

Remerciements

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a été réalisé dans le Laboratoire de Cytophysiologie Végétale et Phycologie UPRES-A CNRS 1830 sous la direction du Professeur Y. Lemoine. Je voudrais le remercier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et contribué à l'élaboration de ce travail.

Je remercie également le Docteur A. Creach de m'avoir initié à la séparation électrophorétique des caroténoïdes et d'avoir participé à l'analyse de globules extraplasmiques.

Le Docteur F. Franck a bien voulu que soient effectuées dans son laboratoire (Laboratoire de Photobiologie à l'Université de Liège) les études de fluorescence chlorophylliennes, avec lui je remercie le Docteur B. Schoefs pour leur contributions à ces analyses. Je remercie également le Docteur B. Schoefs pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Ses suggestions m'ont beaucoup aidé lors de l'achèvement de ce travail.

Le Professeur J.-C. Duval a bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter d'en être rapporteur. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance d'avoir examiné ce texte avec minutie et d'avoir bien voulu faire partie du jury.

J'adresse également ma sincère gratitude au Professeur Merlin J.-C. et au Docteur Maillard P. d'avoir consenti à examiner ce travail et participer à ce jury.

Ce travail est dédié à mes parents, à Djamilia, à Rhizlène, à Nawal, à mes frères et sœurs.

Sommaire

Abréviations	p7
Introduction	p9
Généralités	p12
<u>I - Phylogénie des algues</u>	p12
<u>II - Intérêt économique des microalgues</u>	p13
<u>III - Cultures des microalgues</u>	p15
<u>IV - Biosynthèse des caroténoïdes</u>	p16
1 - Formation du phytoène	p18
2 - Desaturation	p18
3 - Cyclisation	p18
4- Hydroxylation	p19
5 - Les modifications ultérieures	p19
6 - Enzymes de la biosynthèse des caroténoïdes	p19
a - Phytoène synthase	p19
b - Phytoène desaturase	p20
c - Cyclases	p20
d - Enzymes d'hydroxylation et modifications ultérieures	p20
hydroxylation	p20
époxydation	p21
7 - Les études génétiques de la biosynthèse des caroténoïdes	p21
8 - Régulation de la biosynthèse des caroténoïdes	p21
<u>IV - Photochimie des caroténoïdes</u>	p22
<u>V - Les photosystèmes</u>	p24
A - Photosystème I (PSI)	p24
1- Centre réactionnel du PSI	p24
2 - Antennes du photosystème I	p24
B - Photosystème II	p25
1 - Centre réactionnel du PSII	p25
2- Antennes du PSII	p25
<u>VI - Cycle des xanthophylles</u>	p27
A - Localisation et fonctionnement	p29
a- Les xanthophylles du cycle	p30
b- Les enzymes du cycle	p31
b-1- Violaxanthine dé-époxydase	p32
b-2-Zéaxanthine époxydase	p32
B - Hypothèse du rôle photoprotecteur du cycle des xanthophylles	p33
<u>VII - Les caroténoïdes secondaires et leur production par les microalgues</u>	p36
<u>VIII - Le rôle des caroténoïdes secondaires</u>	p37
Nature lipidique des gouttelettes	p39
<u>IX - La microalgue verte : <i>Haematococcus pluvialis</i></u>	p39
A - Le stigma	p41
B - Stress environnementaux et polymorphisme cellulaire	p42

<u>X - Astaxanthine</u>	p43
A- L'astaxanthine dans la chaîne trophique	p44
B - Rôle photoprotecteur de l'astaxanthine	p44
<u>XI - Biosynthèse de l'astaxanthine</u>	p45

Matériel et Méthodes p51

<u>I - Matériel végétal</u>	p51
<u>II - Synchronisation de la culture</u>	p52
<u>III - Culture d'<i>Haematococcus pluvialis</i></u>	p52
A - Milieu de culture	p52
B - Culture non renouvelées (Batch) dans des fioles Erlenmeyers	p53
C - Culture sur milieu solide	p54
D - Culture continue en bioréacteur	p54
<u>IV - Essai d'optimisation du milieu de culture</u>	p55
<u>V - Evaluation de la matière fraîche et sèche</u>	p56
<u>VI - Etude du "rougissement" : action de la lumière sur la caroténogénèse</u>	p56
A - Illuminateur spectral	p56
B - Stress lumineux	p58
<u>VII - Chromatographie Liquide Haute Performance</u>	p58
A - Le dispositif expérimental	p58
B - Préparation de l'échantillon	p59
C - Traitement des résultats	p61
<u>VIII - Séparation des pigments sur microcolonne de silice Sep Pak</u>	p61
<u>IX - Chromatographie sur couche mince (CCM)</u>	p62
A - Préparation de l'échantillon	p62
B- Les mélanges de solvants éluants : phases mobiles	p63
<u>X - Isolement des complexes Pigments-protéines</u>	
dans les globules lipidiques extraplastidiaux	p64
A - Préparation des échantillons	p64
B - Isolement des complexes par électrophorèse	p64
<u>XI - Etudes des lipides contenus dans les gouttelettes extraplastidiales</u>	p65
A - extraction des lipides totaux	p65
Séparation des lipides neutres et polaires	p67
B - Etude de la compositions des acides gras	p67
Méthylation des lipides totaux au méthanol-H ₂ SO ₄	p67
<u>XII - Mesure de la production d'oxygène</u>	p68
<u>XIII - Mesures Spectrophotométriques</u>	p68
A - Spectres d'absorption in vivo	p68
B - Spectres d'absorption des pigments	p68
<u>XIV - Mesure des niveaux de la fluorescence chlorophyllienne</u>	p69
A - Spectre d'émission de la fluorescence à 77 K	p69
B - Spectre d'excitation de fluorescence à 77 K	p69
<u>XV - Mesure de variation du rendement de fluorescence en lumière modulée</u>	p70
<u>XVI - Suivi de la croissance cellulaire</u>	p73
A- Comptage des cellules au microscope	p73
B - Méthode spectrophotométrique	p73

<u>XVII - Influence des inhibiteurs de la synthèse protéique ou du transfert des électrons sur la biosynthèse de l'astaxanthine</u>	p74
---	-----

Résultats	p76
------------------	-----

<u>I. - Synchronisation de la culture : gradient discontinu sur Percoll</u>	p76
---	-----

<u>II. - Croissance cellulaire</u>	p77
------------------------------------	-----

A - Culture non renouvelée (batch) dans les fioles Erlenmeyer	p77
---	-----

B - Culture continue : bioréacteur	p78
------------------------------------	-----

<u>III - Cycle de vie d'<i>H. pluvialis</i></u>	p80
---	-----

<u>IV - Phototactisme et bourgeonnement</u>	p85
---	-----

<u>V - Variation des niveaux de fluorescence : PAM</u>	p88
--	-----

A - Essai d'optimisation de la composition du milieu de culture	p88
---	-----

B - Suivi des niveaux de fluorescence de la chlorophylle au cours du stress lumineux	p90
--	-----

<u>VI - Mesures d'émission et d'excitation de la fluorescence</u>	p91
---	-----

A - Spectres d'émission de fluorescence	p91
---	-----

B - Spectres d'excitation de fluorescence	p93
---	-----

<u>VII - Action de la lumière sur la caroténogénèse</u>	p95
---	-----

A - Qualité de la lumière : utilisation de lumière colorées	p95
---	-----

B - Intensité de la lumière blanche	p96
-------------------------------------	-----

<u>VIII - Stress lumineux et conséquences sur les cellules d'<i>H. pluvialis</i></u>	p97
--	-----

A - Polymorphisme des cellules et croissance des cultures	p97
---	-----

B - Variations pigmentaires	p101
-----------------------------	------

1 - Chlorophylles	p101
-------------------	------

2 - Caroténogénèse	p102
--------------------	------

a - Cycle des xanthophylles	p102
-----------------------------	------

b - Caroténoïdes secondaires	p104
------------------------------	------

<u>IX - Contribution à l'étude de la voie de biosynthèse de l'astaxanthine</u>	p105
--	------

A - Etudes des modifications pigmentaires au cours d'un stress lumineux	p106
---	------

1 - Analyse par Chromatographie sur Couche Mince	p106
--	------

2 - Séparation des pigments à l'aide d'une microcolonne de silice	p110
---	------

3 - Analyse de la composition pigmentaire par CLHP	p110
--	------

B - Utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique ou de transfert d'électrons	p114
---	------

1 - Cycloheximide (0,1 µg/ml)	p114
-------------------------------	------

a : Evolution de la biomasse	p114
------------------------------	------

b : Variation de la teneur en pigments	p116
--	------

le cycle des xanthophylles	p116
----------------------------	------

les chlorophylles	p117
-------------------	------

les caroténoïdes secondaires	p118
------------------------------	------

2 - Chloramphénicol (100µg/ml)	p118
--------------------------------	------

a: Evolution de la biomasse	p118
-----------------------------	------

b : Variation de la teneur en pigments	p119
--	------

le cycle des xanthophylles	p119
----------------------------	------

les chlorophylles	p120
-------------------	------

les caroténoïdes secondaires	p121
3 - Ellipticine	p122
a : Evolution de la biomasse	p123
b : Variation de la teneur en pigments	p124
le cycle des xanthophylles	p124
les chlorophylles	p125
les caroténoïdes secondaires	p126
4 - Norflurazon	p128
a : Evolution de la biomasse	p128
b : Variation de la teneur en pigments	p129
le cycle des xanthophylles	p129
les chlorophylles	p130
les caroténoïdes secondaires	p130
<u>X - Isolement des globules lipidiques extraplastidiaux</u>	p132
<u>XI - Etude électrophorétique</u>	p134
<u>XII - Etudes des lipides contenus dans les gouttelettes extraplastidiales</u>	p137
A - Nature des lipides totaux	p137
B - Etude de la composition en acides gras	p137
Discussion	p139
<u>I - Cycle de vie de l'<i>Haematococcus pluvialis</i></u>	p139
<u>II - Croissance cellulaire et production de caroténoïdes</u>	p140
A - Culture non renouvelée	p140
B - Stress lumineux	p142
1 - Intensité lumineuse	p142
a - Polymorphisme cellulaire	p142
b - Cycle des xanthophylles	p142
c - Caroténoïdes secondaires	p143
2 - Qualité de la lumière	p144
<u>III - Utilisation d'inhibiteurs</u>	p145
A - Chloramphénicol et Cycloheximide	p145
B - Ellipticine	p147
C - Norflurazon	p149
<u>IV - Mesures de fluorescence de la chlorophylle au cours du stress lumineux</u>	p151
A - Modifications de l'efficacité de la conversion énergétique	p151
B - Altération des antennes pigmentaires	p152
C - Spectres d'excitation de fluorescence	p153
<u>V - Etudes électrophorétiques</u>	p154
<u>VI - Etude des lipides</u>	p154
Conclusion	p157
Perspectives	p159
Références bibliographiques	p160
Annexes	p175

Abréviations

Acétyl CoA : Acétyl CoenzymeA

AG : Acide(s) Gras

ARN : Acide RiboNucléique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Chl a : Chlorophylle a

Chl b : Chlorophylle b

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CPG : Chromatographie Phase Gaz

DO : Densité Optique

DR% : pourcentage de dé-époxydation (De-epoxidation Rate)

EDTA : acide EthylèneDiaminoTetraAcétique

ELIPs : Early Light-Induced Proteins : protéines induites par un stress lumineux

F₀' : Fluorescence minimale instantanée

F₀ : Fluorescence minimale ou fixe

FDP : Farnesyl DiPhosphate

Fig. : Figure

F_m : Fluorescence maximale

F_m' : Fluorescence maximale instantanée

F_v : Fluorescence variable

F_v' : Fluorescence variable instantanée

GGDP : GeranylGeranyl DiPhosphate

h : heure

HEPES : acide N (2-HydroxyEthyl)-1-Piperazine-N'-(2-Ethane Sulfonique)

IDP : Isopentenyl DiPhosphate

KDa : kiloDalton

LHC : Light Harvesting Complex : complexe collecteur de lumière

MGDG : MonoGalctosylDiacylGlycérol

Min : Minute (s)

MMB : Milieu Bristol Modifié

NPQ : extinction non photochimique de la fluorescence
P450R : P450 réductase
P_{fah} : Poids {filtre + algue} humide
P_{fas} : Poids {filtre + algue} sec
P_{fh} : Poids filtre humide
P_{fs} : Poids filtre sec
PSI : Photosystème I
PSII : Photosystème II
QA : Quinone A
SDS : Dodécyl-Sulfate de Sodium
Temed : N,N,N',N'-tetra méthyl éthylène diamine
Tris : Tris[hydroxyméthyl]aminométhane ou trizma base
V/V/H : Volume du gaz/Volume de culture/Heure
MVA : Acide MéValonique

Introduction

L'aquaculture des micro- et macroalgues est globalement une industrie de valeur. Les macroalgues sont cultivées aussi bien pour leurs hydrocolloïdes que pour leur utilisation en tant qu'aliments. Les microalgues sont utilisées comme aliment pour des animaux marins et en tant que source de produits chimiques de valeur tels que le β -carotène et l'astaxanthine (Borowitzka, 1997). Les perspectives d'application industrielles sont donc très prometteuses :

- Production de pigments (colorants et antioxydants), de lipides et de polysaccharides (Borowitzka, 1997).
- Production de composés biologiquement actifs (substances antibiotiques ou antifongiques) (Gudin et Chaumont 1991).
- Extraction de produits à haute valeur ajoutée (protéines, vitamines, acides aminés) (Borowitzka & Borowitzka, 1988).
- Production d'oxygène via la photosynthèse (apport d'oxygène dans le traitement des eaux usées (Travieso *et al.*, 1992).
- Production d'énergie [substances carbonées et leurs dérivées : cires, encaustiques, surfactants (floculants ou émulsifiants)].

Cependant ces applications ne sont pas encore toutes possibles car le coût de la production de biomasse et d'extraction des produits est important.

La culture des microalgues a bénéficié des connaissances et expériences acquises dans le domaine des bactéries (bioréacteurs) pour produire des biomasses considérables ceci quelque soit le groupe phylogénique auquel elles appartiennent (Chlorophycophytes, Rhodophycophytes, Cryptophytes...) et par conséquent quelque soit leur écologie. En effet au cours de l'évolution, les micro-organismes photosynthétiques ont pu coloniser toutes les niches écologiques y compris les milieux extrêmes : milieu hypersalé [*Dunaliella salina* (Chlorophycée) dans la mer morte], milieu acide [*Cyanidium caldarium* (Rhodophycée)], milieu alcalin [*Spirulina platensis* (Cyanobactérie)]. Certains peuvent résister à des variations de conditions écophysiological importantes. C'est le cas par exemple des Chlorophycées *Haematococcus pluvialis* et

Chlamydomonas nivalis (fortes intensités lumineuses, grandes variations de températures et de salinités...). Les microalgues ont donc la faculté d'adapter leur physiologie et leur métabolisme pour faire face à ces conditions drastiques grâce, par exemple, à un polymorphisme associé souvent à des formes de résistance ou encore par une production élevée de métabolites (caroténoïdes, acides gras, polysaccharides...) pour faire face à ces conditions extrêmes.

Les caroténoïdes, en particulier l'astaxanthine, sont aussi présents dans le plumage des oiseaux et l'exosquelette des crustacés. Ce caroténoïde est responsable aussi bien de la couleur (rose) du plumage du flamand rose que de celles de la chair du saumon, ou des carapaces de crabe et de homard. Il est synthétisé par des microalgues telles que l'*Haematococcus pluvialis* et les animaux le récupèrent à partir de la nourriture qu'ils ingèrent et l'intègrent dans leurs tissus (Tsushima *et al.*, 1997).

Chez les animaux, environ 50 caroténoïdes sont convertis par le métabolisme en provitamine A, essentielle au bon fonctionnement de la vision, la différenciation cellulaire et le développement embryologique. Parmi ces molécules le β -carotène qui présente le pouvoir provitaminique le plus élevé est produit en grande quantité par l'algue verte *Dunaliella salina* en conditions de stress (Ben-Amotz & Avron 1983).

Beaucoup d'animaux (surtout marins) sont capables de réaliser des transformations métaboliques des caroténoïdes et de s'en servir dans les parades nuptiales ou guerrières.

