomass in dry weight was significantly higher only after 22 days for the control culture compared to cultures grown in BBM-N media and treated with acetate. This indicates that the physiological stress caused by nitrate starvation was provoking the increase of algal cell volume.

The biosynthesis of chlorophylls was also affected by culture condition with nitrate starvation. Between days 7 to 22, total chlorophylls per cell significantly decreased for cells

of *Oocystis polymorpha* grown in BBM-N media compared to the control (Fig. 3). Furthermore, when cells grown in BBM-N media were additionally treated with acetate, the decrease of total chlorophylls per cell was even more important, indicating a strong inhibition of chlorophylls synthesis. However, our results showed that, under treatment condition of nitrate starvation, total carotenoids per cell highly increased compared to *Oocystis polymorpha* cells grown in BBM media. Carotenoid content reached its highest level at 42 days for algal culture grown in BBM-N media. On the other hand, it appeared that the effect of acetate on the biosynthesis of carotenoids was not dependent to the time of exposure. Total carotenoid content was higher compared to culture grown in BBM-N media only at day 7 under 90 mM of acetate treatment and at day 22 under 30 mM of acetate. Therefore, it is most likely that the biosynthesis of carotenoids was not directly related to acetate treatment.

During this 42 days' time-course study, *Oocystis polymorpha* cultures exposed or not to acetate were extracted for the analysis of the different carotenoids species. Pigments β -carotene, lutein, astaxanthin and canthaxanthin were separated by liquid chromatography (HPLC) and analyzed by mass spectrometry (Chu et al. 2011). These carotenoids content per cell was determined for algal culture grown in BBM, BBM-N media and cultures treated with different concentrations of acetate (Fig. 4). Analysis of pigment extracts showed that the content of β -carotene, lutein, astaxanthin and canthaxanthin changed during the induction of carotenogenesis of 42 days. The β -carotene content per cell reached its highest level at 42 days for algal culture grown in BBM-N media. Additional treatment of acetate was not causing an increase of this carotenoid content compared to BBM-N media condition, but rather the β -carotene synthesis was down-regulated. Under nitrate starvation and acetate treatment, the lutein content per cell increased compared to control only during the first 24 h. The lutein content per cell reached its highest level at day 8 for both algal cultures grown in BBM and BBM-N media. After day 15, the lutein content per cell was not significantly different between these two cultures. Moreover, in the presence of acetate, the lutein content significantly decreased. Concerning the canthaxanthin, the change of its content increased significantly only at 42 days for algal culture grown in BBM-N media. Furthermore, the astaxanthin content per cell reached its highest level at 42 days for algal culture grown in BBM-N media. Under physiological stress caused by nitrate starvation and acetate treatment,

the astaxanthin content per cell start to increase significantly compared to the control from day 8. Therefore, algal cultures grown in BBM-N media caused during this 42 days' experiment the increase of the content of β -carotene, astaxanthin and canthaxanthin, and the decrease of lutein content.

In this study, Chl *a* fluorescence emission was used to evaluate the change of photosynthetic processes when *Oocystis polymorpha* was exposed to nitrate starvation and acetate treatments during 42 days. Measurements of fluorescence yield permitted to determine the change in PSII primary photochemistry and electron transport activity during carotenogenesis. We found a decrease of fluorescence yields at J, I and P levels without any change in their time of appearance on the kinetics which was related to the effect of nitrate starvation and acetate concentration (Fig. 5). At day 22, a complete inhibition of PSII electron transport activity was noticed under acetate treatments. At day 42, PSII photochemical reactions were completely stopped under treatment and control conditions, which may due to a physiological stress effect caused by nutrient limitation in the medium. Furthermore, the performance index of PSII photochemistry (P.I.) was used as a global estimate of the efficiency of PSII photochemical reactions. This photosynthetic-based fluorescence parameter decreased significantly after day 15 for control cultures grown under optimal nutrient conditions (Fig. 6). For culture grown in BBM-N media (nitrate starvation), P.I. significantly decreased compared to the control (BBM media) from day 1. Also, additional acetate treatment was causing stronger effect on the inhibition of PSII primary photochemistry. Such alteration was indicative of the deterioration of PSII photochemical reactions at the enzymatic complex of oxygen evolution and electron transport activity toward Photosystem I. Moreover, the physiological stress induced by nitrate starvation was causing a high increase of ROS formation at day 7, which decreased in time up to day 42 (Fig. 7). This decrease is related with the synthesis of astaxanthin. It appeared also that acetate treatment was limiting the production of ROS.

When *Oocystis polymorpha* was exposed 42 days to nitrate-deficiency and light irradiance of 150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, an efficient biosynthesis of carotenoids was observed

due to physiological stress. Total carotenoids content was increased while cell division was inhibited. Under this condition, secondary carotenoid astaxanthin appeared due to this physiological stress. It was previously suggested that most of the esterified astaxanthins accumulate outside of the chloroplast, in lipid vesicles, without interfering directly with photosynthetic processes (Boussiba 2000). In this study, we found that under our physiological stress condition the synthesis of secondary carotenoids was related to the deterioration of structural and functional properties of the photosynthetic apparatus. We clearly observed a decline in chlorophyll synthesis while total carotenoid synthesis amplified. Such decrease in chlorophyll content was indicative of important structural alterations of the photosynthetic apparatus, as shown previously (Kim et al. 1993). We showed, based on changes of chlorophyll fluorescence yields and photosynthetic-based fluorescence parameter, P.I. a strong inhibition of functional PSII reaction centers. Therefore, during this long term cellular stress study (42 days), our results indicated that the synthesis of secondary carotenoids was highly induced under the condition when structural and functional properties of PSII were strongly deteriorated. However, it is not well understood how the accumulation of secondary carotenoids may participate as antioxidant compound in algal cells. In our study, the functional state of PSII primary photochemistry and electron transport activity was found to be drastically reduced and absent at day 42. The parameter P.I. as PSII photochemistry efficiency represented the most sensitive indicator of the physiological stress induced by nitrate deficiency, acetate and high light on this alga species. However, the highest induction of carotenoid synthesis happened after the deterioration of PSII reaction centers. Therefore, other physiological process may be involved to trigger the synthesis of carotenoids, such as cellular oxidative stress. Indeed, reactive oxygen species causing the oxidation of carotenoids was found to induce changes in the expression of a large set of genes involved in biochemical defense mechanisms (Ramel et al. 2012). Under this condition, *Oocystis polymorpha* was tolerant to this long-term chronic stress.

Acknowledgements

This work was supported by NSERC.

5.7 REFERENCES

- Bhosale, P. 2004. "Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 351-361.
- Boussiba, S. 2000. "Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response". *Physiol. Plant.* 108: 111-117.
- Chu, F. L., Pirastru, L., Popovic, R. and Sleno, L. 2011. "Carotenogenesis up-regulation in *Scenedesmus sp.* using a targeted metabolomics approach by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* 59: 3004-3013.
- Cunningham, F. X. and Gantt, E. 1998. "Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:557-83.
- Hagen, C., Grünewald, K., Schmidt, S. and Müller, J. 2000. "Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis". *Eur. J. Phycol.* 35: 75-82.
- Hagen, C., Grünewald, K., Xyländer, M. and Rothe, E. 2001. "Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*". *J. Appl. Phycol.* 13: 79-87.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. and Young, A. J. 1996. "Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*". *Bioresour. Technol.* 55: 207-214.
- He, P., Duncan, J. and Barber, J. 2007. "Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of cultivation parameters". *J. Integr. Plant Biol.* 49: 447-451.

- Jin, E. S., Polle, J. E. W., Lee, H. K., Hyun, S. M. and Chang, M. 2003. "Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application". *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 165–175.
- Jin, E., Lee, C.-G. and Polle, J. E. W. 2006. "Secondary carotenoids accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology". *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 821–831.
- Kim, J. H., Glick, R. E. and Melis, A. 1993. "Dynamics of photosystem stoichiometry adjustment by light quality in chloroplasts". *Plant Physiol.* 102: 181–190.
- Li, Y., Huang, J., Sandmann, G. and Chen, F. 2009. "High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae)". *J. Phycol.* 45: 635–641.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. "Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes". *Meth. Enzymol.* 148: 349–382.
- Masojideck, J., Torzillo, G., Kopecký, J., Koblížek, M., Nidiaci, L., Komenda, J., Lukavská, A. and Sacchi, A. 2000. "Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress". *J. Appl. Phycol.* 12: 417–426.
- Niyogi, K. K., Bjorkman, O. & Grossman, A. R. 1997. "The roles of specific xanthophylls in photoprotection". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:14162–7.
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P. and Abalde, J. 2000. "Production and analysis of carotenoids in green algae". *J. Appl. Phycol.* 12: 553–556.
- Orosa, M., Valero, J. F., Herrero, C. and Abalde, J. 2001. "Comparison and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other microalgae under N-starvation and high light conditions". *Biotechnol. Lett.* 23: 1079–1085.

Ramel, R., Birtica, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnate, L., Triantaphylidès, C., Havaux, M. 2012. « Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5535–5540.

Rippka, R., Deruelles, J. B., Herdman, M., Waterbury, B. and Stanier, R. Y. 1979. "Assignments, strain history and properties of pure cultures of Cyanobacteria". *J. Gen. Microbiol.* 111: 1–61.

Strasser, R. J., Srivastava, A. and Tsimilli-Michael, M. 2004. "Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient". In Papageorgiou, G. and Govindjee (Eds) "Advances in photosynthesis and respiration. Vol. 19, Chlorophyll fluorescence a signature of photosynthesis". *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands, pp. 321–362.

Torzillo, G., Goksan, T., Faraloni, C., Kopecky, J. and Masojídek, J. 2003. "Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage". *J. Appl. Phycol.* 15: 127–136.

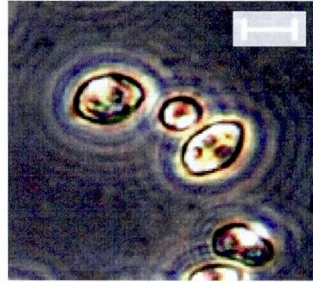
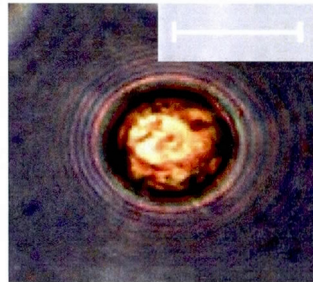
A(bar 20 μm)**B**(bar 50 μm)

Figure 5.1 : A) Green cells (mature culture) of *Oocystis polymorpha* in BBM media, optical microscopy 400x. B) Orange cells of *Oocystis polymorpha* in BBM-N media, after 42 days, optical microscopy 400x.