Le coût de production par les microalgues restant souvent élevé, ces molécules sont produites essentiellement par voie de synthèse chimique. Cette synthèse des caroténoïdes a commencé en 1954, quatre ans seulement après les essais concluants en laboratoire. Depuis les progrès dans ce domaine sont continus et importants et aujourd'hui les deux principaux producteurs industriels de caroténoïdes synthétiques, Roche et BASF produisent six différents caroténoïdes : le β - β -carotène, canthaxanthine, astaxanthine (optiquement inactive), 8'-apo- β -carotène-8'-al, acide 8'-apo- β -carotène-8'-oïque et enfin citranaxanthine. (Britton *et al.*, 1996).

L'algue verte *Haematococcus pluvialis* est capable d'accumuler le cétocaroténoïde astaxanthine sous des conditions environnementales défavorables. Notre objectif a été donc de mieux connaître les réponses de cette microalgue au stress par une forte lumière incidente et d'aborder l'étude de la voie de biosynthèse de l'astaxanthine par l'utilisation d'inhibiteur.

Nos travaux nous ont permis d'acquérir une meilleure connaissance du cycle de vie de cette microalgue que nous avons rapporté dans le chapitre III des résultats.

Dans les chapitres V et VI des résultats nous avons exposé les études physiologiques de cette Chlorophycée réalisées à l'aide des méthodes fluorimétriques et spectrophotométriques.

L'importante transformation chez cette microalgue sous un stress écophysologique consiste en un changement de sa couleur du vert au rouge à la suite de variations du contenu pigmentaire qui ont été étudiées par différentes méthodes chromatographiques.

Nous avons rapporté une étude préliminaire des lipides qui s'accumulent simultanément avec des caroténoïdes dans des gouttelettes extraplastidiales. Par ailleurs une étude par électrophorèse démontrant l'existence de protéines associées aux caroténoïdes dans ces gouttelettes pigmentées est également présentée.

Généralités

La diversité Phylogénétique des algues est large et se traduit par une grande variation de métabolisme et propriétés biochimiques. De ce fait il est impossible de cerner toutes les caractéristiques des microalgues (phylogénie, taxonomie, écologie et distribution, biochimie et applications industrielles) dans un même ouvrage. Un grand nombre d'ouvrages a ainsi été consacré respectivement à ces différents aspects des microalgues par exemple ceux de Van Den Hoek *et al.*, (1994) pour la biologie des algues, systématique et classification, Cox (1980) pour l'aspect photosynthétique des flagellés, Margulis *et al.*, (1990) pour les perspectives sur la phylogénie et la classification, Andersen (1992), Radmer (1996) concernant la biodiversité, Darley (1982), Rogers & Gallon (1988) pour la physiologie et biochimie, Young & Britton, (1993) pour les caroténoïdes et la photosynthèse, Borowitzka & Borowitzka (1988), Andersen (1996) et Lee (1997) pour les applications commerciales.

I - Phylogénie des algues

Nos connaissances et interprétations de la phylogénie des algues en général et notamment les microalgues ont intensivement évolué ces dernières années (séquençage des gènes des ARN ribosomiaux, structure flagellaire, ultrastructure des plastes et mitochondries, appareil mitotique...).

Historiquement la détermination des espèces est basée sur les propriétés phénotypiques comme la morphologie de l'organisme entier, l'anatomie cellulaire et l'ultrastructure, le métabolisme et la physiologie. Les espèces sont classées selon un Code International de la Nomenclature Botanique. A cause des controverses dues à la nature dynamique de la recherche et des discussions de la phylogénie des micro-organismes eucaryotes, on tient souvent compte des schémas de classification basés sur les approches traditionnelles. En effet les algues sont regroupées dans des taxons (divisions) se basant essentiellement sur la pigmentation, la nature chimique des produits photosynthétiques (produit de stockage de la photosynthèse),

l'organisation des thylacoïdes et d'autres ultrastructures du chloroplaste, la nature chimique et la structure de la paroi cellulaire, le nombre, l'arrangement et l'ultrastructure des flagelles (quand ils existent)

Un schéma d'évolution des microalgues a été établi par Goodwin (1980) basé sur la distribution des caroténoïdes dans ces microorganismes (Fig. 1)

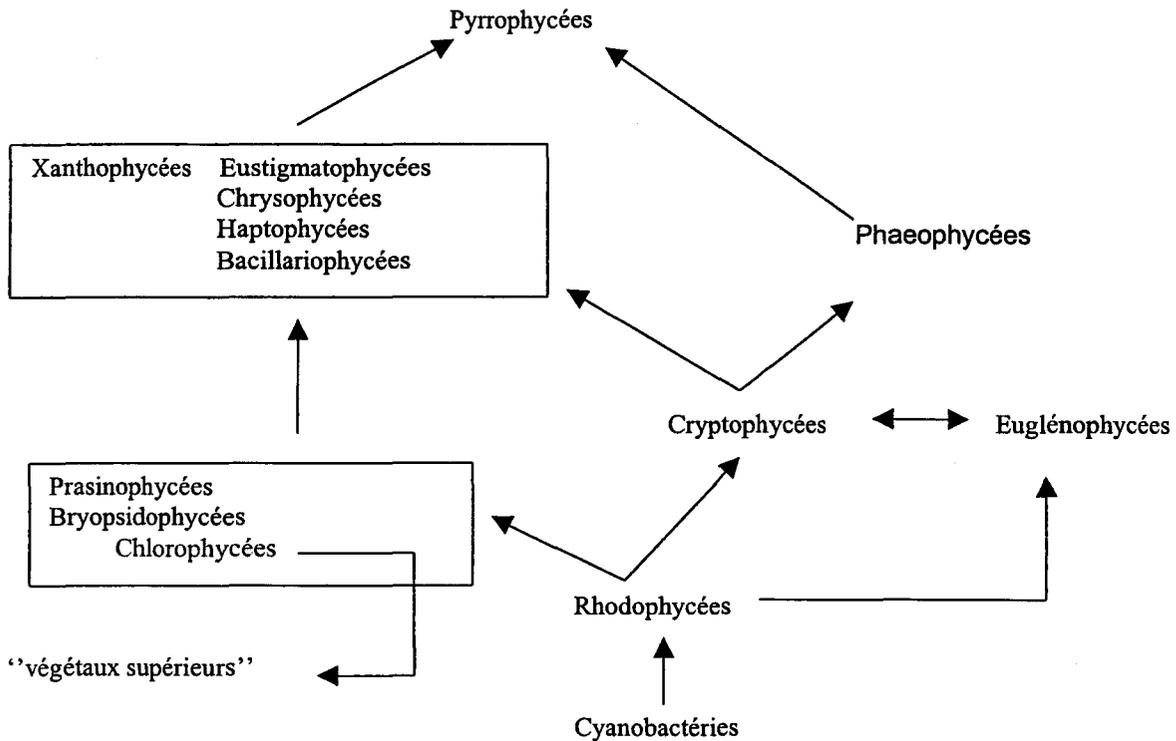


Figure 1 : évolution des microalgues basée sur la composition relative en caroténoïdes (d'après Goodwin, 1980)

II - Intérêt économique des microalgues

Certaines algues ont été exploitées très tôt par l'Homme pour son alimentation et celle des animaux. Ainsi les Aztèques comme les tribus du sud du Sahara récoltaient des spirulines pour cet effet.

Actuellement l'utilisation des caroténoïdes s'est diversifiée. En effet, leur intérêt dépasse le domaine alimentaire pour être activement étudiées dans un but médical. (Schwartz, 1987) et

Schwartz *et al.*, (1988) ont rapporté que le β -carotène provoque des régressions des tumeurs mammaires induites chez le hamster et d'autres rongeurs . Des études montrent qu'un régime alimentaire riche en caroténoïdes augmenterait l'immunité et retarderait la progression des maladies cardio-vasculaires (Van Breemen *et al.*, 1996). En outre Daube et Payne (1989) ont démontré que ce caroténoïde améliore la résistance vis-à-vis des toxines. Par ailleurs l'astaxanthine est utilisé en tant qu'additif alimentaire pour améliorer la coloration des jaunes d'œufs en aviculture et pigmenter la chair des poissons d'aquaculture (saumonisation de la truite) (Johnson *et al.*, 1980 ; Gong & Chen, 1997; Turujman *et al.*, 1997).

L'exploitation des ressources naturelles et en particulier l'utilisation des microalgues pour la production de substances biologiques précieuses et difficiles à obtenir par d'autres moyens, constitue aujourd'hui une alternative riche d'avenir par rapport aux procédés de l'industrie chimique. En effet les microalgues, tant marines que d'eau douce, produisent une biomasse considérable à partir d'éléments simples grâce à la bioconversion performante de l'énergie lumineuse. Cependant l'exploitation industrielle à grand échelle de ces micro-organismes est encore assez exceptionnelle, seule *Spirulina*, *Chlorella* et *Dunaliella* sont cultivées en bassin et conduisent à une production importante dans le domaine alimentaire (protéine, colorant, provitamine A...) mais plusieurs culture pilotes sont décrites dans divers pays. Actuellement nos connaissances sur la biologie de ces micro-organismes permettent l'utilisation de ces réacteurs biologiques et un contrôle de leur capacité photosynthétique. Bien qu'elles ne soient pas applicables à tous les cas, l'avantage de ces méthodes "biotechnologiques" est d'offrir parfois une production quantitative importante à des coûts moins élevés que ceux de la synthèse industrielle. En outre dans bien des cas, la filière biologique conduit à l'obtention de produits correspondants aux molécules naturelles dont on souhaite l'utilisation en permettant par exemple de produire spécifiquement l'isomère actif ou de sélectionner celui qui présenterait un intérêt singulier. Au contraire la synthèse organique industrielle conduit en général à la formation de racémiques, par exemple dans le cas de la vitamine E. Il n'en reste pas moins que l'importance de la synthèse chimique ne peut être mise en question dans bien des domaines et que le travail des organiciens reste irremplaçable dès qu'il s'agit de l'élaboration d'analogues de composés naturels tels que les rétinoïdes artificiels.

En réponse à cette demande qui devient de plus en plus importante, l'exploitation des microalgues s'est considérablement développée et certains pays deviennent des leaders dans la production de

certaines microalgues ou de leurs métabolites recherchés tel que *Dunaliella* en Israël, Australie et en Espagne, *Haematococcus* par les Etats-Unis et Israël, *Spirulina* par les Etats-Unis, le Mexique et la Thaïlande et *Chlorella* par le Taiwan, le Japon et la Russie (Gudin & Chaumont 1991; Lee, 1997).

III - Cultures des microalgues

Essentiellement deux techniques de culture sont utilisées :

- Les bassins à ciel ouvert, cette technique, facile à l'utilisation, est utilisée pour des algues qui se développent dans des milieux extrêmes très difficiles à contaminer par exemple *Dunaliella salina* qui nécessite une très grande salinité ou encore *Chlorella platensis* un milieu très alcalin
- Les bioréacteurs fermés qui permettent un meilleur contrôle des conditions de culture et évitent les contaminations par des micro-organismes extérieurs.

L'utilisation des microalgues en biotechnologie alimentaire prend progressivement de l'importance parmi les productions originales. Cette biotechnologie repose sur deux types d'outils :

- l'utilisation de cellules ou de micro-organismes dont on oriente les synthèses par manipulations génétiques.
- une seconde voie consiste à utiliser un organisme qui élabore naturellement le composé recherché. Les microalgues constituent à cet égard un important matériel pour la production de divers composés économiquement intéressants (colorants naturels, antioxydants, protéines, applications médicales et cosmétiques, gélifiants...) et dans un tel objectif les caroténoïdes ont fait l'objet de nombreuses études, notamment le β -carotène, la canthaxanthine et l'astaxanthine. Actuellement, dans ce domaine particulier de la caroténogenèse, les microalgues les plus étudiées et/ou utilisées sont *Dunaliella salina*, var. *bardawil* et *Haematococcus* (*pluvialis* et *lacustris*) qui se développent sous un large intervalle de température et d'éclairage.

IV - Biosynthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont synthétisés selon une voie spécialisée des isoprénoides ou terpénoïdes qui est utilisée aussi pour la biosynthèse d'une large variété d'autres produits (chlorophylles, plastoquinones, ubiquinones, polyprénols à longue chaîne carbonée, stérols...). Toutefois, une deuxième voie de biosynthèse des caroténoïdes a été proposée par Lichtenthaler *et al.*, (1995) et Schwender *et al.*, (1996). En effet, des expériences de marquage réalisées à l'aide de $[1-^{13}\text{C}]$ glucose et de $[1-^{13}\text{C}]$ acétate ont permis à ces auteurs de montrer que la biosynthèse de l'isopentenyl diphosphate (IDP) se réalise chez l'algue verte *Scenedesmus* par une voie différente de la voie acétate/mévalonate classique. Cette voie nouvelle permettrait d'obtenir une molécule d'IDP par condensation d'un Glycéraldéhyde 3-P et d'une unité à 2 carbones dérivée de la décarboxylation d'un Pyruvate obtenus à partir du glucose-P. L'IDP ainsi synthétisé est à l'origine des prenylipides chloroplastiques tels que les caroténoïdes et le phytol des chlorophylles.

Leur chromophore constitué de doubles liaisons conjuguées est responsable de leurs propriétés d'absorption dans l'UV et le visible.

Rappelons que les caroténoïdes, pigments naturels dans les plantes, sont des tetrapènes à C_{40} qui résultent de la condensation de huit unités isoprénoides à cinq carbones (C_5) qui apparaît clairement dans leur précurseur isopentényl diphosphate (IDP). Une série d'intermédiaires diphosphatés dont la chaîne carbonée consiste en la multiplication des 5 atomes de carbones sont ainsi construits à partir de cette unité isoprène intermédiaire (Fig. 2). Dans la première étape de ce processus, l'IDP subit une isomérisation au niveau de la première double liaison pour donner le Diméthylalyl diphosphate (DMADP). Les prenyl transférases forment la chaîne isoprénoïde à partir de ces deux intermédiaires. La première condensation entre le DMADP et l'IDP forme le composé à C_{10} qui est le Geranyl diphosphate qui est le précurseur des monoterpènes. Des additions supplémentaires d'IDP allongent la chaîne pour produire successivement le Farnesyl diphosphate (FDP) à C_{15} qui le précurseur des sesquiterpènes, triterpènes et des stérols et le geranylgeranyl diphosphate (GGDP) à C_{20} , qui donne naissance aux caroténoïdes et aux diterpènes y compris les phytols, qui forment la chaîne latérale des chlorophylles et dans la plupart des cas des bactériochlorophylles. La voie générale de la synthèse des caroténoïdes peut être considérée comme une série d'étapes illustrées dans la figure suivante (Fig. 2).

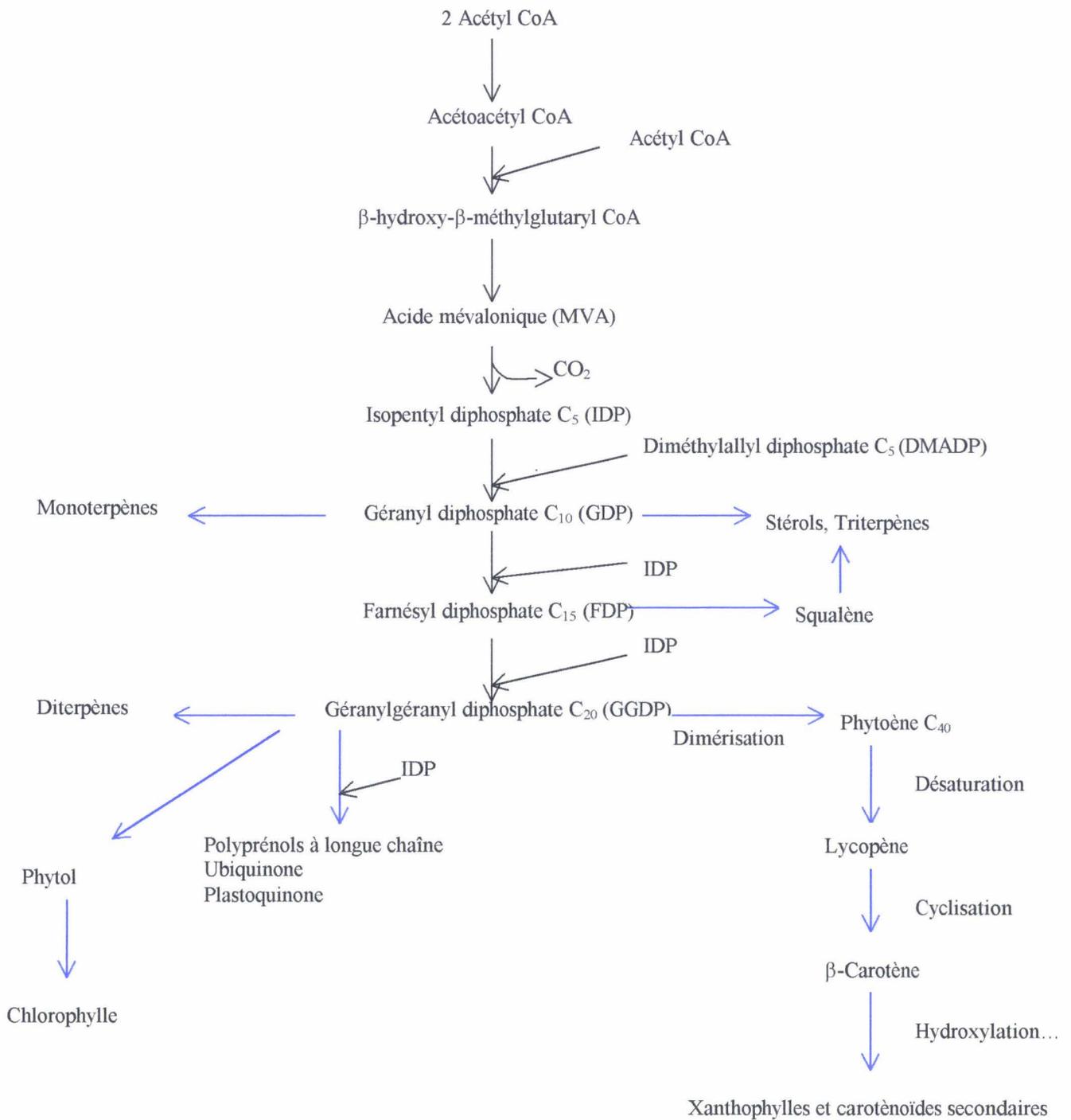


Figure 2 : Résumé schématique des différentes étapes de la biosynthèse des isoprénoides d'après Britton, (1993).

1 - Formation du phytoène

La première réaction spécifique à la biosynthèse des caroténoïdes est celle qui se fait avec une première molécule hydrocarbonée à C₄₀ : phytoène, qui est formé à partir des deux molécules de GGDP. Cette réaction passe par un intermédiaire à C₄₀, le préphytoène diphosphate (PPDP), et dans tous les systèmes photosynthétiques qui ont été étudiés le phytoène a été rapporté sous la forme de l'isomère 15Z (15-*cis*).

2 - Desaturation

Le phytoène, dont le chromophore ne comporte que 3 doubles liaisons conjuguées est incolore. Sa transformation en caroténoïdes colorés présents normalement dans tous les systèmes photosynthétiques est due à une extension séquentielle de ce chromophore par une série de réactions de desaturation, chacune d'elles enlevant un atome d'hydrogène par trans-élimination et introduisant une nouvelle double liaison.

Chez les plantes supérieures et les algues, la desaturation intervient alternativement sur chaque moitié du chromophore polyène et à chaque fois allonge le chromophore par deux doubles liaisons conjuguées pour donner successivement phytofluène (5), ζ-carotène (7), neurosporène (9) et lycopène (11 doubles liaisons conjuguées).

Les produits finaux colorés de la biosynthèse des caroténoïdes sont généralement des chromophores polyène majoritairement sous forme *trans*, bien que le phytoène soit sous forme d'isomère 15-*cis* (15Z).

3 - Cyclisation

A cause de la rigidité de la chaîne polyène, la cyclisation est limitée chez les caroténoïdes aux deux extrémités de la molécule où il y a formation d'un anneau à six segments. Il est maintenant bien établi que la cyclisation est initiée par une attaque des protons au niveau du carbone 2 (C-2), dans le schémas de la formation de produits dicyclique : α-carotène, β-carotène et ε-carotène, le premier produit intermédiaire objet de la cyclisation serait le neurosporène ou le Lycopène.

4- Hydroxylation

L'introduction des fonctions oxygène et autres modifications structurales à l'origine de la grande diversité des structures des caroténoïdes, spécialement chez les algues, constitue le processus final dans la biosynthèse des caroténoïdes. La réaction qui a été la plus étudiée est l'introduction des groupes hydroxy au niveau du C-3 pour donner les xanthophylles communes ; zéaxanthine et lutéine. Les études ont démontré que ces hydroxylations sont obtenues par remplacement stéréospécifique direct de l'hydrogène par OH (Walton *et al.*, 1969; Milborrow *et al.*, 1982).

5 - Les modifications ultérieures

On a peu de connaissances sur les réactions ultérieures, particulièrement les modifications des groupes terminaux par lesquelles les différents caroténoïdes rencontrés dans les chloroplastes des plantes et algues sont élaborés.

6 - Enzymes de la biosynthèse des caroténoïdes

Les travaux pionniers de la biosynthèse des caroténoïdes dans les cellules libres ont été menés par Potter (Spurgeon and Potter 1983) avec la poudre d'extrait acétonique préparée à partir de chromoplastes de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Cette poudre d'extrait acétonique, a été utilisée pour démontrer l'incorporation de l'IDP dans le phytoène, lycopène et carotènes cycliques et également la conversion directe du précurseur des caroténoïdes au produit final.

a - Phytoène synthase

La synthèse du phytoène a été étudiée en détail. Un système enzymatique soluble isolé à partir de l'extrait acétonique peut synthétiser le phytoène à partir de l'IDP (Britton, 1993). Une purification importante donne un complexe de MM = 200 000 qui contient toutes les activités enzymatiques nécessaires pour convertir l'IDP en phytoène. Par chromatographie échangeuse d'ions une petite protéine (MM = 40 000) a pu être isolée et purifiée à partir de ce complexe. Cette protéine paraît remarquablement petite en considérant les trois différentes activités enzymatiques qu'elle possède (Britton, 1993).

b - Phytoène desaturase

La poudre d'extrait acétonique préparée à partir des chromoplastes a servi également à démontrer la désaturation du phytoène en phytofluène et ζ -carotène (Camara & Monéger, 1982).

Un grand progrès a été réalisé par Beyer & Kleinig (1990), qui ont élucidé les détails de la séquence et les enzymes de désaturation dans les chromoplastes de la jonquille. Ce travail a montré que les désaturases (et cyclases) sont des protéines membranaires intégrales qui peuvent être solubilisées par un détergent. L'activité enzymatique est perdue suite à cette solubilisation mais elle est restaurée quand les enzymes solubilisées sont reconstituées dans des protéoliposomes. Ce système multicomposés nécessite au moins un accepteur final d'électrons en plus des enzymes individuelles.

c - Cyclases

Les poudres d'extraits acétoniques de deux souches de tomate ont été utilisées pour démontrer la dépendance de la lumière dans l'incorporation du lycopène radioactif dans les carotènes monocycliques et dicycliques, spécialement α -carotène, β -carotène, γ -carotène et δ -carotène (Papastephanou *et al.*, 1973). Dans d'autres travaux l'incorporation du lycopène pour donner le β -carotène et autres caroténoïdes cycliques *in vitro* par les préparations chloroplastiques de feuilles (Hill *et al.*, 1971) ont été rapportées. Toutes ces études, cependant, ont utilisé seulement des préparations brutes, aucune purification n'a été réalisée.

d - Enzymes d'hydroxylation et autres modifications ultérieures

Nous ne connaissons presque rien sur les enzymes intervenant dans ces réactions ultérieures dans la biosynthèse des caroténoïdes. Deux cas particuliers de telles enzymes, celles responsables de l'hydroxylation et l'époxydation, ont été étudiés :

- hydroxylation : Sandmann & Bramley ont rapporté la transformation de β -carotène en β -cryptoxanthine par les préparations membranaires de la Cyanobactérie *Aphanocapsa*

(Sandmann & Bramley, 1985). Cette conversion est dépendante de l'oxygène, stimulée par NADPH et sensible à la présence de CO et autres inhibiteurs.

- époxydation : Les enzymes de l'époxydation de la zéaxanthine en anthéroxanthine puis violaxanthine et du chemin inverse de ce processus ont été obtenues à partir des membranes chloroplastiques des plantes mais ces enzymes feraient plutôt partie du cycle de la violaxanthine. et n'interviendraient sans doute pas dans les réactions initiales de biosynthèse (Britton, 1993).

7 - Les études génétiques de la biosynthèse des caroténoïdes :

En 1978 Kirk & Tilney-Bassett avaient résumé les progrès réalisés par la génétique classique montrant que chez les plantes supérieures l'ensemble des gènes responsables de la biosynthèse des caroténoïdes est codé par le noyau. (Britton, 1993).

Dans les dernières années des progrès rapides ont été réalisés dans la génétique moléculaire de la biosynthèse des caroténoïdes chez des bactéries phototrophes ou des levures. Ce travail s'est intensifié et a conduit au grand progrès de la connaissance génétique de la biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes supérieures et les algues. L'approche moléculaire combinée avec les données de la génétique classique, les études biochimiques et chimiques contribue à élucider les détails du fonctionnement des enzymes, de leur organisation, des mécanismes réactionnels et de la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes pendant le développement de l'appareil photosynthétique chez les algues, les végétaux supérieurs et les bactéries.

8 - Régulation de la biosynthèse des caroténoïdes :

La biosynthèse des caroténoïdes est une étape essentielle dans la formation des complexes pigments-protéines dans les thylacoïdes, et sa régulation est étroitement liée à celle d'autres composants tels que les chlorophylles, les protéines et les lipides

Le contrôle par le phytochrome de la composition en caroténoïdes et de leur teneurs respectives dans les tissus de végétaux supérieurs a été étudié par plusieurs auteurs tels que Oelmüller & Mohr, (1985). La biosynthèse des caroténoïdes durant le développement du chloroplaste au cours du verdissement des plantes étiolées est contrôlée par trois éléments :

- un contrôle grossier par l'intermédiaire du phytochrome
- un accord très fin avec l'accumulation des chlorophylles
- stabilisation de l'holocomplexe à l'égard de la photodécomposition

Toutefois, à cause de la grande diversité des caroténoïdes et de leurs localisations différentes dans les complexes pigments-protéines, ça serait une simplification outrancière de penser que la biosynthèse de l'ensemble des caroténoïdes est un processus uniforme et commun chez toutes les espèces.

Différentes phases peuvent avoir lieu lors de la biosynthèse des caroténoïdes (Britton, 1993) :

- 1- synthèse de la plus grande partie lors de la biogenèse de l'appareil photosynthétique.
- 2- synthèse contribuant au renouvellement dans les thylacoïdes en croissance.
- 3- dans les plantes étiolées en verdissement, maintien de la synthèse par les enzymes déjà actives dans ces plantes étiolées, surtout dans les premières phases du verdissement avant que la synthèse de nouvelles enzymes ne débute.
- 4- synthèse en cours du développement pour modifier la composition en caroténoïdes en réponse à un changement des conditions écophysiologicals et notamment des conditions lumineuses (Demmig-Adams & Adams III, 1992)

La différenciation des chloroplastes et la biosynthèse associée des caroténoïdes peuvent être différentes selon les espèces voire même selon les variétés d'une espèce donnée.

En raison de toutes ces complexités il faut prendre beaucoup de précautions lorsqu'on compare les différents systèmes et spécialement quand on extrapole de l'un vers un autre. La régulation de la biosynthèse des caroténoïdes est extrêmement compliquée. Il semble que le contrôle au niveau génétique pourrait être important.

IV - Photochimie des caroténoïdes

Les caroténoïdes participent à la capture de l'énergie lumineuse chez les végétaux chlorophylliens au sein des antennes collectrices en tant que pigments accessoires capturant ainsi la lumière dans la région 450-570 nm dans laquelle les chlorophylles n'absorbent pas efficacement et transfèrent leur énergie à ces dernières. Ainsi le β -carotène et les xanthophylles peuvent transférer leur énergie à la Chl *a* avec une très grande efficacité (Siefertmann-Harms, 1985). Ce transfert efficace nécessite un arrangement précis des molécules pigmentaires dans les

complexes collecteurs de lumière. En outre, leur système de doubles liaisons confère à ces substances la possibilité d'éliminer l'état triplet de la chlorophylle, les radicaux libres et l'oxygène singulet qui sont produits en abondance lors de la photoinhibition et ainsi de les empêcher de provoquer des dégradations des centres réactionnels photosynthétiques. Cette photoprotection est généralement réalisée par des transferts d'énergie de type triplet-triplet (Fig.3).

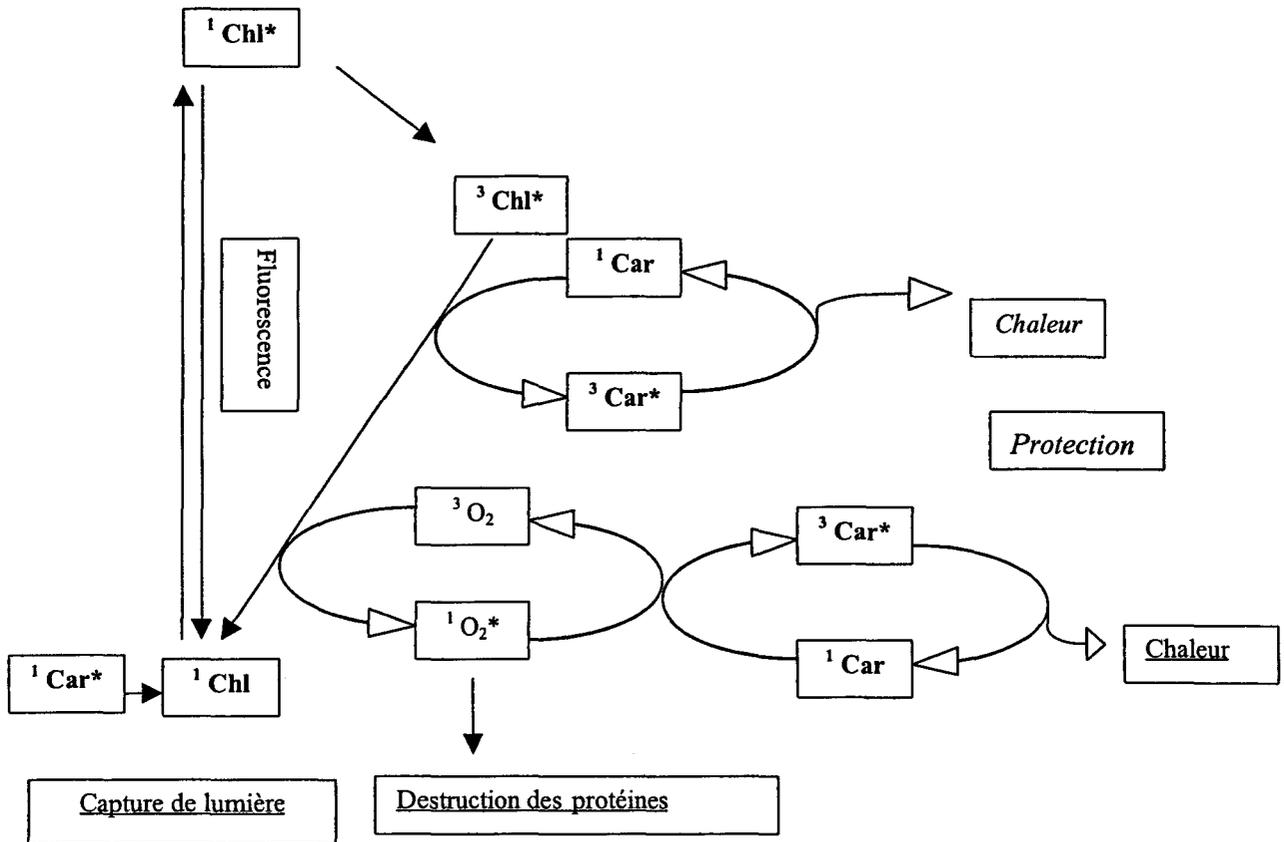


Figure 3 : représentation schématisée des rôles des caroténoïdes dans la capture de l'énergie lumineuse et la photoprotection de l'appareil photosynthétique. Un transfert d'énergie efficace de type singulet-singulet a lieu dans les antennes des caroténoïdes vers la chlorophylle. Les caroténoïdes protègent l'appareil photosynthétique en capturant l'énergie de l'état triplet de la chlorophylle ($^3\text{Chl}^*$) ou celle de l'oxygène singulet.