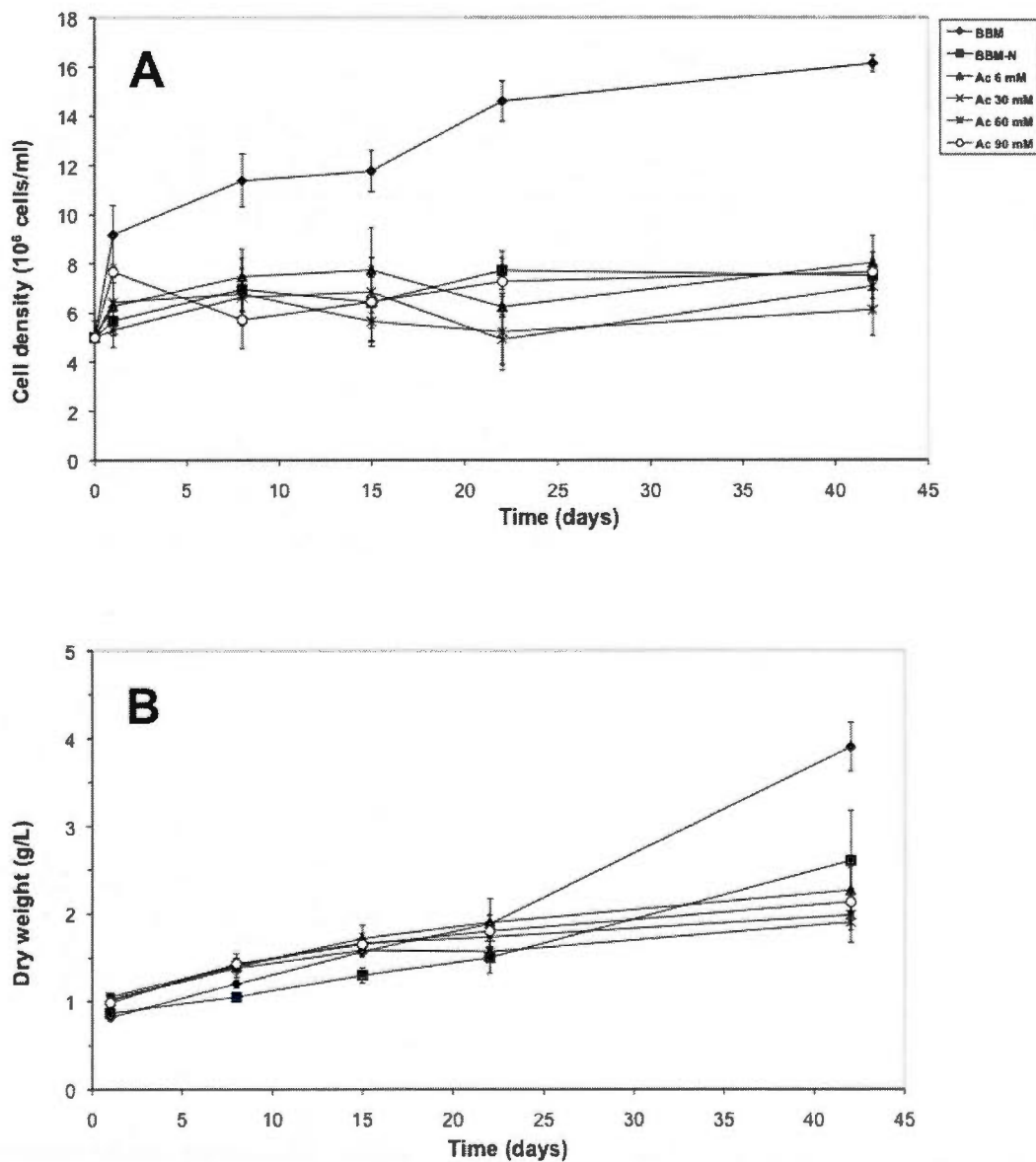


Figure 5.2: A) Change of cell density during 42 days for *Oocystis polymorpha*. Control in BBM media (◆); in BBM-N media (nitrate starvation) (■); in BBM-N media with sodium acetate of 6 mM (▲), 30 mM (×), 60 mM (⋈) and 90 mM (○). B) Change of biomass growth (dry weight in g/l).

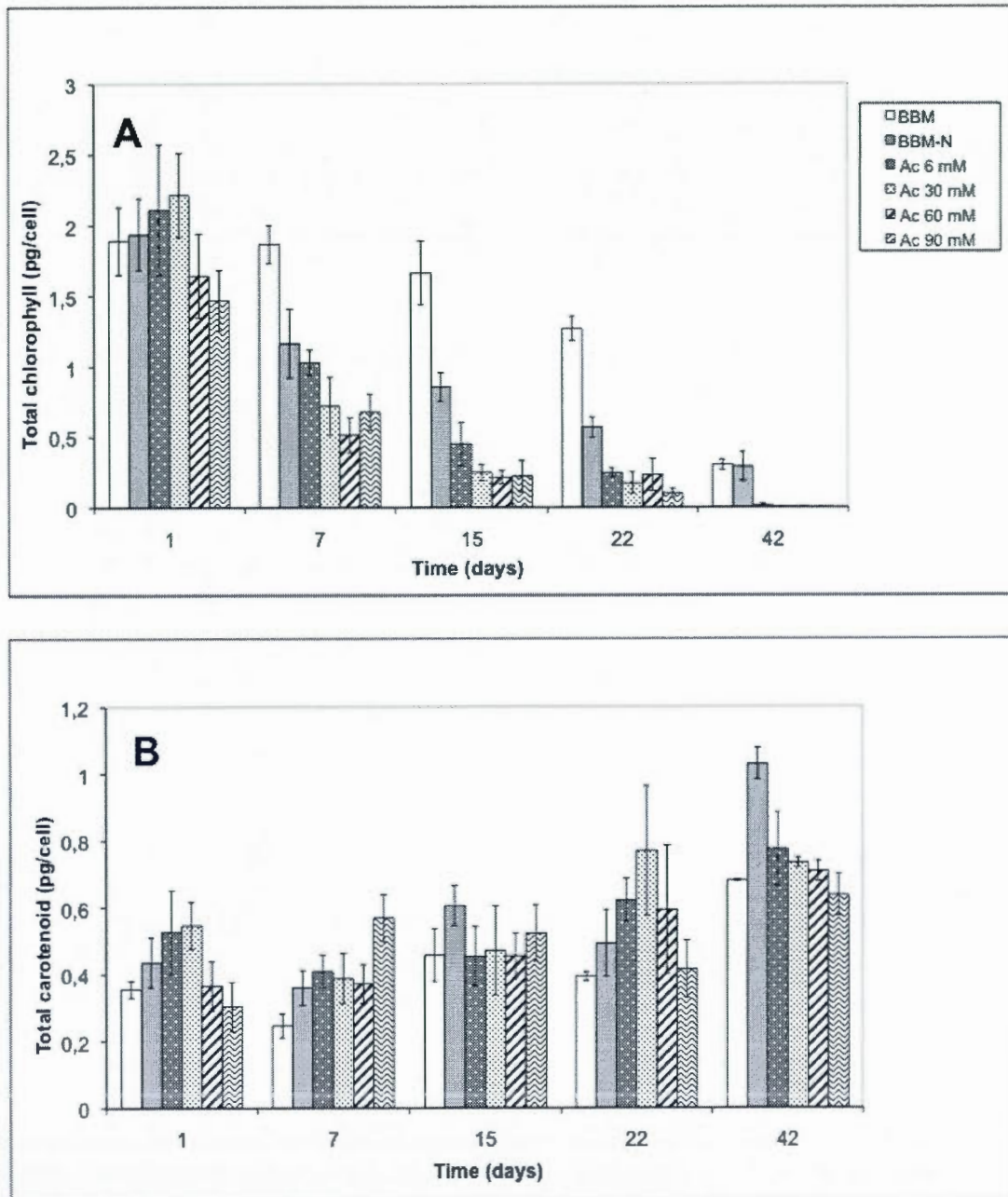
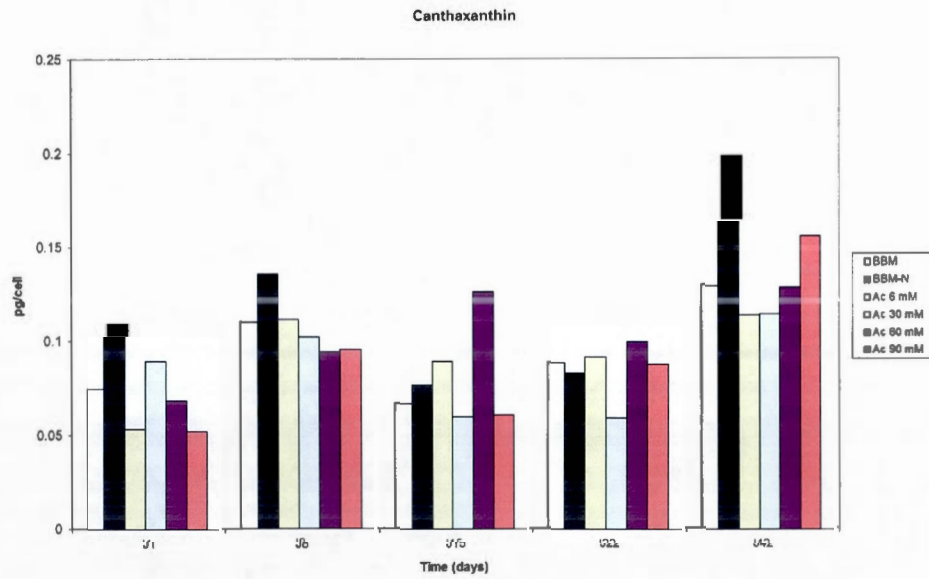
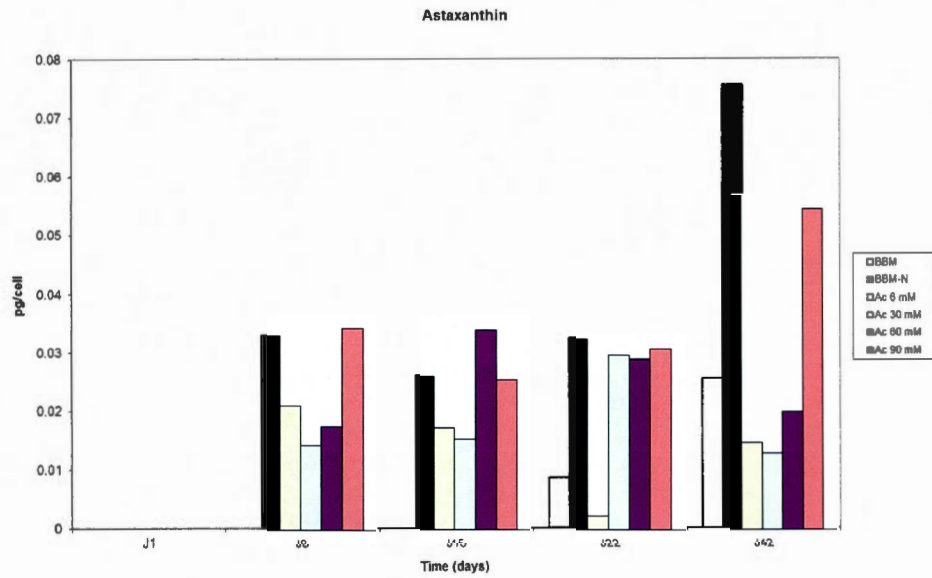


Figure 5.3: A) Change of total chlorophyll content (pg/cell) during 42 days for *Oocystis polymorpha*. Control in BBM media (clear bar); in BBM-N media (nitrate starvation) (grey bar); in BBM-N media with sodium acetate of 6 mM (more points bar), 30 mM (less points bar), 60 mM (oblique bar) and 90 mM (waved bar). B) Change of total carotenoids content (pg/cell) during 42 days for *Oocystis polymorpha*.