Les propriétés antioxydantes des caroténoïdes protègent les végétaux supérieurs et les micro-organismes photosynthétiques à l'égard de la photoinhibition provoquée par l'excès de la lumière

solaires incidente. Parmi les mécanismes photoprotecteurs mettant en œuvre les caroténoïdes, deux cycles d'interconversion de xanthophylles connus sous l'appellation de cycles de xanthophylles jouent également un rôle important chez de nombreux organismes photosynthétiques soumis à des éclaircissements excessifs.

V - Les photosystèmes

Les photosystèmes sont les complexes responsables de la capture de l'énergie lumineuse et de sa transformation en énergie chimique par le biais du processus de la photosynthèse. Ces photosystèmes sont constitués d'une antenne (LHCI pour le PSI et LHCI pour le PSII) et d'un centre réactionnel (RCI pour le PSI et RCII pour le PSII).

A - Photosystème I (PSI)

1- Centre réactionnel du PSI

Le centre réactionnel du PSI a été mis en évidence par Kok en 1961. Cette entité dont le maximum d'absorption est à 700 nm, comprend, pour un P700, 100 à 120 molécules de chlorophylle et 14 à 15 molécules de β -carotène (Bassi *et al.*, 1990 ; Yamamoto & Bassi, 1996). Ce centre réactionnel est composé d'au moins 13 polypeptides appelés Psa (Jupin & Lamant, 1997). Parmi eux on peut citer l'hétérodimère Psa A/Psa B constitué de 2 polypeptides de 82-83 kDa, le polypeptide de 8,9 kDa (Psa C) associé aux centres Fe-S F_A/F_B , Le polypeptide stromatique d'ancrage de la Ferredoxine (Psa D) de 17,9 kDa et le polypeptide luminal d'ancrage de la plastocyanine (Psa F) de 17,3 kDa (Golbeck, 1992).

2 - Antennes du photosystème I

Les antennes périphériques du PSI (LHCI) contiennent des molécules de Chl a et Chl b (80 Chl/complexe) et quelques caroténoïdes tels que la lutéine et la violaxanthine (Siefertmann-Harms, 1985)

B - Photosystème II

1 - Centre réactionnel du PSII

La mise en évidence du centre réactionnel du PSII n'a pu avoir lieu qu'une dizaine d'années après celle du PSI. Ceci a été réalisé par Witt (Jupin & Lamant, 1997) grâce à la spectroscopie d'éclair rapide. Le donneur primaire d'électrons du PSII est comparable au P700 du PSI, mais son maximum d'absorption se situe au voisinage de 680 nm et appelé pour cette raison P680. C'est un dimère de chlorophylle a.

Le cœur du PSII est un complexe de 5 polypeptides hydrophobes. Les protéines D1 et D2 d'environ 32-33 KDa (gènes *psb A* et *psb D*) correspondent au centre actif du PSII qui permet la séparation des charges. Les polypeptides de 47 et 43 KDa (gènes *psb B* et *psb C*) jouent le rôle d'antennes "propres" au PSII (complexes antennaires internes CP₄₃ et CP₄₇) car une vingtaine de molécules de chlorophylle est associée à chacun de ces deux polypeptides plus le cytochrome b₅₅₉ associé à un polypeptide de 9kDa (*psb E*). Les trois polypeptides extrinsèques situés dans le lumen et dont les masses molaires sont 33, 24 et 17 KDa ont une fonction dans le système enzymatique de photo-oxydation de l'eau, car leur élimination altère le dégagement d'oxygène. Ils sont codés par des gènes nucléaires

2- Antennes du PSII

En ce qui concerne les antennes associées au PSII, la situation est complexe. On distingue un complexe majeure (LHCIIb) et 3 à 4 complexes mineurs (CP₂₄, CP₂₆ et CP₂₉ ainsi que LHCIIa). Tous ces LHC comportent des polypeptides voisins (gènes *Cab*) codés par le noyau. Les complexes mineurs associés étroitement au cœur du PSII contiennent en général moins de Chl b et possèdent de la violaxanthine et de la zéaxanthine (Yamamoto & Bassi, 1996)

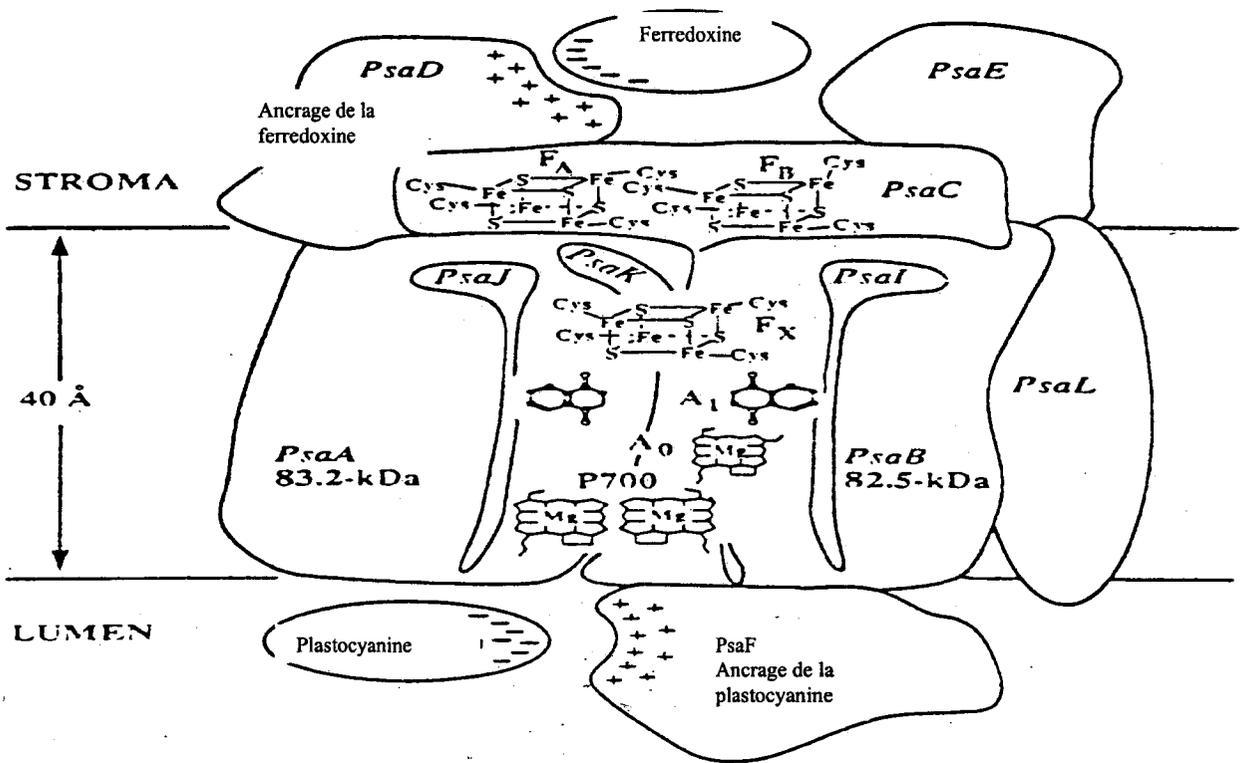


Figure 4 : Schéma du photosystème I. D'après Golbeck, (1992).

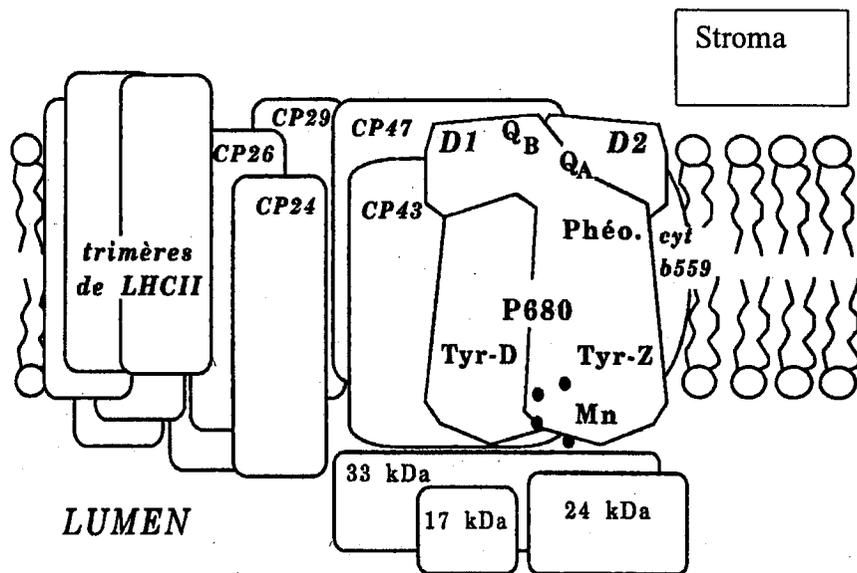


Figure 5 : Représentation schématique de la structure du photosystème II. D'après Jupin & Lamant, (1997).

VI - Cycle des xanthophylles

Dans leur environnement naturel les algues comme les Végétaux supérieurs doivent faire face aux changements des facteurs écophysiologicals tels que l'appauvrissement en nutriments, le stress hydrique, le froid et la variation de l'intensité et de la qualité de lumière incidente. Ces facteurs ont des impacts sur l'appareil photosynthétique et sur la photoinhibition. En effet, lorsque l'énergie reçue par un végétal dépasse la capacité de sa transformation par le processus de photosynthèse son excès peut induire le phénomène de photoinhibition voire une photodestruction de l'appareil photosynthétique. Le processus photoprotecteur le plus répandu qu'ont développé les Végétaux supérieurs et les algues est le cycle des xanthophylles.

Le premier à avoir rapporté l'effondrement de la quantité de violaxanthine à la suite d'une exposition de feuilles à une forte lumière était Sapozhnikov en 1957. L'effondrement de la teneur en violaxanthine est accompagné par l'augmentation de celles de deux autres xanthophylles : l'anthéroxanthine et la zéaxanthine (Yamamoto *et al.*, 1962). Plus tard Hager, (1967) et Yamamoto *et al.*, (1967) ont démontré séparément que la violaxanthine peut se reconstituer à partir de la zéaxanthine à l'obscurité ou sous une faible lumière, confirmant ainsi l'interconversion de ces pigments dans un cycle appelé cycle des xanthophylles (Fig. 6).

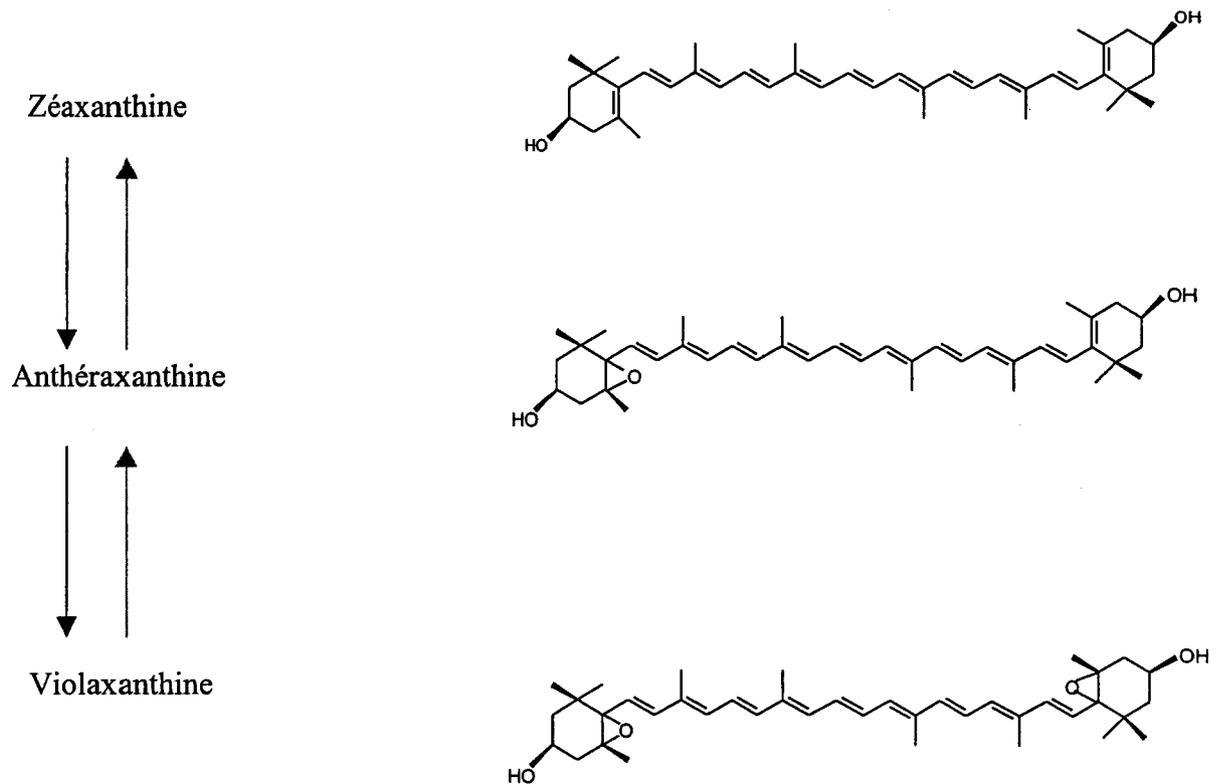


Fig. 6 : Cycle de la violaxanthine. Sous des conditions de stress, la violaxanthine est transformée par dé-époxydation en anthéroxanthine puis en zéaxanthine. Au retour aux conditions normales la restauration lente de la violaxanthine se fait par addition des groupes 5,6- et 5',6'-époxy.

Un tel cycle de la violaxanthine existe chez les plantes supérieures, les fougères, les mousses, et les lichens (Demmig-Adams 1990) mais également chez les algues (Hager 1980). En effet chez les Chlorophytes et Phaeophytes un cycle identique à celui des végétaux supérieurs est observé alors que chez certaines Rhodophytes on note l'absence de la violaxanthine voire de l'anthéroxanthine (Rmiki *et al.*, 1996). Parfois seule la zéaxanthine est présente et aucun cycle d'interconversion pigmentaire n'est observé. C'est le cas par exemple chez les cyanobactéries dont certaines telle que les Spirulines sont très riches en zéaxanthine qui peut représenter près de 40 % du contenu en caroténoïdes. Chez certaines algues comme par exemple, le *Cryptomonas rufescens* (Cryptophyceae) aucun pigment du cycle n'est présent (Lichtlé *et al.*, 1987). Par contre d'autres groupes (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Chloromonadophyceae, Euglenophyceae)

possèdent un autre cycle de xanthophylles impliquant la diadinoxanthine et la diatoxanthine (Fig. 7) (Hager, 1980 ; Arsalane *et al.*, 1994 ; Rmiki *et al.*, 1996)

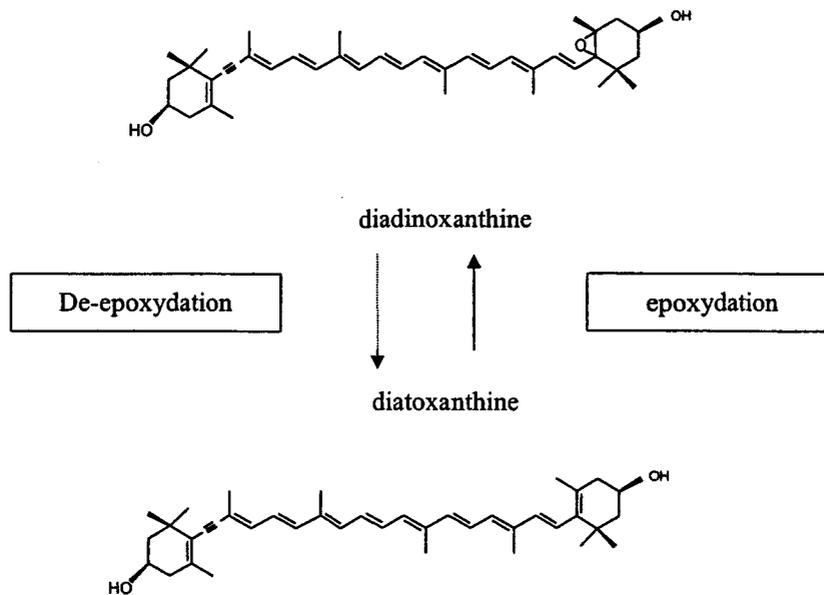


Figure 7 : Cycle de la diadinoxanthine. Sous des conditions de stress la diadinoxanthine peut être dé-époxydée pour donner la diatoxanthine et après arrêt du stress une époxydation de cette dernière peut avoir lieu.

A - Localisation et fonctionnement

Chez des feuilles de tabac en cours de verdissement dont les besoins de photoprotection sont importants, des teneurs en pigments du cycle des xanthophylles supérieures à celles des feuilles adultes ont pu être détectées (Schindler *et al.*, 1994). De même un accroissement de la résistance à la photoinhibition a pu être corrélé chez des chlorelles avec une élévation de la teneur en pigments du cycle (Maxwell *et al.*, 1995). A l'issue d'un stress lumineux les teneurs en zéaxanthine rapportées à la Chl *a* chez les deux Phéophycées *Pelvetia canaliculata* et *Laminaria saccharina* sont très différentes (respectivement 11,0:100 et 2,9:100) en rapport avec leurs localisation opposées de part et d'autre de la zone de balancement des marées (Lemoine *et al.*, 1995 ; Harker *et al.*, 1999). Ainsi chez les végétaux supérieurs comme chez les algues une meilleure phototolérance est associée à un accroissement du pool de pigments concernés par le cycle des xanthophylles.

a- Les xanthophylles du cycle :

Tous les pigments sont probablement liés à des protéines *in vivo*. La localisation précise dans les membranes thylacoïdiennes du cycle des xanthophylles n'est pas établie avec certitude. Ceci est dû en particulier à la grande labilité des liaisons entre les pigments du cycle des xanthophylles et les complexes pigments-protéines qui est responsable de leur détachement lors des extractions. Les premiers articles traitant du cycle des xanthophylles supposaient que la majeure partie de ces pigments était libre mais plus tard on s'est rendu compte qu'ils doivent être pour plus de 80 % liés dans des complexes. Etant donné que les antennes associées aux centres PSII comportent de la violaxanthine, ceci signifie que le cycle des xanthophylles se déroule dans les complexes LHC. La présence de violaxanthine a été mise en évidence aussi bien dans les lamelles stromatiques que dans les lamelles granaires suggérant que le cycle a lieu à la fois au niveau du photosystème I (PSI) et du photosystème II (PSII) (Siefertmann & Yamamoto 1976 ; Noctor *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1994).

Les premiers travaux destinés à tenter de localiser le site de photoconversion au niveau du PSII sont dûs à Bassi *et al.*, (1993). Ces auteurs ont suggéré que la photoconversion n'avait lieu qu'au niveau des complexes mineurs du LHCII (CP₂₄, CP₂₆, CP₂₉). Au contraire le groupe d'Horton (Ruban *et al.*, 1994a) a montré que, étant donné qu'il y a beaucoup plus de complexe majeur LHCIIb que de complexes mineurs, malgré la faible teneur des antennes majeures en xanthophylles, environ 50 % de la zéaxanthine totale peut être liée au LHCIIb et donc le cycle est fonctionnel dans tous les constituants du LHCII.

Les algues brunes sont plus riches en violaxanthine rapportée à la chlorophylle a que les végétaux supérieurs. Chez ces organismes une fraction pure de LHC a pu être préparée (Caron *et al.*, 1988) qui comporte plus de 50 % des pigments totaux et contient, à côté de la chlorophylle a, de fortes teneurs en chlorophylle c, en fucoxanthine et en violaxanthine. Chez *Pelvetia canaliculata*, cette antenne majeure a été séparée en deux fractions par IEF (De Martino *et al.*, 1997). La première fraction enrichie chlorophylle c et fucoxanthine est totalement dépourvue de violaxanthine, montre un transfert d'énergie efficace vers la chlorophylle a, et peut être spécialisée dans la capture de la lumière. La seconde fraction très riche en violaxanthine, semble surtout spécialisée dans le processus de photoprotection et le cycle des xanthophylles fonctionne dans cette fraction sous l'effet d'un excès de lumière.

Le cycle de la violaxanthine a également été détecté dans les antennes du PSI (Thayer & Bjorkman, 1992). Cependant il a été possible de démontrer la présence d'un pool de violaxanthine phototransformable en zéaxanthine en l'absence totale de protéine du LHC chez le mutant d'orge *chlorina f2* (Krøl *et al.*, 1995). Ces auteurs, de même que Adamska & Klopstech, (1994), suggèrent une éventuelle association de ces xanthophylles avec des ELIPs (Early Light-Induced Proteins) contrairement à Jahns & Krause, (1994) qui proposent que lorsque les antennes sont réduites (plantes cultivées en lumière intermittente) une partie des xanthophylles serait libre dans les membranes des thylacoïdes.

Dans toutes les situations de stress une partie de la violaxanthine n'est pas dé-époxydée. Elle peut représenter de 20 à 35 % du pool total de violaxanthine (Demmig *et al.*, 1987; Foyer *et al.*, 1989 ; Pfündel & Dilley, 1993). Cette proportion pourrait avoir un rôle structural ainsi que des expériences de reconstitution de LHCII *in vitro* l'ont montré (voir Paulsen pour revue 1995)

b- Les enzymes du cycle

Le cycle des xanthophylles est contrôlé par deux enzymes différentes : la violaxanthine déépoxydase et la zéaxanthine époxydase. Ces deux enzymes sont localisées de part et d'autre des membranes thylacoïdiennes. La première est du côté lumen (Hager & Holocher, 1994) et la seconde est du côté du stroma (Yamamoto, 1979)

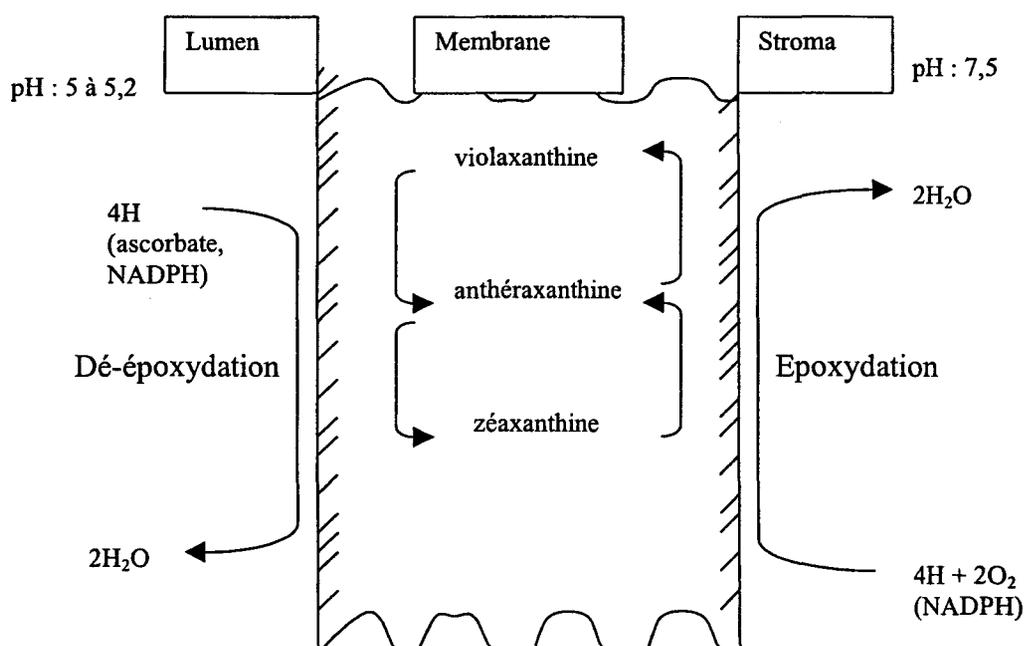


Figure 8 : Schéma de la position des enzymes du cycle des xanthophylles par rapport au stroma.

D'après Frank & Cogdell, (1993)

b-1- Violaxanthine dé-époxydase

Cette enzyme est dépendante du pH, en effet à pH neutre à l'obscurité elle est libre dans le lumen. Un fort éclaircissement fait baisser le pH luménal qui passe en dessous de 6,5 à cause du gradient de protons transmembranaire ce qui entraîne des modifications conformationnelles et permet à l'enzyme de s'attacher à la membrane et assurer la dé-époxydation de la violaxanthine (Hager & Holocher, 1994). Le pH optimum de cette enzyme est d'environ 5,2 (Hager, 1969).

Divers auteurs ont réussi à l'isoler et la purifier (Hager & Perz 1970 ; Yamamoto et Higashi 1978; Arvidsson 1996) et à l'état isolé elle reste active et transforme la violaxanthine sans aucun apport de protéine. Par contre cette activité nécessite un apport lipidique notamment du monogactosyldiacylglycérol (MGDG) principal composant lipidique du chloroplaste (Arvidsson *et al.*, 1996; Havir *et al.*, 1997). Il a été démontré que l'ascorbate est nécessaire pour le fonctionnement de cette enzyme (Foyer *et al.*, 1989 ; Arvidsson *et al.*, 1996). Il a été également rapporté que la disponibilité de la violaxanthine à la dé-époxydation est régulable par exemple par le pH indépendamment du fait de l'activation de l'enzyme par le pH. Les récents travaux estiment sa masse moléculaire à 43 kDa (Arvidsson *et al.*, 1996 ; Rockhlom & Yamamoto, 1996 ; Havir *et al.*, 1997). A basse température l'activité de cette enzyme est pratiquement inhibée (Demmig-Adams *et al.*, 1989; Bilger & Björkman, 1991 ;). Le fait que le DTT (Dithiotréitol) inhibe de façon réversible l'activité de la violaxanthine dé-époxydase supposerait qu'elle possède des groupements disulfures nécessaires à son fonctionnement (Yamamoto & Kamite 1972). Cette enzyme est très spécifique aux caroténoïdes 3-hydroxy-5,6 époxy avec une conformation 3S,5R,6S et une chaîne polyène entièrement sous forme *trans* (Yamamoto & Higashi 1978).

b-2-Zéaxanthine époxydase

Elle est située du côté stromatique de la membrane thylacoïdienne (Yamamoto, 1979 ; Hager, 1980). Elle n'a jamais été purifiée et elle est supposée être liée étroitement à la membrane thylacoïdienne (Yamamoto, 1979). Son pH optimum est de 7,5 et son fonctionnement nécessite de l'oxygène et du NADPH.H⁺ (Hager, 1980).

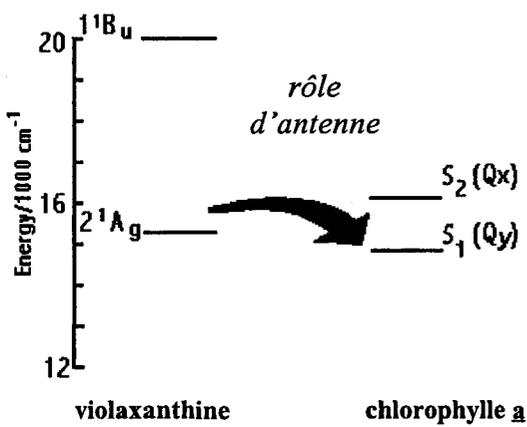
La reconversion de zéaxanthine en violaxanthine via l'anthéaxanthine est plus rapide sous faible lumière qu'à l'obscurité totale probablement en raison de la nécessité de NADPH.H⁺.

L'époxydation non enzymatique de la zéaxanthine *in vivo* par des espèces activées de l'oxygène, a été rapportée par Schubert *et al.*, (1994) sous une forte lumière et des conditions très oxydantes. Les travaux de Büch *et al.*, (1995) et Marin *et al.*, (1996) conduisent à la caractériser comme une enzyme à flavine.

B - Hypothèse du rôle photoprotecteur du cycle des xanthophylles

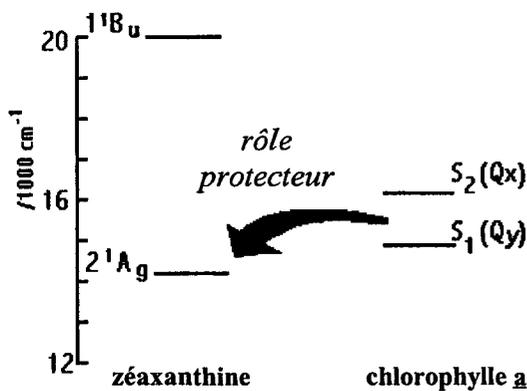
Quand la lumière incidente dépasse la capacité de sa transformation en énergie chimique par le processus de photosynthèse, le rapport PFD/photosynthèse (à l'aide duquel on peut estimer l'excès de la lumière) augmente et la violaxanthine est convertie en anthéaxanthine puis en zéaxanthine. Une relation linéaire a été obtenue entre la quantité de zéaxanthine et la capacité de dissipation d'énergie par voie non photochimique chez plusieurs espèces et sous différentes conditions où la lumière était excessive (Adams & Demmig-Adams, 1992). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les propriétés photoprotectrices du cycle des xanthophylles :

1 : la zéaxanthine, produit de la dé-époxydation de la violaxanthine en présence d'une lumière excessive, possède 11 doubles liaisons conjuguées dans son chromophore au lieu de 9 ce qui diminue l'énergie de son état singulet excité le plus bas (2 ¹Ag). Elle peut donc intervenir de façon directe en désactivant la chlorophylle (¹chl.) avec un transfert énergétique de type singulet-singulet (Frank *et al.*, 1994; Young & Frank, 1996). Cette énergie capturée sera ensuite dégagée sous forme de chaleur (Fig. 9).



A

Transfert d'énergie normal



B

Transfert inverse d'énergie

Figure 9 : Le modèle de transfert énergétique montrant les niveaux d'énergie S₁ de la violaxanthine et de la zéaxanthine par rapport à la chlorophylle
 A : fonction antennaire de la violaxanthine
 B : fonction photoprotectrice de la zéaxanthine

2 : La zéaxanthine pourrait aussi participer de façon indirecte à la déviation de l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur (Rees *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1996). L'acidification du lumen (provoquée par la lumière) entraîne la protonation et l'agrégation, des complexes LHCII provoquant ainsi une extinction de la fluorescence de la chlorophylle (Horton *et al.*, 1991). Or, il a été rapporté par Ruban et ses collaborateurs que l'agrégation de LHCIIb provoquée *in vitro* par acidification s'accompagne d'une diminution de la fluorescence de la chlorophylle (Ruban 1994c ; 1997). Cette agrégation peut être stimulée par l'ajout de zéaxanthine et inhibée par celui

de la violaxanthine (Ruban *et al.*, 1997). La zéaxanthine qui est beaucoup plus hydrophobe que la violaxanthine peut provoquer des agrégats même en milieu hydrophobe (Ruban *et al.*, 1993). On peut donc penser que la zéaxanthine (de même que le pH acide) provoquerait l'agrégation des LHCII ce qui entraînerait une extinction de la fluorescence. Certains travaux récents rapportent que la zéaxanthine accélère l'extinction non photochimique (NPQ) dans les antennes mineures (Jennings 1994; Ruban *et al.*, 1996) (Fig. 10).