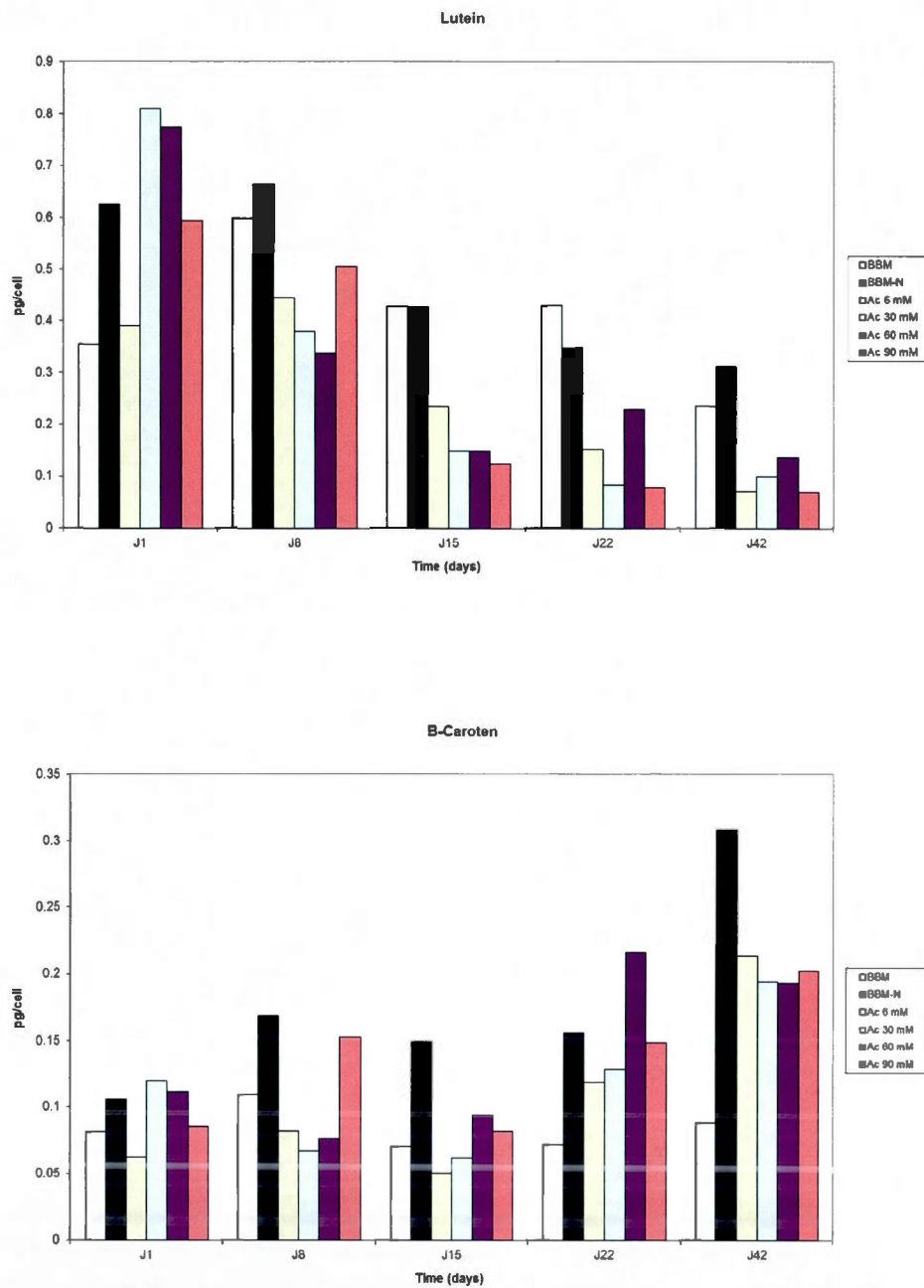
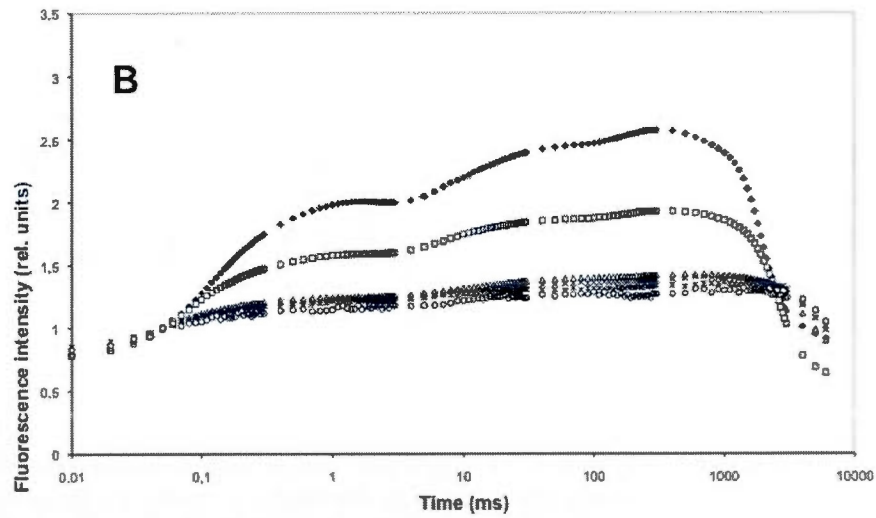
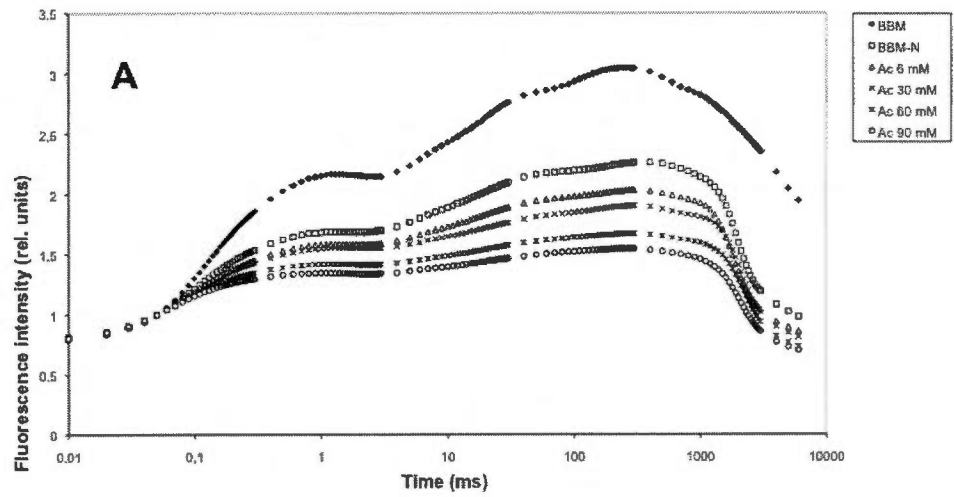


Figure 5.4: Change of carotenoids pigment astaxanthin, canthaxanthin, lutein and β -caroten by HPLC analysis for *Oocystis polymorpha*, during 42 days.



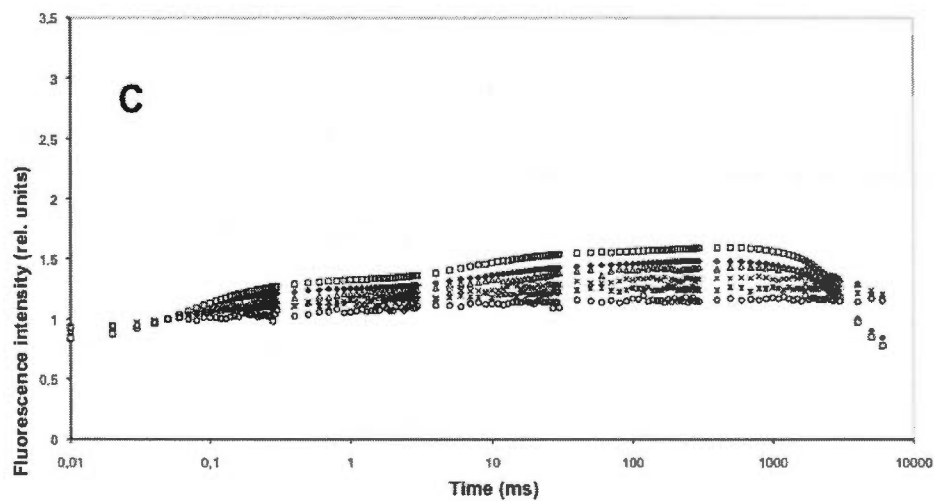


Figure 5.5: Fluorescence change (rapid kinetic) for *Oocystis polymorpha* measured with PEA. Kinetics normalized by O fluorescence level. Control in BBM media (◆); in BBM-N media (nitrate starvation) (■); in BBM-N media with sodium acetate of 6 mM (▲), 30 mM (x), 60 mM (ж) and 90 mM (o). A) at day 1, B) at day 22, C) at day 42.

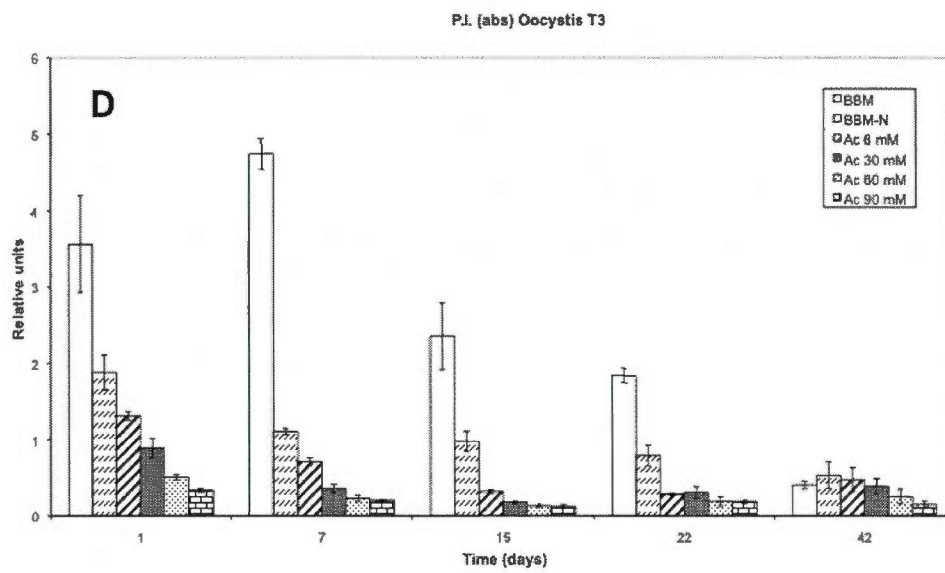


Figure 5.6: Change of the PSII performance index during 42 days under different conditions.