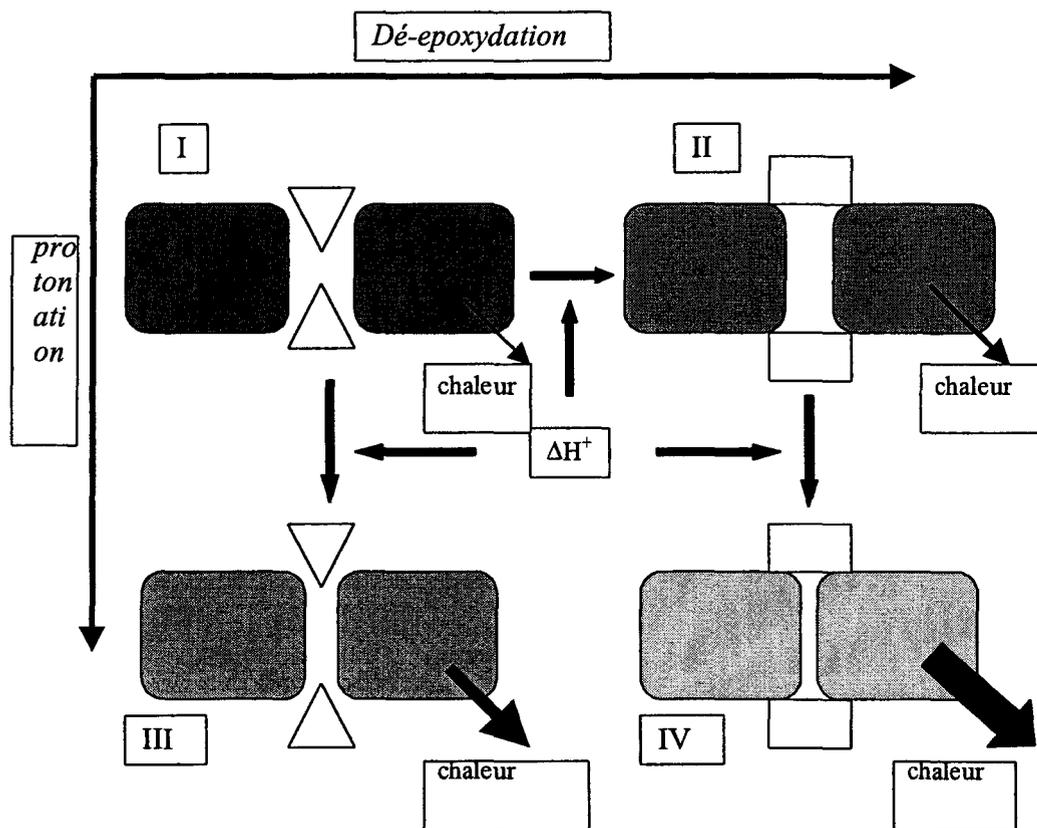


Figure 10 : Modifications structurales des complexes LHCII permettant le contrôle de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Cette dissipation est améliorée par la conversion moléculaire de la violaxanthine (\triangle) en zéaxanthine (\square) et par la protonation de l'apoprotéine (D'après Horton *et al.*, 1996 ; Young & Frank, 1996).

L'anthéaxanthine qui possède un groupement époxyde pourrait jouer le même rôle que la zéaxanthine, (Bilger & Björkman, 1990). L'extinction (quenching) non photochimique de

fluorescence qui a été rapportée en absence de zéaxanthine s'explique par la présence d'anthéaxanthine (Gilmore & Yamamoto, 1993).

3 : l'époxydation pourrait être une manière d'éliminer des espèces activées d'oxygène (Lichtenthaler & Schindler, 1992; Schubert *et al.*, 1994) puisque la zéaxanthine possède deux "sites" pour piéger l'oxygène singulet et donner de la violaxanthine qui subira une nouvelle dé-époxydation. Dans ce cas là l'époxydation serait non enzymatique (Schubert *et al.*, 1994).

4 : une diminution de la fluidité membranaire se produit lorsque la violaxanthine se converti en zeaxanthine sous l'effet d'un stress augmentant ainsi la thermosensibilité des chloroplastes. Simultanément il apparaît que le LHCII préparé à partir de feuilles illuminées est plus pauvre en pigments du cycle des xanthophylles que le LHCII préparé à partir de feuilles adaptées à l'obscurité (Havaux & Gruszecki, 1993). Un déplacement par diffusion de la zéaxanthine depuis les complexes pigments-protéines vers le domaine lipidique environnant (Gruszecki, 1995, Havaux & Tardy, 1995) a été suggéré responsable de cette augmentation de la rigidité membranaire. D'autre part les membranes photosynthétiques qui comportent une très forte proportion d'acides gras insaturés constituent une cible privilégiée pour les peroxydations lipidiques. Il a ainsi été démontré que les dommages peroxydatifs photoinduits au sein d'une feuille sont exacerbés si le cycle des xanthophylles est inhibé par le DTT (Sarry *et al.*, 1994). Ainsi, à coté de son intervention directe sur l'efficacité de la dissipation d'énergie en excès, le cycle des xanthophylles pourrait également accroître la résistance des membranes photosynthétiques à l'égard des stress.

VII - Les caroténoïdes secondaires et leur production par les microalgues

L'exposition à un stress écophysiological provoque chez certaines espèces, en plus du déclenchement du cycle des xanthophylles, une accumulation de caroténoïdes secondaires dans des gouttelettes lipidiques. L'accumulation extraplastidiale de globules lipidiques riches en caroténoïdes a été décrite chez plusieurs espèces de micro-algues. Par contre une accumulation intraplastidiale de globules a été décrite chez les plantes supérieures mais contenant de façon majoritaire de l' α -tocophérol et de la plastohydroquinone et seulement des traces de caroténoïdes (Mendoza *et al.*, 1996).

Chez les algues, les caroténoïdes secondaires sont ceux qui sont accumulés en dehors des thylacoïdes. La biosynthèse des caroténoïdes secondaires chez les microalgues ne répond pas à la même régulation que celle des caroténoïdes "normaux" du chloroplaste appelés par opposition caroténoïdes primaires. En effet la synthèse des caroténoïdes secondaires dépend d'un certain nombre de facteurs environnementaux (appauvrissement du milieu en azote, exposition à une forte lumière, augmentation de la salinité, grandes variations de la température...). Le β -carotène et ses "céto-dérivés": échinénone, 4' hydroxyéchinénone, canthaxanthine et astaxanthine peuvent s'accumuler chez quelques algues sous des conditions de croissance défavorables et l'exemple typique est *Dunaliella salina* var. *bardawil* (Ben-Amotz *et al.*, 1982) décrit comme le seul organisme photosynthétique qui accumule du β -carotène dans des globules intraplastidiaux. Cette microalgue peut accumuler du β -carotène à des niveaux voisins de 14 % du poids frais des cellules (Ben-Amotz *et al.*, 1982 ; Ben-Amotz & Avron, 1990) et est utilisée de façon commerciale. D'autres organismes comme l'Ulvophycée *Trentepohlia aurea* (Czygan & Kalb, 1966) ou encore la cyanobactérie halotolérante *Aphanothece* spp (Berland *et al.*, 1989) peuvent aussi accumuler du β -carotène. D'autres organismes tel que *Protosiphon botryoides* (Berkaloff, 1970) et *Haematococcus* spp. (Hagen *et al.*, 1993 ; 1994), accumulent plutôt la canthaxanthine et l'astaxanthine. Cette accumulation de caroténoïdes a été aussi décrite chez *Euglena gracilis*, *Peridinium foliaceum* et *Chlamydomonas nivalis* responsable des neiges rouges dans les régions polaires (Hagen *et al.*, 1994).

VIII - Le rôle des caroténoïdes secondaires

La fonction de ces caroténoïdes n'est pas établie avec certitude mais on pense qu'ils procurent à la cellule une meilleure résistance à la photoinhibition. Ainsi Ben-Amotz et ses collaborateurs (1987 ; 1989) ont observé une résistance significative à ce phénomène chez les cellules de *Dunaliella* riches en β -carotène par rapport aux cellules pauvres en ce caroténoïde. En effet, *Dunaliella salina* var. *bardawil* accumule du β -carotène dans la nature ou dans des conditions particulières telles que les grandes concentrations en sel ou les fortes lumières (Ben-Amotz *et al.*, 1982). Ces mêmes auteurs pensent que ceci est dû à l'effet écran du β -carotène dans la région bleue du spectre de la lumière.

Dunaliella peut croître sur des milieux contenant de 0,1 M de NaCl à la saturation en sel grâce à sa capacité d'osmorégulation par la production de glycérol intracellulaire en réponse à la concentration en sel du milieu extérieur. *Dunaliella bardawil* produit plus de β -carotène lorsqu'en plus d'une grande concentration en sel il y'a un appauvrissement en azote et une forte lumière (Ben-Amotz *et al.*, 1982).

- La première interprétation de la fonction de l'accumulation du β -carotène supposait que ce caroténoïde protégeait la chlorophylle contre l'oxygène singulet sous les fortes lumières. Ceci a été rejeté une fois qu'il a été établi que l'accumulation se fait dans les espaces interthylacoïdaux qui est en désaccord avec cette hypothèse. En effet, Jiménez & Pick (1993) ont montré que l'accumulation de β -carotène protège *Dunaliella* contre la photoinhibition sans qu'il y ait de réactions avec les radicaux oxygène.
- La deuxième hypothèse émise concernait les fortes lumières et la limitation de croissance. En effet, le β -carotène s'accumule lorsque la croissance est sérieusement limitée ainsi que la productivité photosynthétique. Cette accumulation a été supposée dévier la productivité. Ceci n'est cependant pas en accord avec les résultats de croissance à l'obscurité ou en absence de CO₂ de *Dunaliella* qui accumule du β -carotène dans ces conditions (Ben-Amotz *et al.*, 1982).
- La troisième hypothèse propose que les globules du β -carotène peuvent protéger les cellules contre la photoinhibition sous des conditions de croissance limitantes en absorbant l'excès de la lumière incidente. Cette hypothèse est confortée par celle qui suggère que ces globules de β -carotène absorbent la lumière bleue. Le blocage de la formation de β -carotène par le Norflurazon qui se traduit par une baisse dans la résistance aux traitements photoinhibiteurs conforte aussi cette hypothèse (Ben-Amotz *et al.*, 1987). Le traitement avec le Norflurazon provoque chez *Dunaliella bardawil* une accumulation de phytoène avec une baisse de la quantité de β -carotène.

L'accumulation du β -carotène augmente lorsque la culture de *Dunaliella* se fait sous de fortes intensités à différentes longueurs d'ondes 546 nm, 570 nm et au delà de 645 nm. La caroténogenèse du β -carotène et son accumulation chez cette algue est donc dépendante de l'intensité de la lumière et non pas de sa qualité et le fait que les longueurs d'onde supérieures à 645 nm provoquent une synthèse et une accumulation de β -carotène autant que la lumière blanche permet de supposer que la capture de la lumière par les chlorophylles est suffisante pour

provoquer cette caroténogénèse ainsi que la variation du rapport des isomères du β -carotène. En effet, sous une forte illumination le rapport 9-*cis* β -carotène : trans β -carotène passe de 0,2:1 à 1,5:1 (Ben-Amotz & Avron., 1989).

Nature lipidique des gouttelettes

Dunaliella est donc le seul organisme photosynthétique à accumuler du β -carotène de façon intraplastidiale dans des globules lipidiques. Cette caroténogénèse est corrélée avec l'accumulation de lipides sous des conditions de stress. Ces lipides sont composés essentiellement de lipides neutres et une petite quantité de lipides membranaires apolaires des protéines ou de carbohydrates (Ben-Amotz *et al.*, 1982).

La culture de *Dunaliella salina* sous une température faible (18°C) au lieu de sa température optimale de croissance (30° C) provoque l'accumulation du β -carotène (Ben-Amotz *et al.*, 1982). En effet, Mendoza et ses collaborateurs (1996) ont rapporté une modification significative de la composition des lipides et acides gras chez les cellules cultivées à 18°C par rapport à celles cultivées à 30°C. Ainsi la quantité d'acides gras passe de 11 % à 24.8 % pendant la caroténogénèse induite par ce stress thermique avec une augmentation d'acide palmitique et d'acide oléique (Mendoza *et al.*, 1996). Ces auteurs suggèrent que l'accumulation de β -carotène est un mécanisme impliqué dans l'adaptation des cellules à la température basse.

IX - La microalgue verte : *Haematococcus pluvialis*.

Peu de micro-organismes sont capables d'accumuler de l'astaxanthine : *Chlamydomonas nivalis* (Nelis & De Leenher, 1989), *Euglene rubida* (Czeczuga, 1986), *Acetobularia mediterranea* (Czeczuga, 1986), *Protosiphon botryoides* (Berkaloff, 1970), *Mycobacterium lacticola* (Simpson *et al.*, 1981) *Brevibacterium* spp. (Simpson *et al.*, 1981) et *Phaffia rhodozyma* (Johnson & Lewis, 1979).

L'algue la plus étudiée pour la production d'astaxanthine est l'*Haematococcus pluvialis* bien qu'il y ait peu d'articles concernant la voie de synthèse de ce caroténoïde et sa régulation chez cette algue. L'*Haematococcus* est un thallophyte unicellulaire photosynthétique décrit pour la

première fois par Flotow (1844) ensuite par Braun (1851). C'est une algue verte (Chlorophyte) d'eau douce, qui appartient à l'ordre des Volvocales dont la caractéristique principale est la forme biflagellée.

Sa position systématique est donc :

Embranchement : Chlorophycota

Classe : Chlamydomonadeae

Ordre : Volvocales

Famille : Chlamydomonadaceae

Genre : *Haematococcus*

Espèce : *Haematococcus pluvialis*

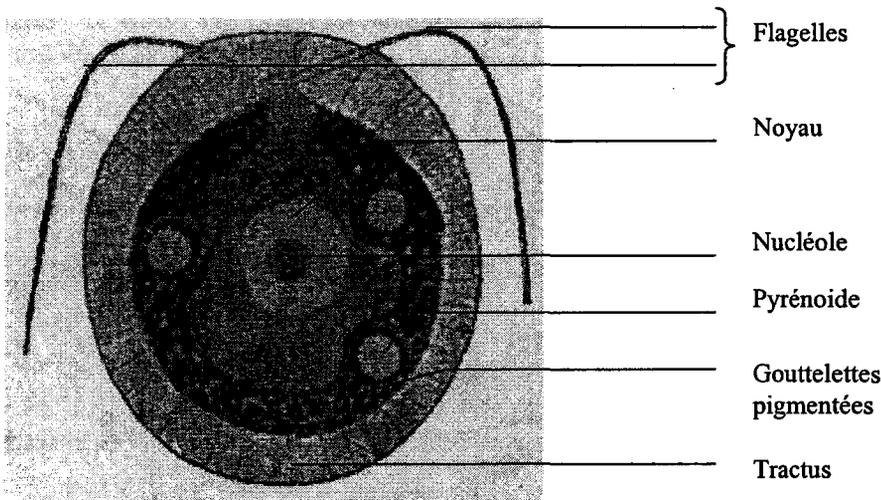


Figure 11 : Représentation schématique d'*Haematococcus pluvialis* d'après Pascher, (1927) représentant une accumulation de globules lipidiques à la périphérie du cytoplasme après levée du stress.

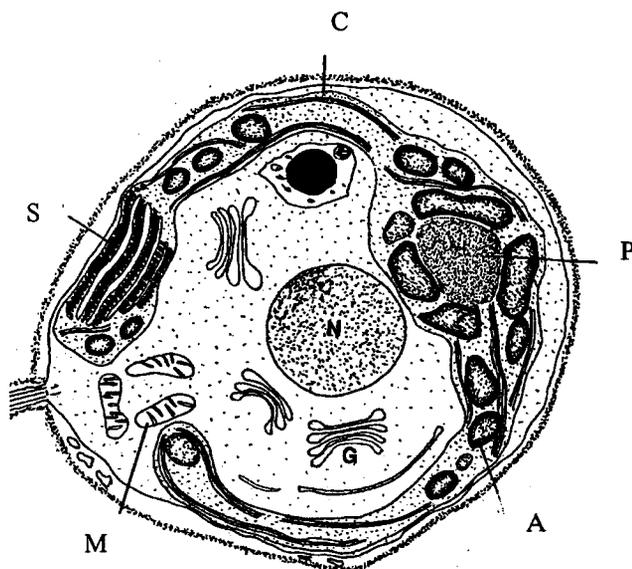


Figure 12 : Représentation schématique des cellules végétatives des volvocales d'après Lee, 1989.
A : globule d'amidon, C : chloroplaste
M : mitochondrie, N : noyau, P : pyrénioïde
S : stigma,

Cette algue est connue comme l'espèce responsable des "pluies sanglantes" et colore de manière épisodique les étangs, les mares et les lacs (Bidigare *et al.*, 1993). Sa distribution géographique est très large et on peut la rencontrer de l'Afrique du Sud et l'Australie jusqu'en Finlande. Cette algue peut se développer sur les milieux minéraux très simples, dans des conditions de lumière très diverses et sous un large intervalle de température de 12 à 33°C (Halldal & French, 1980) avec un maximum d'accumulation d'astaxanthine à 33°C (Tjahjono *et al.*, 1994). Il est déjà établi que *Haematococcus* est capable de se développer dans des milieux de culture préférant l'azote sous forme de nitrates (NO₃⁻). Droop avait rapporté en 1961 que deux souches d' *Haematococcus pluviialis* peuvent utiliser l'azote organique et l'acétate pour croître de façon hétérotrophe à l'obscurité. Cette algue présente un polymorphisme cellulaire important. Elle se présente dans les conditions de culture favorables sous forme de cellules vertes ovales et biflagellées (10 à 15 µm de largeur et 15 à 20 µm de longueur). La paroi, de nature cellulosique, est non adhérente au protoplasme. La connexion entre le protoplasme et la paroi se fait par des tractus de ce protoplasme. Sous des conditions de stress les cellules deviennent sphériques et la paroi s'épaissit.

A - Le stigma

La forme biflagellée est dominante quand les conditions de développement sont favorables. Elle possède comme *Dunaliella* et *Chlamydomonas* un stigma (eyespot), situé dans la partie antérieure du chloroplaste (du côté où sont insérés les flagelles), qui joue un rôle actif dans le phototactisme (Foster *et al.*, 1984; Braune & Ekelund, 1990). Il est riche en caroténoïdes et notamment en β-carotène quelque que soit l'état physiologique de la cellule et ses conditions de culture même en obscurité (Ristori & Rosati, 1983). Chez les volvocales, le stigma a un important rôle dans la reproduction en induisant l'accolement des cellules par le pôle flagellaire (Marano, 1992). Chez les algues vertes *H. pluviialis*, *C. reinhardtii* et *Spermatozopsis similis* il contient un pigment dit rétinale similaire à la rhodopsine provenant du β-carotène (Grung *et al.*, 1994). Ce stigma capte la lumière grâce aux photorécepteurs situés du côté de la membrane cellulaire (Sineshchekov *et al.*, 1990) et transmet un signal aux vacuoles pulsatiles qui par leur contraction permettent le mouvement des flagelles. Le terme stigma est donné communément à une forme spécialisée du thylacoïde contenant des globules lipidiques riches en caroténoïdes. En réalité à ce terme il faut

associer aussi l'ensemble de tubules assemblés sous forme hexagonale et la partie du chloroplaste et de la membrane plasmique couvrant se "stigma" (Grung *et al.*, 1994). La majeure partie des pigments photorécepteurs est localisée du côté de la membrane plasmique (Grung *et al.*, 1994). D'après Foster & Smyth, (1980) 10% des caroténoïdes des cellules sont présents dans les globules du stigma. Kreimer *et al.*, (1991) ont réussi à isoler le stigma intact de la microalgue verte *Spermatozopsis similis*. Grung *et al.*, (1994) ont démontré, chez ce microorganisme, la richesse du stigma en β - ψ -carotène plutôt que le β - β -carotène habituellement rencontré dans le chloroplaste. Ces mêmes auteurs rapportent une baisse de la quantité des xanthophylles dans le stigma par rapport à l'extrait cellulaire (58 % au lieu de 78 %). La quantité des caroténoïdes époxydés (violaxanthine et surtout néoxanthine) diminue dans le stigma par contre la teneur en zéaxanthine est relativement plus importante dans cet organite que dans l'extrait cellulaire. La somme des teneurs en violaxanthine et zéaxanthine reste constante entre l'extrait cellulaire et le stigma. Ceci pourrait être une photoprotection active et permanente de cet organite (Grung *et al.*, 1994). D'après ces auteurs la relative faible quantité dans le stigma, de la néoxanthine et la violaxanthine (pigments associés à la photosynthèse) et corrélée avec la faible teneur en chlorophylle.

B - Stress environnementaux et polymorphisme cellulaire

Dans des conditions de stress ou défavorables au développement de ce microorganisme (appauvrissement du milieu en azote, excès de lumière, variations de températures...) les cellules perdent leurs flagelles et leur forme ovale en faveur d'une forme ronde immobile (Grung *et al.*, 1992).

L'accumulation des caroténoïdes secondaires commence au stade akinète, après l'arrêt de la croissance (Yong & Lee, 1991) et se localisent dans le cytoplasme. Les inclusions cytoplasmiques chargées de pigments se situent d'abord autour du noyau puis augmentent en taille et en nombre et confèrent à l'ensemble une couleur rouge caractéristique et finissent par masquer complètement le chromophore (chloroplaste).

Lorsqu'un de ces stress écophysiologicals s'accroît, un enkystement de ce microorganisme est alors provoqué. Ce phénomène se produit par exemple dans les cultures non renouvelées (Kakizono *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1993). Il est caractérisé par une augmentation

considérable de la taille des cellules qui atteint 60 µm de diamètre, avec la synthèse d'une paroi épaisse procurant une grande imperméabilité aux kystes. L'enkystement de l'*Haematococcus pluvialis* s'accompagne d'une importante accumulation de caroténoïdes secondaires. Kakizono *et al.*, (1992) ont montré qu'une forte augmentation du rapport C/N déclenche l'enkystement associé à la formation d'astaxanthine et à des changements intracellulaires (augmentation du DNA et diminution de la teneur protéique). Kobayashi *et al.*, (1992) ont rapporté la formation de kystes dans des conditions hétérotrophes (à l'obscurité en présence d'acétate). Par ailleurs, l'addition d'acétate avec celle du fer stimule l'accumulation d'astaxanthine chez des cellules vertes en phase de croissance exponentielle (Kobayashi *et al.*, 1991).

Lorsqu'il y'a retour aux conditions de développement favorables, ces formes de résistance rouges donnent naissance, grâce à des mitoses successives à l'intérieur de cette épaisse paroi, à des cellules vertes ovales et biflagellées (4 à 32 cellules) avec une variation de la quantité des caroténoïdes secondaires (Lee & Ding, 1994). Ce développement s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la paroi qui devient plus perméable et par conséquent les cellules deviennent sensibles aux différents stress (Hagen *et al.*, 1993).

X - Astaxanthine

Parmi les caroténoïdes secondaires synthétisés par les microalgues on trouve le cétocaroténoïde : astaxanthine. Ce pigment a été longtemps nommé "haematochrome". Ce nom a été généralement appliqué au pigment rouge-orangé accumulé chez *Haematococcus pluvialis* ainsi qu'aux pigments rouges du stigma (eyspot) de différentes microalgues flagellées.

Cette xanthophylle rouge tient son nom de celui de l'écrevisse dénommée en latin *Astacus astacus*. Sa formule est C₄₀H₅₂O₄ (3,3' dihydroxy-β-β carotène-4,4' dione) avec une masse molaire de 596,9 et un point de fusion à 224°C. Son coefficient d'extinction spécifique ($A_{1cm}^{1\%}$) est 2100 à 480 nm dans le méthanol. L'astaxanthine est soluble dans la plupart des solvants organiques à des concentrations variables de 0,2 à 30 g.l⁻¹. Cette molécule peut exister sous quatre configurations différentes grâce à la présence de deux atomes de carbone asymétriques en position 3 et 3'. L'astaxanthine est un produit de la voie mévalonique dont le précurseur est l'acétate, elle est formée à partir du phytoène par desaturation, cyclisation et oxygénation (Grung *et al.*, 1992).

La forme libre d'astaxanthine peut être estérifiée par des acides gras surtout en C_{18:1} (C_{16:0}; C_{18:1}; C_{19:0} et C_{20:0}) (Renstrøm & Liaaen-Jensen, 1981) et donner des mono et di-esters d'astaxanthine. A la différence avec les cellules à fine paroi majoritaires au début de la phase stationnaire chez qui domine l'astaxanthine monoesters, chez celles possédant une paroi épaisse c'est la forme diester de l'astaxanthine qui est prépondérante (Grung *et al.*, 1992). Ce caroténoïde peut être associé à une protéine. Le complexe de 320 kDa astaxanthine-protéine (α -Crustacyanine) a des propriétés d'absorption différentes de celles de l'astaxanthine libre et le décalage bathochromique de 150 nm confère par exemple une couleur bleue-grise aux crevettes avant cuisson ou bleue à la carapace du homard (Britton *et al.*, 1997).

A- L'astaxanthine dans la chaîne trophique

Ce caroténoïde est utilisé pour induire la pigmentation de la chair des poissons (saumonisation de la truite) et également pour la coloration des jaunes d'œufs en aviculture (Parajó *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1980).

Les animaux n'étant pas capables de synthétiser les caroténoïdes, sont obligés de se les procurer dans le régime alimentaire. Ainsi les caroténoïdes se trouvent transmis le long de la chaîne trophique. Par exemple, dans les écosystèmes d'eau douce, le zooplancton herbivore (protozoaires et rotifères) qui se nourrit de microalgues dont l'*Haematococcus pluvialis*, sert de nourriture aux microcrustacés. Ces derniers sont la proie des flamands roses (*Phaeocopterus rosens*) et des poissons (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo gairdneri*) leur transmettant leur réserve en caroténoïdes (astaxanthine).

L'astaxanthine est le caroténoïde dominant chez les animaux aquatiques marins ou dulcicoles (crustacés, poissons, mollusques, échinodermes, cnidaires...) ou certains oiseaux (flamands roses)

B - Rôle photoprotecteur de l'astaxanthine

La comparaison directe entre l'accumulation extraplastidiale d'astaxanthine et ses formes estérifiées chez l'*Haematococcus* et celle du β -carotène chez *Dunaliella salina* a été rejetée par Boussiba & Vonshak, (1991) en raison en particulier de la différence de lieu de stockage de ces

caroténoïdes secondaires chez ces deux microalgues. En effet, chez *Haematococcus* l'astaxanthine est accumulée dans des gouttelettes lipidiques extraplastidiales alors que le β -carotène est stocké dans les espaces interthylacoïdaux chez *Dunaliella* (Yong & Lee 1991). Toutefois, malgré cette différence du lieu du stockage, l'astaxanthine, chez *Haematococcus*, jouerait le même rôle photoprotecteur (Hagen et al. 1993). Que celui suggéré par Ben-Amotz *et al.*, (1989) pour le β -carotène chez *Dunaliella*. Ces gouttelettes lipidiques associées aux caroténoïdes seraient un écran qui absorberait les radiations en excès et notamment dans la région bleue de la lumière. En effet cette région de la lumière provoque plus efficacement que les radiations rouges la formation de l'astaxanthine (Kobayashi *et al.*, 1993).

Les caroténoïdes secondaires chez *Haematococcus* peuvent jouer un rôle d'écran, offrant ainsi une meilleure photoprotection aux cellules flagellées très sensibles aux conditions environnementales. Il a été suggéré que l'accumulation intrachloroplastique du β -carotène chez *Dunaliella* pourrait faire baisser le phototactisme en réduisant la qualité de lumière atteignant le stigma (Borowitzka *et al.*, 1986). La baisse de la précision phototactique chez les cellules flagellées rouges d'*Haematococcus* est due à l'augmentation du phototactisme négatif en particulier vis-à-vis des fortes irradiances. Hagen & Braune, (1993) proposent, en raison du faible degré de corrélation entre l'accumulation des caroténoïdes secondaires et la baisse dans la précision de la photo-orientation des cellules, qu'il existerait un mécanisme plus complexe que le simple écran que jouerait ces caroténoïdes vis-à-vis du photorécepteur localisé dans le stigma. Selon ces auteurs, en plus de l'effet écran joué par ces caroténoïdes entre la lumière et les photorécepteurs, cette modification du phototactisme peut être due à la faible transmission de la lumière bleue dans les cellules à grande teneur en caroténoïdes secondaires ce qui impliquerait une augmentation, par adaptation, de la sensibilité des photorécepteurs qui pourrait être responsable des étranges réactions phototactiques.

XI - Biosynthèse de l'astaxanthine

Les différentes étapes de la biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes supérieures et les algues vertes sont très étudiées et beaucoup d'éléments de cette voie de biosynthèse sont désormais bien connus grâce notamment à l'utilisation de différents inhibiteurs qui affectent les réactions conduisant à la forme phytoène (1^{ère} molécule en C₄₀) puis aux xanthophylles (Britton,

1993). Cependant la voie de biosynthèse conduisant à l'astaxanthine chez les formes de résistance d'*Haematococcus* (aplanospores) n'est pas totalement élucidée.

Chez *Haematococcus pluvialis* l'accumulation de l'astaxanthine peut atteindre 8 % de la masse de matière fraîche (Lee & Soh, 1991; Tsavalos *et al.*, 1992). Cette microalgue accumule l'astaxanthine libre (en faible quantité) et surtout ses mono et di-esters.

Contrairement à ce qui se passe chez la levure *Phaffia rhodozyma* où l'astaxanthine est un caroténoïde primaire produit en phase de croissance exponentielle (Johnson & Lewis, 1979) chez *Haematococcus* l'astaxanthine est synthétisée seulement pendant la phase stationnaire. En outre, l'astaxanthine synthétisée par *Haematococcus* est à 99 % constituée de l'isomère (3S,3'S) cette pureté chiroptique est à l'opposé de celle découverte chez la levure *Phaffia rhodozyma* où l'énantiomère majoritaire est (3R,3'R) à 98 % (Bjerkeng, 1997).

L'élaboration d'astaxanthine dépend des enzymes photosensibles notamment en radiation bleue (De Fabo, 1980) telles que les isomérasés, les désaturases et les oxydoréductases activant la formation de géranyl-géranyl di-phosphate, de β -carotène et d'astaxanthine comme produit final notamment à partir d'éléments carbonés synthétisés au cours du cycle de Calvin.

Il semble que la synthèse d'astaxanthine chez l'*Haematococcus pluvialis* se fasse à partir du β -carotène via l'échinénone, la canthaxanthine et l'adonirubine (Harker & Hirschberg, 1997). Lotan & Hirschberg, (1995) ont isolé récemment un gène "crtO" à partir de *H. pluvialis* qui code pour l'enzyme β -C-4-oxygénase, cette enzyme convertit le β -carotène en canthaxanthine par oxydation au niveau du C₄ et C'₄. L'introduction de ce gène dans le génome d'*Escherichia coli*, qui produit du β -carotène, permet à cette bactérie de synthétiser de la canthaxanthine à partir du β -carotène via l'échinénone. En outre ce gène permet chez *Synechococcus* de produire l'astaxanthine et ses différents cétocaroténoïdes intermédiaires indiquant que la β -carotène hydroxylase, qui convertit normalement le β -carotène en zéaxanthine en introduisant des groupes hydroxyl au niveau du C₃ et C'₃ peut aussi intervenir dans la synthèse d'astaxanthine. En faisant exprimer ce gène (crtO) chez *E. coli* en plus de l'introduction d'un autre gène "crtZ" provenant de la bactérie épiphyte *Erwinia herbicola* et codant pour une β -carotène hydroxylase, Harker & Hirschberg, (1997) ont obtenu une grande variété de cétocaroténoïdes dont la (3S,3'S) astaxanthine. Ces deux gènes ne sont pas encore séquencés. Toutefois il n'a pas été déterminé dans quel ordre ces enzymes agissent c'est-à-dire si les groupes "céto" ou les groupes hydroxy sont introduits en premier chez le β -carotène respectivement par le produit du gène "crtO" au niveau du C₄ et C'₄ ou celui

du gène "crtZ" au niveau du C₃ et C'₃. Ces deux enzymes sont actives chez des cyanobactéries transgéniques, où ont été détectées à la fois la présence de zéaxanthine et de canthaxanthine. En outre la présence, chez ces cyanobactéries transformées, de l'adonixanthine, l'adonirubine et l'astaxanthine montre clairement qu'au moins une de ces deux enzymes, sinon les deux, peut utiliser un substrat caroténoïde qui possède un groupe contenant de l'oxygène. Il serait donc intéressant de pouvoir introduire, exprimer et conserver ce gène "crtO" chez d'autres organismes tels que les plantes supérieures, possédant déjà une β-C-3-hydroxylase, qui produiraient ainsi de l'astaxanthine; caroténoïde d'importance économique. Toutefois le niveau maximum des cétocaroténoïdes détecté dans les cellules transformées de cyanobactéries ne dépasse pas 15% de la composition totale de caroténoïdes mais ils représentent 30% du total des xanthophylles. La grande quantité de β-carotène localisée dans les centres réactionnels photosynthétiques chez ces cyanobactéries pourrait en partie expliquer le faible taux de conversion. La fonction exacte de la zéaxanthine parfois abondante chez les cyanobactéries n'a pas encore été déterminée. La localisation ni la chiralité des cétocaroténoïdes n'ont été déterminées chez les cyanobactéries toutefois il paraît qu'ils sont uniquement sous la forme libre et non pas estérifiée comme dans le cas de *H. pluvialis*. En raison de l'absence de certaines structures cellulaires chez les cyanobactéries, les cétocaroténoïdes synthétisés sont instables et sujets à une dégradation relativement importante par rapport aux autres caroténoïdes déjà détectés dans ces cellules. La β-C-4-oxygénase extraite à partir d'algues peut fonctionner dans un système hétérologue (cyanobactéries) sans nécessiter l'apport de facteurs spécifiques et donc en utilisant simplement les substrats naturels dans un environnement physiologique qui est la membrane plasmique.