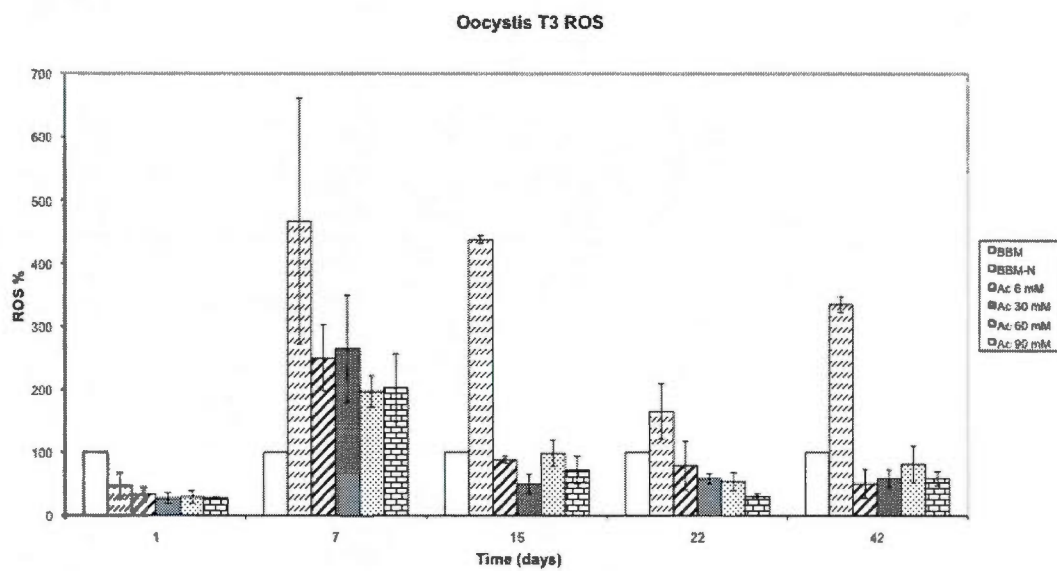


Figure 5.7: The production of reactive oxygen species (ROS) for *Oocystis polymorpha* during 42 days of experiment.

CHAPITRE VI

CAROTENOID PRODUCTION AND CHANGE OF PHOTOSYNTHETIC FUNCTIONS IN *SCENEDESMUS SP.* EXPOSED TO NITROGEN-LIMITATION AND ACETATE TREATMENT

Laura Pirastru¹, Mohamed Darwish², Fong Lam Chu³, François Perreault¹, Louka Sirois¹,
Lekha Sleno^{1,3}, Radovan Popovic^{1*}

¹ Chemistry Department, Université du Québec à Montréal (UQAM), P.O. Box. 8888,
Downtown Station, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

² National Research Center, Cairo, Egypt

³ Pharmaqam, UQAM, Montreal, Quebec, Canada.

* Corresponding author at: University of Quebec in Montreal, P.O. Box 8888, Downtown
Station, Montréal, QC, Canada H3C 3P8. Tel.: +1 514 987 3000x8467; fax: +1 514 987
4054. E-mail address: popovic.radovan@uqam.ca

Published in Journal of Applied Phycology, vol. 24, p.117-124, 2012.

Contribution dans ce chapitre: j'ai participé au travail de laboratoire et contribué à
l'obtention des résultats.

6.1 ABSTRACT

Under stress conditions, some microalgae up-regulate certain biosynthetic pathways leading to the accumulation of specific compounds. For example, changing nutrient composition can induce stress in algae's physiological activities which may trigger an intense increase in carotenoid production. In this study, the change of photosynthetic functions and carotenoid production in the green microalga *Scenedesmus* sp. was investigated when algal cultures were exposed to conditions including limited nitrogen content with the addition of sodium acetate salt. Microalgal cultures were treated for 18 days under higher irradiance conditions. We observed a decrease of chlorophyll content induced concomitantly with a decline of Photosystem II and I photochemistry. At the same time, important increase in carotenoid content was detected. By using high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis, we found that secondary carotenoids astaxanthin and canthaxanthin were accumulated compared to controls. During the process of carotenoid accumulation, chlorophyll degradation was found in addition to a strong decrease in photosynthetic electron transport. Such changes may be associated with the structural reorganisation of the photosynthetic apparatus and can be a useful indicator of secondary carotenoid accumulation in algal cultures.

Keywords : photosynthesis functions; *Scenedesmus* sp.; secondary carotenoids; acetate treatment; nitrogen limitation; HPLC.

Abbreviations : PSII, PSI - Photosystem II and I; F_0 , F_M , F_V - minimum, maximum and variable fluorescence in dark-adapted cultures; F_S , F'_M - steady-state and maximum fluorescence in light-adapted cultures, maximum photochemical quantum yield of PSII - $\Phi_{MII} = (F_M - F_0)/F_M$; operational quantum yield of PSII - $\Phi'_{MII} = (F'_M - F_S)/F'_M$; photochemical quenching of fluorescence - $qP = (F'_M - F_S) / (F'_M - F'_0)$; non- photochemical quenching of fluorescence - $NPQ = (F_M - F'_M) / F'_M$; P700 transmittance change - $\Delta P700$; PAM - Pulse-Amplitude-Modulated; HPLC - High Performance Liquid Chromatography; SPE - solid phase extraction; MTBE - methyl tert-butyl-ether; MeOH -methanol.

6.2 RÉSUMÉ

Sous des conditions de stress, certaines espèces de microalgues entreprennent des biosynthèses menant à la formation de composés spécifiques. Par exemple, un changement en nutriments dans la composition du milieu de culture peut induire un stress physiologique chez l'algue qui provoquera une augmentation significative au niveau de la production de caroténoïdes. Dans cette étude, le changement des fonctions photosynthétiques et la production de caroténoïdes chez la microalgue *Scenedesmus sp.* ont été étudiés alors que les cultures d'algues étaient exposées à une limitation en azote (nitrates) et à l'ajout d'acétate de sodium. Les cultures ont subi 18 jours de traitements sous des conditions de plus forte intensité lumineuse qu'à l'ordinaire. Nous avons remarqué une diminution du contenu en chlorophylles provoqué en lien avec une diminution de l'activité photochimique des photosystèmes II et I. En même temps, une augmentation significative du contenu en caroténoïdes a été détectée. Grâce à des analyses par HPLC, nous avons trouvé que des caroténoïdes secondaires, l'astaxanthine et la canthaxanthine, s'étaient accumulés par rapport aux contrôles. Durant la caroténogénèse, une dégradation des chlorophylles a été observée en plus d'une forte diminution au niveau du transport photosynthétique des électrons. De tels changements peuvent être associés à la réorganisation structurale de l'appareil photosynthétique et peuvent s'avérer un indicateur utile de la formation et l'accumulation de caroténoïdes secondaires dans les cultures d'algues.

6.3 INTRODUCTION

When some species of microalgae are under stress, the synthesis and accumulation of different products can be induced. For example, physiological stress induced by nitrogen (N)-limitation, high salinity or strong light intensity may initiate intensive synthesis of secondary carotenoids (Bhosale 2004; Borowitzka *et al.* 1991). Recent studies indicated possibilities that microalgae may be used as a natural source of bioactive compounds, such as carotenoids, having high antioxidant properties. These products may have several applications in human or animal nutrition and pharmacology (Guerin *et al.* 2003; Higuera-Ciapara *et al.* 2006; Plaza *et al.* 2010). It is known that under normal physiological conditions, chloroplasts of Chlorophyceae synthesize chlorophylls *a* and *b* and primary carotenoids such as β -carotene, lutein, neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin (Jin *et al.* 2003). However, in some algae species exposed to physiological stress, cell metabolic pathway may produce important quantities of secondary carotenoids such as astaxanthin, canthaxanthin, equinenone or hydroxy-equinenone (Jin *et al.* 2006; Young 1993). In earlier studies, secondary carotenoid accumulation was shown when *Haematococcus* and *Chlorococcum* were exposed to chemical stress and/or higher irradiance (Boussiba *et al.* 1999; Lorenz and Cysewski 2000; Zhang and Lee 2001). For example, when alga *Haematococcus pluvialis* was exposed to nitrogen and phosphate starvation, the carotenoid content was increased up to 40 times (Boussiba *et al.* 1999). However, cultures of *H. pluvialis* showed slow growth rate, low biomass density and high sensitivity to contamination process (Hagen *et al.* 2001; Cysewski and Lorenz 2004). Other algae species, as *Scenedesmus*, has been found to have rapid growth and resistance to contamination process (Lee 2001; Skulberg 2004). They may, therefore, offer an advantage to be used in future studies for carotenoid production (Qin *et al.* 2008).

During the carotenoid accumulation process in *H. Pluvialis*, important changes were seen to occur in the function and structure of the photosynthetic apparatus (Torzillo *et al.* 2003). It appeared that intensive carotenoid synthesis was associated with the change of cell morphology, physiology and photosynthetic activity. Those changes associated with secondary carotenoid synthesis are still not well understood (Hagen *et al.* 2000; Zlotnik *et al.*

1993). Our preliminary investigation on the structural and functional change of the photosynthetic apparatus during carotenoid accumulation showed the possibility to use this change as an indicator of the state of carotenoid accumulation (data not shown). In the present study, *Scenedesmus sp.* was exposed to physiological stress (N-limitation and addition of acetate), which induced a change of functional and structural properties of the photosynthetic apparatus. These changes were used to indicate optimal accumulation of secondary carotenoids astaxanthin and canthaxanthin.

6.4 MATERIALS AND METHODS

6.4.1 Culture of algal species exposed to physiological stress conditions

The microalga *Scenedesmus sp.*, (identified by sequence analysis of the 18S ribosomal DNA, Canadian Phycological Culture Center, University of Waterloo) was grown in sterile BG11 liquid medium according to Rippka et al. (1979). The medium containing 1.5 g/L (17.6 mM) of nitrate was found to have optimal content of N for algal growth (Qu et al. 2008). Algae used in this experiment were cultured at 23°C in a 2L bottle bioreactor with bubbling air and under continuous low light intensity ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Green cells in exponential growth phase were harvested by centrifugation at 4000 g for 15 min in order to concentrate the cell culture. Carotenoid synthesis was induced when algal culture was exposed to N-limitation and acetate treatment under higher irradiance (in comparison with the lower intensity used for the physiological growth conditions). It has been shown earlier that in *H. pluvialis* under limited supply of nitrogen, carotenoid production was stimulated (Borowitzka et al. 1991; Boussiba et al. 1999). It has been found that under those conditions, the addition of sodium acetate and the increase of irradiance may further stimulate rapid carotenoid accumulation in *H. pluvialis* cultures (Kobayashi et al. 1993; Ladygin 2000; Steinbrenner and Linden, 2003; Wang et al. 2003). Before treatments, algae were washed with sterile ultrapure water and resuspended in BG11 medium without added nitrogen. In our previous investigation of nitrogen forms, we found that urea induced the most carotenoid accumulation (data not shown). Nitrogen content was reduced to 4.5 mM of N, added as urea.

Treatment of sodium acetate was performed at 6, 60 and 120 mM concentrations. We used two control treatments representing algal cultures without N and acetate, or with urea alone (4.5 mM of N) to indicate that carotenoid accumulation was not induced unless acetate was present. It appears that the presence of N and acetate was essential to stimulate carotenogenesis. The induction of carotenogenesis was performed in 120 mL erlenmeyers containing 50 mL of culture where the initial cell density was 15×10^6 cells mL^{-1} . Algal cultures were placed on an agitation plate (100 rpm) during 18 days under continuous irradiance ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 23°C. All treatments were done in triplicate. The analytical determinations were carried out every three days.

It is known that carotenoid synthesis may be induced by some fungi when algal cultures are exposed to acetate (Choudhari *et al.* 2008; Kuzina and Cerdà-Olmedo 2006). To avoid this possibility, algal cultures having 120 mM acetate and 4.5 mM N were maintained during 18 days in the dark. It was shown that there is no carotenoid synthesis since algal cultures were maintained under axenic conditions (fungi free cultures).

6.5 ANALYTICAL PROCEDURES

6.5.1 Determination of cell density, total chlorophylls, and total carotenoid content

Algal cell density was determined with a Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc) equipped with a 30 μm aperture. Chlorophyll *a*, *b* and total carotenoids were extracted from 100 μL of culture by using 1 mL 100% methanol with addition of glass beads (N° G-1759 type x 1000-1050 μ) and vortexed for 20 min to induce complete cell disruption. The extracts was heated at 65°C for 10 min and separated by centrifugation. Quantitative determination of chlorophyll and carotenoid content was performed according to Lichtenthaler (1987) by using a UV/VIS spectrometer (Lambda 40, Perkin Elmer).

6.5.2 Fluorescence measurements

Prior to fluorescence measurements, algal samples were dark-adapted for 15 min. For chlorophyll measurements, 3 mL of algal cells diluted to 5×10^6 cells per mL was placed in a 10x10 mm glass cuvette. During fluorescence measurements, algal samples were exposed to slow constant stirring. In this way, we obtained reproducible measurements with minimal impact of stirring on fluorescence (Cosgrove and Borowitzka 2006). Chlorophyll fluorescence yields at steady-state of electron transport were measured at room temperature by using dual-wavelength Pulse-Amplitude-Modulated fluorescence monitoring system equipped with an optical unit for suspension (Dual-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) according to Schreiber *et al.* (1986). The fluorescence F_O was evaluated by using a modulated blue light with a low intensity ($9 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to avoid the reduction of PSII primary electron acceptor, Q_A . The maximal fluorescence yield, F_M , was induced by a short saturating pulse of red light ($10\,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.3 s duration) which triggered the reduction of all Q_A . The value of F_S fluorescence yield was determined at steady state of variable fluorescence obtained when algal samples were exposed continuously (15 min) to $216 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red actinic light. The maximal fluorescence yield, F'_M , was determined by inducing a saturating pulse ($10\,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.3 s duration) at steady-state of fluorescence when algal cells were exposed to continuous actinic light illumination. The maximal PSII quantum yield, indicating efficiency of light energy transfer to PSII primary acceptor Q_A , was determined as the ratio $\Phi_{MII} = (F_M - F_O)/F_M$ (Kitajima and Butler 1975). According to Genty *et al.* (1989), at steady state of fluorescence yield (10 min under continuous actinic light), the operational quantum yield was evaluated as the ratio $\Phi'_{MII} = (F'_M - F_S)/F'_M$. The photochemical quenching of fluorescence qP, $qP = (F'_M - F_S)/(F'_M - F'_O)$ was measured according to Schreiber *et al.* (1986). The energy dissipation which was not used in PSII photochemistry was determined by fluorescence quenching effect by using the ratio $NPQ = (F_M - F'_M)/F'_M$ (Bilger and Björkman 1990). For the evaluation of PSI activity, a volume equivalent to 10×10^6 cells was filtered in a glass fiber prefilter and used for the measurement of P700 flash-induced transmittance change as in Perreault *et al.* (2009). By using a Dual-PAM 100 (Walz), the maximal transmittance change induced by a short saturating flash ($10\,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.3 s duration), indicating the amount of

photochemically active PSI reaction center ($\Delta P700$). Measurements were done according to Klughammer and Schreiber (1994).

6.5.3 Carotenoid extraction and HPLC analysis

For carotenoid determination, control and treated-samples were washed to remove salts and lyophilized. A quantity of 5 mg of lyophilized algae was kept for extraction with a mixture of dichloromethane-methanol (75:25) (75% CH_2Cl_2 25% MeOH). The extraction was repeated three times until pellet was left colorless. The samples were dried under vacuum and then saponified with 0.11 M sodium hydroxide (NaOH) alkaline solution for 6 hours to hydrolyze the astaxanthin esters (Yuan and Chen 1999). The samples were then cleaned-up with solid phase extraction (SPE) on the Water Oasis HLB 30 mg cartridges (Milford, Massachusetts, USA). Samples were loaded and then cartridges washed with methanol-water (75:25). Carotenoids were eluted with a mixture of methyl tert-butyl-ether (MTBE)-methanol-water (60:37:3) containing 3 mM ammonium acetate.

Carotenoid analyses were conducted by using an Agilent 1200 series high performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with UV-Vis diode array detector (Santa Clara, California, USA). Liquid chromatography was performed and optimized on a Phenomenex Gemini-NX C18 column (Torrance, California, USA) with 150 mm x 2 mm dimensions and filled with 3 μm particles. Absorbance monitoring measurements were performed at 450 nm. The HPLC separation used the following mobile phases: A: 90% MeOH, 10% H_2O , 10 mM ammonium acetate, B: 85% MTBE, 15% MeOH, and with the following gradient: (min/% B): 0-2/5%, 20/65%, 22-27/85%, at a flow rate of 0.2 mL/min and column temperature of 30°C. Carotenoid identification was performed by comparing the retention time with available standards: astaxanthin (following saponification of AstaReal L10 from BioReal – Sweden), canthaxanthin, lutein and β -carotene (Sigma-Aldrich). Internal standard, β -apo-8'-carotenal, was used for relative quantitative purposes.

6.6 RESULTS

Cultures exposed to N-limitation (4.5 mM) and the addition of sodium acetate showed a change of pigment composition after 12 days of treatment. The most rapid change was noticed for cultures having 60 and 120 mM of acetate and 4.5 mM N. After 18 days of treatment, *Scenedesmus sp.* cultures showed a gradual change of pigment composition with acetate concentration. Cultures with 60 and 120 mM acetate only, without N, started to produce carotenoids slowly compared to those treated with acetate and urea. The cultures treated with only 4.5 mM N (control) did not change color after 18 days, however, those with only 6 mM acetate started to lightly change pigment composition at the end of treatment. The control cultures (no N-limitation or acetate treatment) did not show increased carotenoid production. Visual presentation of the pigment transformations is presented in Fig 1. In *Scenedesmus* cultures treated for 18 days to low concentrations of N, in addition to 120 mM of acetate, astaxanthin and canthaxanthin were seen to accumulate, as seen in Fig 2. However, the lutein peak, which was present in control, did not increase in the cultures treated with 120 mM of acetate and 4.5 mM N. Also, we supposed that the peak indicated on the chromatogram by 1' may represent a potential isomer of astaxanthin, as indicated by the mass spectrometry (data not shown), details for which will be described in a subsequent publication.

After 18 days of treatment, the two control samples did not show any change in cell density. However, algal cultures having acetate concentration from 6 to 120 mM in the presence of N (4.5 mM) increased cell density by three times (Fig. 3A). For the pigment composition, a large change was found when cultures with acetate and low N concentration treatments were compared with controls. The total chlorophyll content per cell was drastically decreased by 10 and 200 times when cultures were exposed to 60 and 120 mM acetate, respectively, (in presence of 4.5 mM N). At the same time when cultures were exposed to 120 mM acetate and 4.5 mM N, carotenoid content was increased by 6 times (data not shown). Under these conditions, the ratio carotenoid/chlorophyll was increased by 9 and 26 times respectively (Fig. 3B).

For *Scenedesmus* cells exposed to 120 mM of acetate, we investigated the electron transport activity of PSII and PSI. Fluorescence yield (F_v), obtained under flash, from dark-adapted algal cells showed that some PSII reaction centers were conserved, even after 18 days of treatment. However, these reaction centers do not participate in electron transport activity since saturating flash induced under actinic light conditions did not indicate any increase of variable fluorescence yield. When the PAM kinetics of 120 mM acetate-treated algae was compared to controls, it was evident that in *Scenedesmus* cells after 18 days of acetate treatment, with or without N, PSII-PSI electron transport was inhibited. Under this treatment Φ_{MII} was highly decreased and it appeared that PSI activity ($\Delta P700$) was also affected (Fig 5). Indeed, operational quantum yield of PSII (Φ'_{MII}) and photochemical quenching (qP) activity were not found (value close to 0) while energy dissipation through non-photochemical pathway (NPQ) was strongly increased (Fig 6).

6.7 DISCUSSION

Scenedesmus sp. exposed to low concentrations of N, in addition to 120 mM of acetate accumulated high amount of carotenoids, among which were the highly antioxidant pigments astaxanthin and canthaxanthin. According to Jin *et al.* (2006), astaxanthin and canthaxanthin represent products of secondary pathway biosynthesis. Astaxanthin accumulates outside of the chloroplast, in lipid vesicles and does not interfere directly with photosynthetic processes (Boussiba 2000). However, synthesis and accumulation of carotenoids are associated with change of active photosynthetic apparatus, as a consequence of changes in the algal physiological state induced by intense carotenoid synthesis.

The algal cultures having acetate concentration from 6 to 120 mM with low nitrogen concentration showed a slight increase in cell density and a large change in the pigment composition compared to controls. Total chlorophyll content was decreased and simultaneously the largest increase of total carotenoid content was seen with treatment of 120 mM acetate and 4.5 mM of N. Acetate treatment after 18 days induced a large increase in the ratio between Carotenoid/Chlorophyll. The decrease of chlorophyll content may indicate

important structural reorganisation of the photosynthetic apparatus (Kim *et al.* 1993). It seems evident that such a change is linked to the structural modification of PSII-PSI complexes during this transformation. Earlier work has shown that alteration of PSII-PSI protein complexes during carotenogenesis will change the energy transfer process from antenna complex from PSII to PSI. The decrease of the amount of chlorophyll in chloroplast transforming into chromoplast causes a decrease of photosynthesis as indicated by oxygen evolution activity (Juneau *et al.* 2002). Accumulation of carotenoids may indicate specific secondary carotenoid biosynthetic pathways. Such synthesis of carotenoids in alga *H. pluvialis* and its accumulation has been shown to indicate the existence of the biosynthetic pathway occurring in the cytoplasm (Jin *et al.* 2006). Carotenoids obtained by this biosynthetic pathway are considered to be cellular end-products (Hagen *et al.* 1994).

Concerning the electron transport activity of PSII and PSI in *Scenedesmus* cells exposed to 120 mM of acetate, with or without N, the values of variable fluorescence yield (F_v) showed that some PSII reaction centers were conserved, even after 18 days of treatment. However, these reaction centers do not participate in electron transport, since when alga is exposed to saturating flash under actinic light conditions, the variable fluorescence yield did not increase. Therefore, PSII-PSI electron transport was not functional. After 18 days of treatment (120 mM of acetate + 4.5 mM N), Φ_{MII} was highly decreased, operational quantum yield of PSII (Φ'_{MII}) was not found while energy dissipation through non-photochemical pathway (NPQ) was increased. At the same time the PSI activity ($\Delta P700$) was strongly decreased. The increase of NPQ was probably part of photo-inhibition protection mechanism linked to remaining PSII reaction centers. Our interpretation is supported by earlier findings concerning photo-protection of PSII (Juneau *et al.* 2002; Wang *et al.* 2003). We indicate here that functional properties of the photosynthetic apparatus are strongly altered during acetate treatment causing carotenoid synthesis. It seems that photosynthetic parameters related to electron transport as Φ'_{MII} , qP and $\Delta P700$ are indicative for an alteration of photosynthetic apparatus during carotenoid accumulation. We notice that NPQ is the most sensitive parameter which can serve as an indicator for carotenoid accumulation.

We showed here that the addition of sodium acetate in cultures of *Scenedesmus sp.*, with or without N, leads to carotenoid accumulation, as seen earlier for *H. pluvialis* exposed to 10 mM acetate (Hagen *et al.* 2001). It appeared that *Scenedesmus sp.* requires higher concentrations of sodium acetate, between 60 and 120 mM, to induce accumulation of astaxanthin and canthaxanthin. An explanation why such high concentration of acetate is needed to induce carotenoid biosynthesis could be that acetate can be used in some microalgae as a carbon source for the formation of isoprenoids as precursor of carotenoids (Ladygin 2000).

6.8 CONCLUSION

In this study, we have shown that during astaxanthin and canthaxanthin accumulation, in the presence of sodium acetate and limited nitrogen supply, the photosynthetic activity of *Scenedesmus* algal cells was deteriorated. A large decrease of PSII photochemical activity was evident when algal cultures were exposed to high concentration of acetate. Therefore, PSII photosynthetic electron transport was strongly inhibited when *Scenedesmus sp.* was exposed to 120 mM acetate and 4.5 mM of N during 18 days. However, PSI activity was absent already at 12 days of treatment. Such functional change of photosynthetic apparatus was associated with an increase of energy dissipation via non-photochemical pathway. We indicated that fluorescence parameters can be a useful indicator for carotenoid accumulation.

Acknowledgements : This work was supported by NSERC discovery grant of R. Popovic. M Darwish is supported by an NRC post-doctoral fellowship. F. Perreault is supported by a NSERC Ph.D fellowship.

6.9 REFERENCES

- Bilger W, Björkman. 1990. "Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*". *Photosynth Res* 25:173-185
- Bhosale P. 2004. "Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms". *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 351-361
- Borowitzka MA, Huisman JM, Osborn A. 1991. "Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1- Effects of nutrients on growth and cell type". *J Appl Phycol* 3: 295-304
- Boussiba S, Bing W, Yuang J-P, Zarka A, Chen F. 1999. "Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses". *Biotech Letters* 21: 601-604
- Boussiba S. 2000. "Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response". *Physiol Plant* 108: 111-117
- Choudhari SM, Ananthanarayan L, Singhal RS. 2008. "Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of β -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896". *Bioresource Technology* 99: 3166-3173
- Cosgrove J, Borowitzka, M. 2006. "Applying Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometry to microalgae suspension: stirring potentially impacts fluorescence". *Photosynth Res* 88: 343-350
- Cysewski GR and Lorenz RT. 2004. "Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-species of high potential". In A Richmond (ed), "Handbook of Microalgal Culture". *Biotechnology and Applied Phycology* pp 281-288
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *B.B.A* 990: 87-92

- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. 2003. "Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition". *Trends in Biotech* 21(5): 210-216
- Hagen C, Braune W, Björn LO. 1994. "Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (volvocales). III. Action as a "sunshade"". *J Phycol* 30: 241-248
- Hagen C, Grünewald K, Schmidt S, Müller J. 2000. "Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis". *Eur. J. Phycol.*, 35: 75-82
- Hagen C, Grünewald K, Xyländer M, Rothe E. 2001. "Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*". *J Appl Phycol* 13: 79-87
- Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. 2006. "Astaxanthin: A review of its chemistry and applications". *Critical Rev in Food Sci and Nutr* 46: 185-196
- Jin ES, Polle JEW, Lee HK, Hyun SM, Chang M. 2003. "Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application". *J Microbiol Biotechnol* 13: 165-175
- Jin E, Lee C-G, Polle JEW. 2006. "Secondary carotenoids accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology". *J Microbiol Biotechnol* 16(6): 821-831
- Juneau P, Le Lay P, Böddi B, Samson G, Popovic R. 2002. "Relationship between the structural and functional changes of the photosynthetic apparatus during chloroplast-chromoplast transition in flower bud of *Lilium longiflorum*". *Photochem Photobiol* 75(4): 377-381
- Kim JH, Glick RE, Melis A. 1993. "Dynamics of photosystem stoichiometry adjustment by light quality in chloroplasts". *Plant Physiol* 102: 181-190
- Kitajima M, Butler WL. 1975. "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone". *Biochim Biophys Acta* 376:105-115

- Klughammer C, Schreiber U. 1994. "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm". *Planta* 192: 261-268
- Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. 1993. "Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*". *Appl Environ Microbiol* 59(3): 867-873
- Kuzina V, Cerdà-Olmedo E. 2006. "Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*". *Appl Environ Microbiol* 72(7): 4917-4922
- Ladygin VG. 2000. "Biosynthesis of carotenoids in the chloroplasts of algae and higher plants". *Russian Journal of Plant Physiology* 47(6): 796-814
- Lee Y-K. 2001. "Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential". *J Appl Phycol* 13: 307-315
- Lichtenthaler HK. 1987. "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes". *Methods Enzymology* 148: 349-382
- Lorenz RT, Cysewski GR. 2000. "Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin". *Tibtech* 18: 160-167
- Perreault F, Ait Ali N, Saison C, Popovic R, Juneau P. 2009. "Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*". *J Photochem Photobiol B*, 96: 24-29
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Herrero M, Señoráns FJ, Ibáñez E. 2010. "Screening for bioactive compounds from algae". *J of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 51: 450-455
- Qin S, Liu G-X, Hu Z-Y. 2008. "The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae)". *Process Biochemistry* 43: 795-802
- Qu C-B, Wu Z-Y, Shi X-M. 2008. "Phosphate assimilation by *Chlorella* and adjustment of phosphate concentration in basal medium for its cultivation". *Biotech Letters* 30: 1735-1740

Rippka R, Deruelles JB, Herdman M, Waterbury B, Stanier RY. 1979. "Assignments, strain history and properties of pure cultures of Cyanobacteria". *J Gen Microbiol* 111: 1-61

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth Res* 10: 51-62

Skulberg OM. 2004. "Bioactive chemicals in microalgae". In A Richmond (ed), "Handbook of Microalgal Culture". *Biotechnology and Applied Phycology* pp 485-512.

Steinbrenner and Linden. 2003. "Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control". *Plant Molecular Biology* 52: 343-356.

Torzillo G, Goksan T, Faraloni C, Kopecky J, Masojídek J. 2003. "Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage". *J Appl Phycol* 15: 127-136

Wang B, Zarka A, Trebst A, Boussiba S. 2003. "Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance". *J Phycol* 39: 1116-1124

Young AJ. 1993. "Factors that affect the carotenoid content and composition of higher plants and algae". In "Carotenoids in Photosynthesis". Young AJ, Britton G (eds), *Chapman and Hall*, London, pp 160-205

Yuan J-P, Chen F. 1999. "Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification". *J Agric Food Chem* 47: 31-35

Zhang D-H, Lee Y-K. 2001. "Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. strain MA-1". *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 537-540

Zlotnik I, Sukenik A, Dubinsky Z. 1993. "Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*". *J Phycol* 29: 463-469

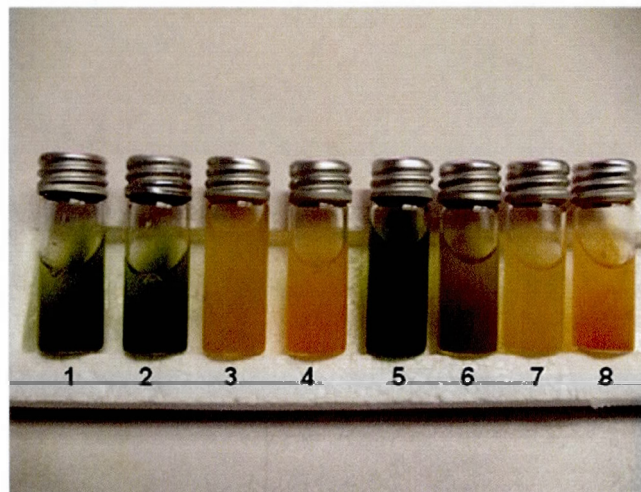


Fig. 6.1 : Visual appearance of *Scenedesmus sp.* cultures exposed 18 days to different treatments: 1 (- N, - Acetate); 2 (+N, +6 mM Acetate); 3 (+N, +60mM Acetate); 4 (+N, +120 mM Acetate); 5 (+N, -Acetate); 6 (-N, +6 mM Acetate); 7 (-N, +60mM Acetate); 8 (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM.

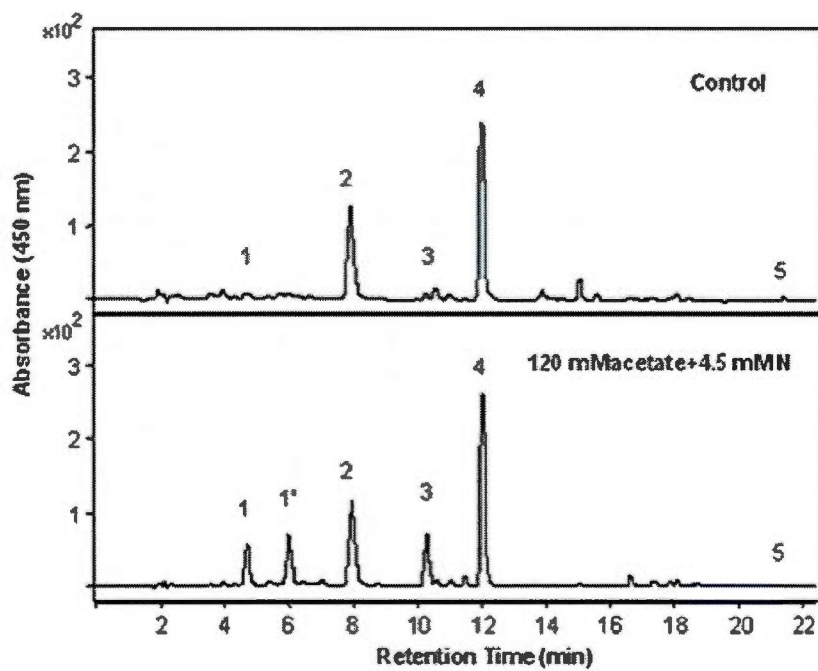


Fig. 6.2 : Carotenoids content in *Scenedesmus sp.* exposed to 120 mM sodium acetate and 4.5 mM N for 18 days compared to control sample. Chromatogram of carotenoids was generated by HPLC-UV/VIS monitored at 450 nm. Carotenoids are indicated by numbers: (1) Astaxanthin, (1') Astaxanthin isomer, (2) Lutein, (3) Canthaxanthin, (4) β -Apo-8'-carotenal (Internal Standard), (5) β -carotene.

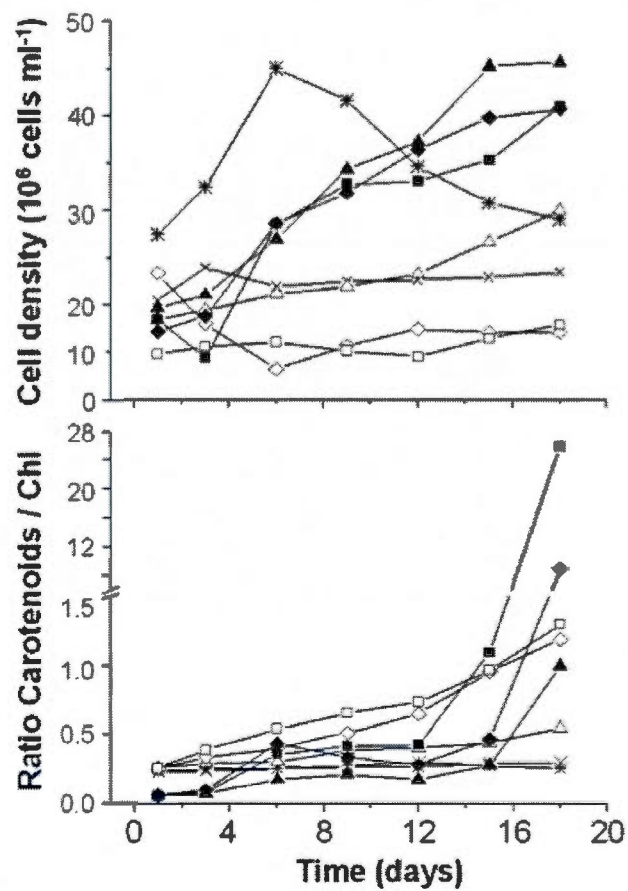


Fig. 6.3 : The change of cell density and ratio carotenoid/chlorophyll in cultures of *Scenedesmus sp.* following 18 days of exposure to different treatments: x (- N, - Acetate); □ (+N, -Acetate); Δ (-N, +6 mM Acetate); ◇ (-N, +60 mM Acetate); □ (-N, +120 mM Acetate); ▲ (+N, +6 mM Acetate); ◆ (+N, +60 mM Acetate); ■ (+N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM.

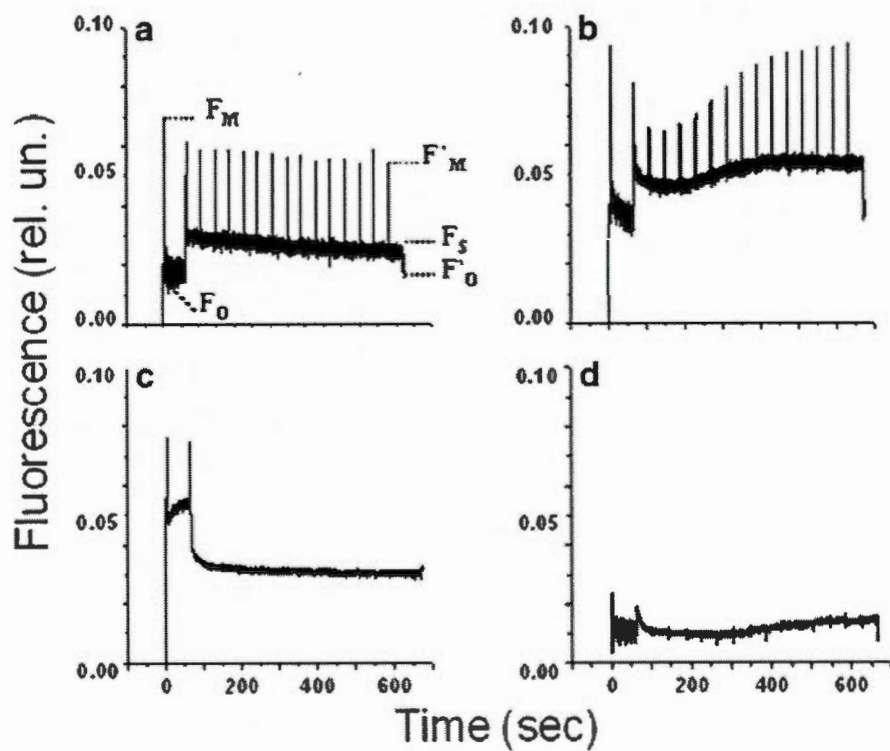


Fig. 6.4 : Modulated fluorescence kinetics of *Scenedesmus sp.* cultures following 18 days of exposure to different treatments: A (-N, - Acetate); B (+N, -Acetate); C (+N, +120 mM Acetate); D (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM.

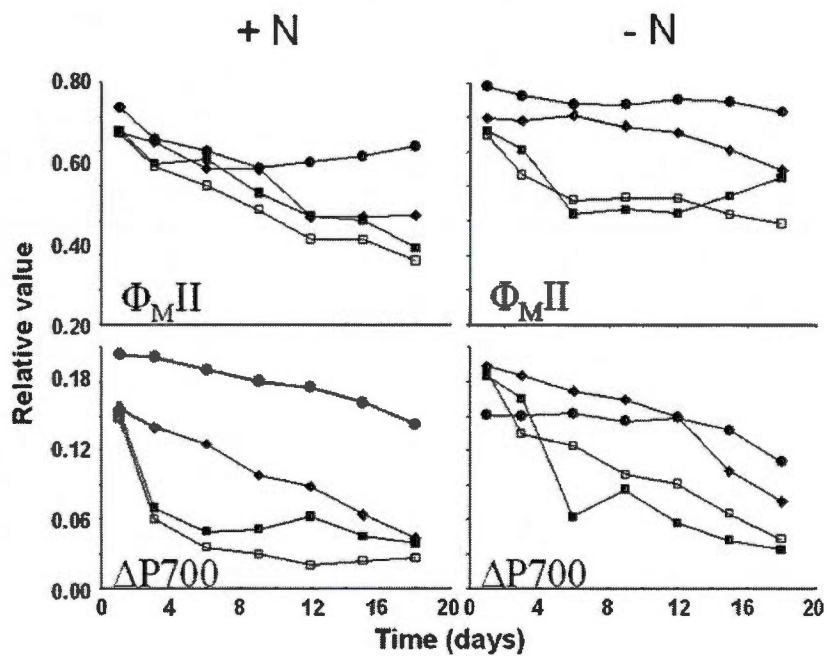


Fig. 6.5 : The change of Φ_{MII} and $\Delta P700$ of *Scenedesmus sp.* cultures exposed during 18 days to different concentrations of acetate. +N: ● (+N, - Acetate); ◆ (+N, +6 mM Acetate); ■ (+N, +60 mM Acetate); □ (+N, +120 mM Acetate); -N: ● (-N, - Acetate); ◆ (-N, +6 mM Acetate); ■ (-N, +60 mM Acetate); □ (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM. During all treatments light irradiance was the same (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

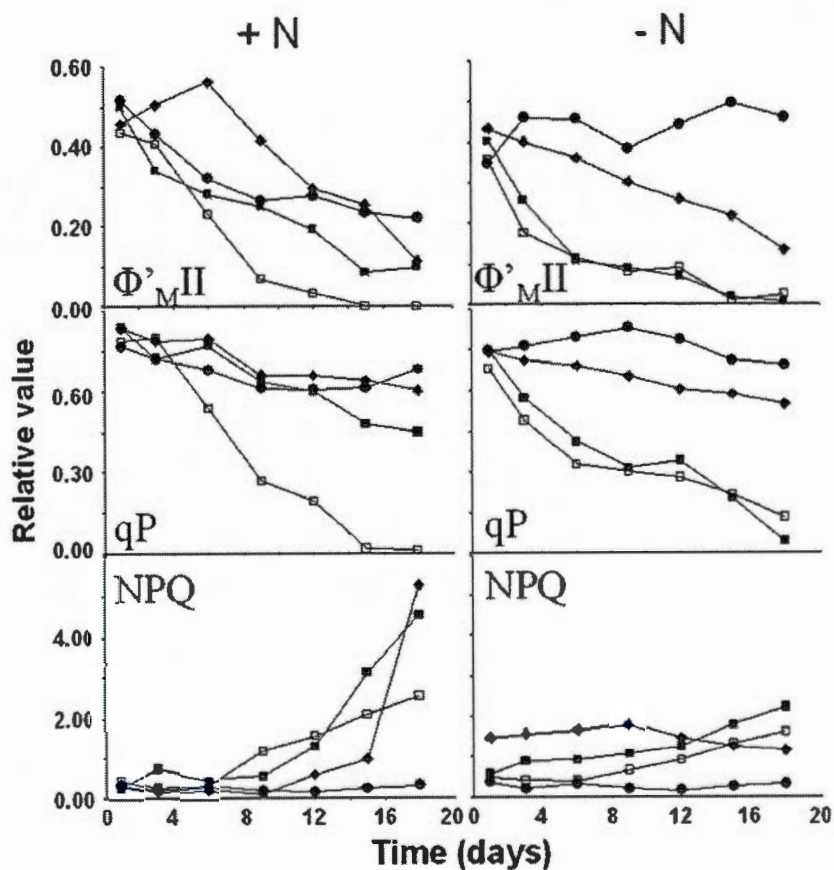


Fig. 6.6 : The change of Φ'_{MII} , qP and NPQ of *Scenedesmus sp.* cultures exposed during 18 days to different concentrations of acetate. +N: ● (+N, - Acetate), ◆ (+N, +6 mM Acetate), ■ (+N, +60 mM Acetate); □ (+N, +120 mM Acetate); -N: ● (-N, - Acetate); ◆ (-N, +6 mM Acetate); ■ (-N, +60 mM Acetate); □ (-N, +120 mM Acetate). In all treatments, where nitrogen was present, concentration was 4.5 mM. During all treatments light irradiance was the same ($150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

CHAPITRE VII

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les microalgues sont parmi les organismes les plus prometteurs pour la production de molécules d'intérêt comme les caroténoïdes et les biocarburants. Cette source naturelle de bioproduits est tout-à-fait renouvelable, et pourrait s'avérer le combustible de troisième génération, enlevant ainsi une certaine pression sur les ressources conventionnelles utilisées de nos jours comme le pétrole et le gaz naturel.

D'un côté plus nutritionnel, les algues et microalgues peuvent biosynthétiser, sous des conditions contrôlées, plusieurs types de caroténoïdes, molécules essentielles pour notre métabolisme et qui doivent être puisées dans l'alimentation. La nutraceutique (ajout de substances à haute valeur nutritive dans des aliments conventionnels) à base de microalgues est donc un domaine qui devrait être en plein essor d'ici quelques années. Dans le présent projet, il a été possible de démontrer la production de caroténoïdes par deux espèces d'algues vertes, et l'étude des mécanismes derrière cette biosynthèse peut nous amener à mieux comprendre l'ensemble du processus physiologique menant à la caroténogénèse. En effectuant des expériences sur plusieurs souches algales, et avec différents traitements, il sera possible d'en sélectionner par la suite les plus productives et conviviales dans l'optique d'en faire la production commerciale. Bien sûr, il y a une grande différence entre la recherche au laboratoire et la culture dans de grands photobioréacteurs ou en bassins, voire la production industrielle. Les deux secteurs doivent être soutenus.

Il apparaît évident que les microalgues mériteraient à être plus étudiées et cultivées afin de mettre sur pied des industries innovatrices, plus vertes et à la fois compétitives sur le marché.

L'article de Pirastru *et al.* (2012) constituant le chapitre VI ainsi que le chapitre V du présent mémoire mettent en évidence des liens étroits entre le changement dans l'activité photosynthétique des microalgues et la biosynthèse de molécules de protection, les caroténoïdes. En comprenant mieux les mécanismes physiologiques qui mènent les microalgues à mettre en veille leur activité photosynthétique au profit d'une protection contre les dommages que pourraient causer l'environnement modifié, il pourra devenir plus aisé d'en contrôler les paramètres, et donc d'en accroître le rendement. En d'autres mots, en connaissant plusieurs espèces d'algues qui réagissent plus ou moins à différents traitements, il sera possible de récolter en quantité satisfaisante différents caroténoïdes. Ce, bien sûr, si la technologie se perfectionne aussi : rappelons que ce qui survient en erlenmeyers n'est pas garant de ce qui pourrait survenir en photobioréacteurs de plusieurs litres.

Enfin, *Scenedesmus sp.* et *Oocystis polymorpha* se présentent en candidates tout-à-fait intéressantes pour la poursuite des recherches. Les deux microalgues, d'un entretien plutôt facile, ont démontré une bonne résistance aux traitements imposés, tout en passant par une gamme variée dans leur biosynthèse de caroténoïdes d'intérêt.

RÉFÉRENCES

- Andersen R. A. (editor). 2005. "Algal culturing techniques". *Academic Press Publications*, Elsevier, 565 p.
- ARVAM – Agence pour la Recherche et la Valorisation Marines. 2012 (date de consultation au www.arvam.com/spip.php?article19). « Les microalgues, la biotechnologie de demain ». *La Phytobank : un outil indispensable pour la valorisation des microalgues à la Réunion*. Centre de Recherches Technologiques, Océanologie. Document d'information, 8 p.
- Barsanti, Laura et Paolo Gualtieri. 2006. « Algae – Anatomy, biochemistry, and biotechnology ». *CRC Press, Taylor & Francis Group*. 301 p.
- Bélaïr, Viviane, Nicolas Bertrand et Mohammed Benyagoub. 2012. "Aspects technologique et commercial de la valorisation industrielle des microalgues dans les secteurs nutraceutique et énergétique". *CRIBIQ – Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec*. Document d'information, 130 p.
- Bhattacharya, Debashish et Linda Medlin. 1998. "Update on Evolution –Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants". *Plant Physiology*, vol. 116, p. 9-15.
- Bhosale, P. 2004. "Mini-review - Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 63, p. 351-361. Springer-Verlag.
- Blackburn, Susan et Naomi Parker. 2005. "Microalgal life cycle dynamics: encystment and excystment". In Andersen, R. A. (ch.24). "Algal culturing techniques". *Academic Press Publications*, Elsevier, 565 p.
- Blankenship, Robert E. 2002. "Molecular mechanisms of photosynthesis". *John Wiley & Sons*. 336 p.
- Bock, Christina, Lothar Krienitz et Thomas Pröschold. 2011. "Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including

- description of seven new species". *Fottea*, vol. 11, no. 2, p. 293-312. Czech Phycological Society.
- Borowitzka, Michael A. 1999. "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters". *Journal of Biotechnology*, vol. 70, p. 313-321. Elsevier.
- Boussiba, S. 2000. "Mini-review – Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluviialis* : Cellular physiology and stress response". *Physiologia Plantarum*, vol. 108, p. 111-117.
- Brack, André et Paul Mathis. 2000. "La Chimie du vivant – de la protéine à la photosynthèse". *Éditions Le Pommier série Quatre à Quatre*, Le Pommier-Fayard, France, 157 p.
- Buchanan, Bob B., Gruissem Wilhelm et Russell L. Jones (éditeurs). 2001. « Biochemistry & Molecular Biology of Plants ». *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, Maryland, 1367 p.
- Cadoret, Jean-Paul et Olivier Bernard. 2008. « La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis ». *Journal de la Société de Biologie*, vol. 202, p. 201-211.
- Ceron, M. C., M. C. Garcia-Malea, J. Rivas, F. G. Acien, J. M. Fernandez, E. Del Rio, M. G. Guerrero et E. Molina. 2007. « Antioxidant activity of *Haematococcus pluviialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content ». *Applied Microbial and Cell Physiology, Appl Microbiol Biotechnol* vol. 74, p. 1112-1119. Springer.
- Dah-Wei Tsai, David, Rameshprabu Ramaraj et Paris Hongley Chen. 2012. « Growth condition study of algae function in ecosystem for CO₂ bio-fixation ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, vol. 107, p.27-34.
- Del Campo, J. A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M. À., Rivas, J. et M. G. Guerrero. 2004. "Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, p. 848-854. Springer-Verlag.

- Del Campo, José A., Mercedes Garcia-González et Miguel G. Guerrero. 2007. "Mini-review - Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives". *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 74, p.1163-1174. Springer-Verlag.
- Farineau, Jack et Jean-François Morot-Gaudry. 2006. "La photosynthèse – processus physiques, moléculaires et physiologiques". Coll. Synthèses, *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*. France, 403 p.
- Fernandez-Sevilla J. M., Acien Fernandez F. G. et E. Molina Grima. 2010. "Biotechnological production of lutein and its applications – Mini-review". *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 86, p. 27-40. Springer-Verlag.
- Foley, P. M., Beach E. S. et Zimmerman J. B. 2011. "Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges". *Green Chemistry*, vol. 13, p. 1399-1405.
- Force, L., Critchley, L. et van Rensen J. J. S. 2003. "New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants – 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test". *Photosynthesis Research*, vol 78, p. 17-33.
- Govindjee et Rajni Govindjee. 2000. "Photosynthesis and the "Z"-scheme". University of Illinois at Urbana-Champaign. <http://www.life.uiuc.edu/govindjee>
- Groover, Robert D. et Harold C. Bold. 1968. "Phycological notes I – *Oocystis polymorpha* sp. nov.". *The Southwestern Naturalist*, vol. 13, no. 2, p.129-135.
- Guerin, M., Huntley ME et M. Olaizola. 2003. "*Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition". *Trends in Biotech* 21(5): 210-216.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. et A. J. Young. 1996. "Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*". *Bioresource Technology*, vol. 55, p. 207-214. Elsevier Science Limited.
- Harun, Razif, Manjinder Singh, Gareth M. Forde et Michael K. Danquah. 2010. "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, p. 1037-1047. Elsevier Ltd.

- Hepperle, Dominik, Eberhard Hegewald et Lothar Krienitz. 2000. "Phylogenetic position of the Oocystaceae (Chlorophyta)". *Journal of Phycology*, vol. 36, p. 590-595.
- Jupin, H. et A. Lamant. 1999. "La Photosynthèse". *Dunod - collection Sciences sup 2e cycle*, Paris, 268 p.
- Lemoine, Y. et B. Schoefs. 2010. "Review - Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae : a multifunctional response to stress". *Photosynthesis Research* [DOI 10.1007/s11120-010-9583-3]. Published online 13 august 2010.
- Makareviciene, Violeta, Vaida Andruleviciute, Virginija Skorupskaite et Jurate Kasperoviciene. 2011. "Cultivation of microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a potential biofuel feedstock". *Environmental Research, Engineering and Management*, vol. 3, no. 57, p. 21-27
- Margalith, P. Z. 1999. "Mini-review – Production of ketocarotenoids by microalgae". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, p. 431-438. Springer-Verlag.
- Maxwell, Kate et Giles N. Johnson. 2000. "Review article – Chlorophyll fluorescence – a practical guide". *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, no. 345, p. 659-668. Oxford University Press.
- Müller, P., X. P. Li et K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching – A response to excess light energy". *Plant Physiology*, vol. 125, no. 4, p. 1558-1566.
- Peterman, Erwin J. G., Fred M. Dukker, Rienk van Grondelle et Herbert van Amerongen. 1995. "Chlorophyll *a* and carotenoid triplet states in light-harvesting complex II of higher plants". *Biophysical Journal*, vol. 69, p. 2670-2678. The Biophysical Society.
- Pirastru, Laura, Mohamed Darwish, Fong Lam Chu, François Perreault, Louka Sirois, Lekha Sleno et Radovan Popovic. 2012. "Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen-limitation and acetate treatment". *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, p. 117-124.
- Popovic, Radovan, David Dewez et Philippe Juneau. 2003. "Chapter 5 – Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: heavy metals, herbicides, and air pollutants". *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, p. 151-184.

- Pröschold Thomas et Frederik Leliaert. 2007. "Chap.7 – Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches" In Brodie, Juliet et Jane Lewis. (2007). « Unravelling the algae – the past, present and future of algal systematics ». *CRC Press, Taylor & Francis Group*. The Systematics Association.
- Pulz, O. et W. Gross. 2004. "Valuable products from biotechnology of microalgae – Mini-review". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 65, p. 635-648. Springer-Verlag.
- Ralley, Louise, Eugenia M. A. Enfissi, Norihiko Misawa, Wolfgang Schuch, Peter M. Bramley et Paul D. Fraser. 2004. "Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants". *The Plant Journal*, vol. 39, p. 477-486.
- Raven, H. Peter, Ray F. Evert et Susan E. Eichhorn. 2000. "Biologie végétale (6^e édition)". *DeBoeck Université*, 944 p.
- Richmond, A. (editor). 2004. "Handbook of microalgal culture – Biotechnology and applied phycology". *Blackwell Science Publishing*, 545 p.
- Roháček, Karel, Soukupová Julie et Miloš Barták. 2008. « 3 – Chlorophyll fluorescence : A wonderful tool to study plant physiology and plant stress » *Plant cell compartments – Selected topics*, p. 41-104. Research Signpost, India. ISBN: 978-81-308-0104-9.
- Rosa, Leon, Inmaculada Couso et Emilio Fernandez. 2007. "Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Journal of Biotechnology*, vol. 130, p. 143-152. Elsevier.
- Scheer, Hugo. 2004. "Chlorophylls and carotenoids". *Encyclopedia of Biological Chemistry*, vol. 1, p.430-437. Elsevier Inc.
- Singh, R. N. et Shaishav Sharma. 2012. "Development of suitable photobioreactor for algae production – A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, p. 2347-2353.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan C., Duran E. et A. Isambert. 2005. "Commercial Applications of Microalgae". *Journal of Biosciences and Bioengineering*, vol. 101, no. 2, p. 87-96. The Society for Biotechnology, Japan.

- Stoyneva, M. P., C. Cocquyt, G. Gärtner et W. Vyverman. 2007. « *Oocystis lacustris* Chod. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) in Lake Tanganyika (Africa) ». *Linzer biol. Beitr*, vol. 39/1, p.571-632. Biologiezentrum Linz/Austria.
- Strasser, BJ. et RJ. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to adress environmental questions: The JIP-test" In Mathis P. (éditeur) "Photosynthesis: from light to biosphere". *Kluwer Academic Publishers*, p. 977-980.
- Tadashi, Matsunaga, Mitsufumi Matsumoto, Yoshiaki Maeda, Hiroshi Sugiyama, Reiko Sato et Tsuyoshi Tanaka. 2009. « Characterization of marine microalga, *Scenedesmus sp.* strain JPCC GA0024 toward biofuel production ». *Biotechnology Letters*, vol. 31, p. 1367-1372
- Taiz, Lincoln et Eduardo Zeiger. 2006. "Plant physiology – fourth edition". *Sinauer Associates, Inc.* 764 p.
- Walker, David avec illustrations de Walker, Richard. 1993. « Energy, plants and man ». *Oxygraphics Limited.* 277 p.
- Wang, Yan et Tao Chen. 2008. "The biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis*". *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 24, p. 2927-2932. Science + Business Media B. V.
- Wong, Ray. 2012. « Miscellaneous fresh water microalgae identification – Fremont area ». www.ms-nucleus.org/watersheds/biological/microalgaegen.html (consulté en décembre 2012).