Il est évident maintenant que le β-carotène, chez *Haematococcus*, est un précurseur d'astaxanthine. Les travaux de Harker et Young, (1995) suggèrent l'existence de deux voies de synthèse d'astaxanthine à partir du β-carotène, l'une aurait comme produits intermédiaires respectivement échinénone → canthaxanthine → adonirubine alors que la deuxième voie passerait par β-cryptoxanthine → zéaxanthine → adonixanthine. Ces deux voies de synthèse aboutissent à l'astaxanthine qui sera estérifiée par la suite. Ces deux voies parallèles de biosynthèse utilisant des gènes différents pour aboutir à un même caroténoïde ont été décrites chez la tomate (Fraser *et al.*, 1994). Les travaux de Chumpolkulwong *et al.*, (1997) confirment l'existence de ces deux voies conduisant à l'astaxanthine via la zéaxanthine ou la canthaxanthine. Dans leurs travaux, ces

auteurs ont pu convertir le β -carotène en zéaxanthine et surtout en astaxanthine à raison de 40 à 70 %. Cette conversion enzymatique, améliorée par l'ajout de NADPH et d'oxygène, n'est efficace qu'en présence de membranes associées aux enzymes. En effet, les expériences qu'ils ont réalisées avec le tampon de cette conversion et les enzymes purifiées ou libres dans l'extrait cellulaire ont conduit soit à une forte dégradation du β -carotène ou à une très faible conversion de celui-ci. Les travaux de Harker & Hirschberg, (1997) confirment l'existence de ces deux voies tout en suggérant l'existence de deux autres intermédiaires : 3'-hydroxyéchinénone et 3-hydroxyéchinénone qui pourraient provenir chacun à la fois de l'échinénone ou de la β -cryptoxanthine pour aboutir soit à l'adonirubine ou à l'adonixanthine (fig. 13 et 14). Fraser *et al.*, (1998) confirment l'existence de différents intermédiaires de synthèse d'astaxanthine et la possibilité de différentes voies (fig. 13 et 14).

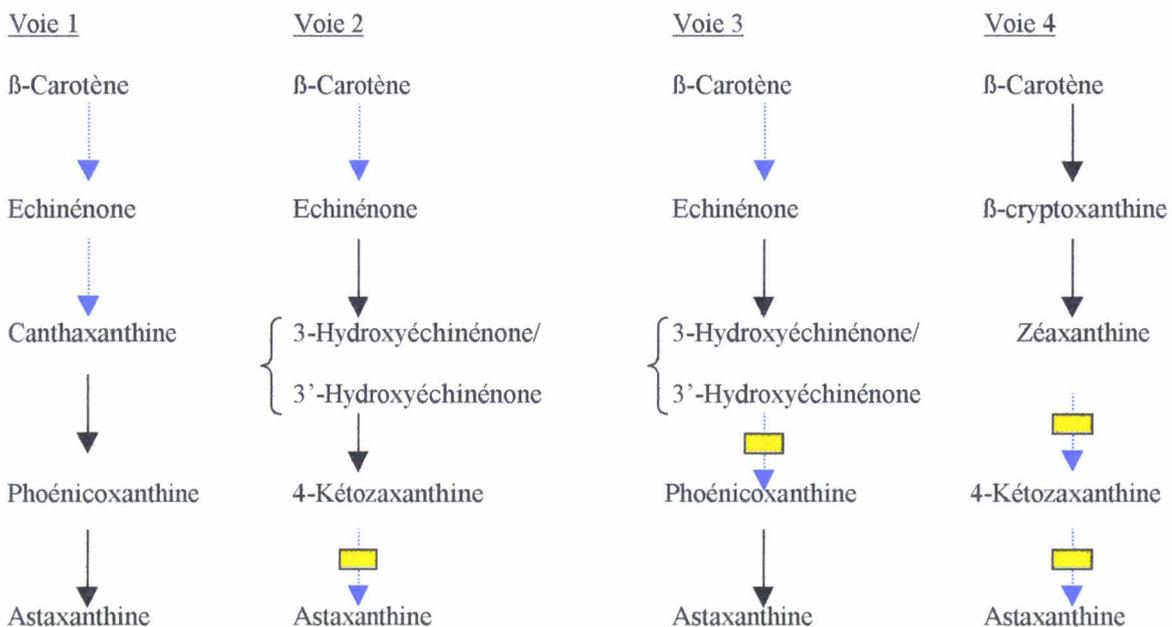


Figure 13 : quatre combinaisons hydroxylation-cétonisation possibles d'après Fraser *et al.*, 1998.

Réaction catalysée par \longrightarrow : 4,4'-oxygénase ; \dashrightarrow : 3,3'-hydroxylase.

: conversion de très faible performance.

Voie de biosynthèse commune aux caroténoïdes

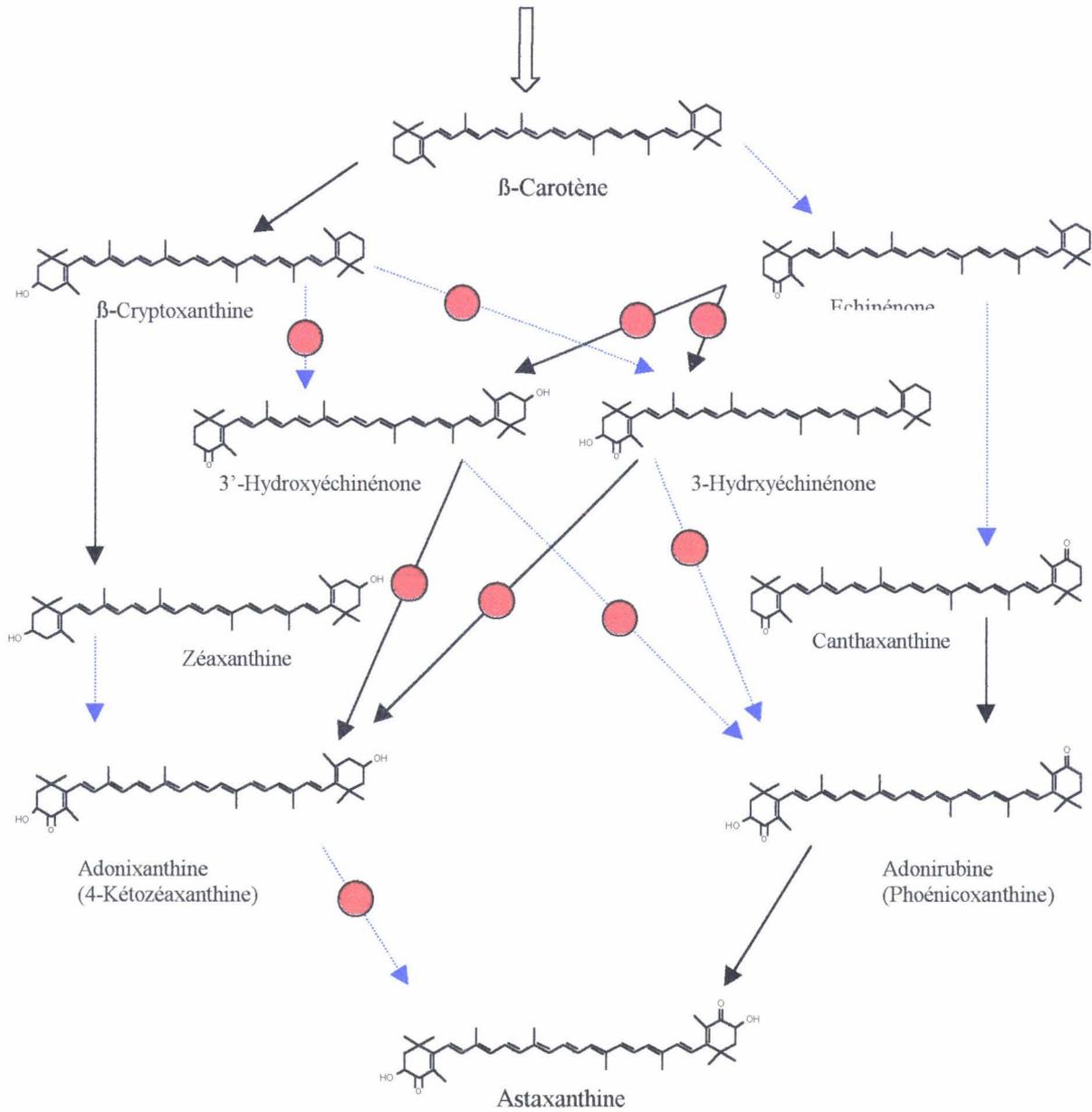
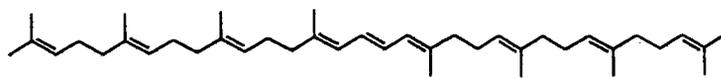
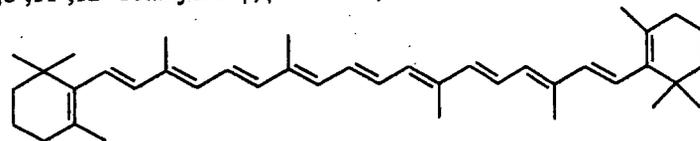


Fig 14 : voies et intermédiaires de biosynthèse d'astaxanthine (d'après Harker & Hirschberg, 1997 et Fraser *et al.*, 1998.). \longrightarrow : Hydroxylation, $\cdots\longrightarrow$: Cétonisation

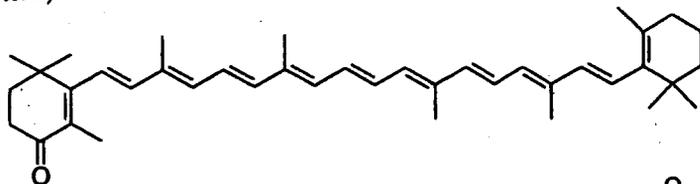
\bullet : conversions enzymatiques confirmées par Fraser *et al.*, 1998.



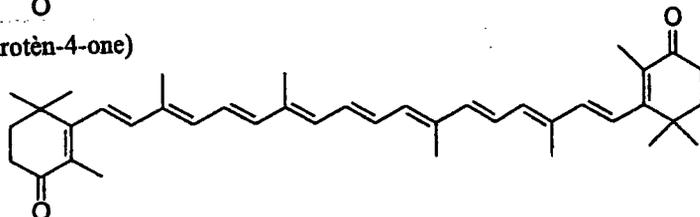
Phytoène : $C_{40}H_{64}$ (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahydro- ψ,ψ -carotène)



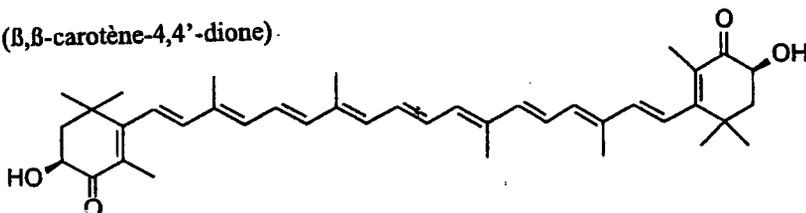
β -Carotène : $C_{40}H_{56}$ (β,β -carotène)



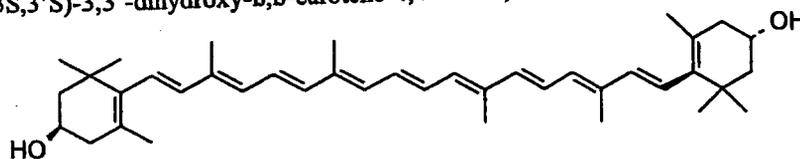
Echinénone : $C_{40}H_{54}O$ (β,β -carotène-4-one)



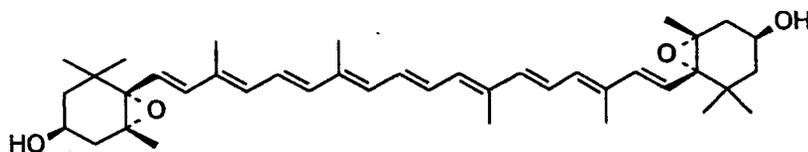
Canthaxanthine : $C_{40}H_{52}O_2$ (β,β -carotène-4,4'-dione)



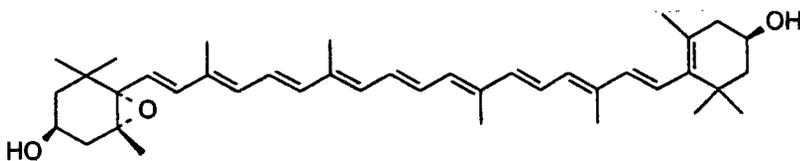
Astaxanthine : $C_{40}H_{52}O_4$ (3S,3'S)-3,3'-dihydroxy- β,β -carotène-4,4'-dione)



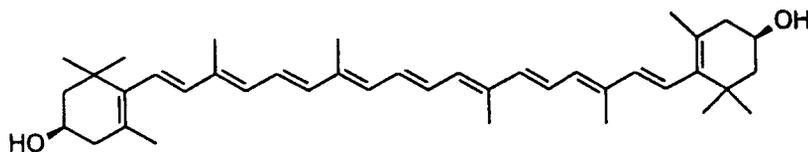
Lutéine : $C_{40}H_{56}O_2$ ((3R,3'R,6'R)- β,ϵ -carotène-3,3'-diol)



Violaxanthine : $C_{40}H_{56}O_4$ ((3S,5R,6S,3'S,5'R,6'S)-5,6,5',6'-diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -carotène-3,3'-diol)



Anthéroxanthine : $C_{40}H_{56}O_3$. ((3S,5R,6S,3'R)-5,6-epoxy-5,6-dihydro- β,β -carotène-3,3'-diol)



Zéaxanthine : $C_{40}H_{56}O_2$ ((3R,3'R)- β,β -carotène-3,3'-diol)

Figure 15 : Formules des différents caroténoïdes chez *H. pluvialis*.

Matériel et Méthodes

I - Matériel végétal

La majeure partie de nos études a été réalisée avec une souche (Hélios C-0048) d'*Haematococcus pluvialis* (Flotow) fournie par le laboratoire "Héliosynthèse" dirigé par le Dr. Gudin (CEA de Cadarache). Cette microalgue a été essentiellement cultivée en culture continue (bioréacteur).

Une deuxième souche d'*Haematococcus pluvialis* a été trouvée sur le Campus universitaire de Calais et a été isolée et rendue axénique au laboratoire. Cette souche a servi essentiellement aux études de fluorescence de la chlorophylle.

Purification et axénisation de la souche de Calais

La souche récoltée à Calais a été isolée des autres microalgues qui l'accompagnaient en réalisant des cultures en tubes à essai. Dans ces tubes des dilutions en cascade du milieu de culture (Bristol) modifié, ont été réalisées à partir de la suspension mère contenant principalement l'*Haematococcus* en plus des autres espèces algales. Ceci nous a permis de récupérer le tube contenant le moins de contamination par les autres microalgues. Le contenu de ce tube a été mis en culture de façon à l'enrichir en *Haematococcus* pour servir à d'autres dilutions en cascade. Nous avons répété la même manipulation quatre fois successives à l'issue desquelles une espèce est restée toujours présente dans notre culture : il s'agit de *Chlamydomonas spp.* dont nous nous sommes débarrassés en procédant à des cultures sur milieu gélosé (Agar-agar 15 g/l) qui nous ont permis de récupérer des colonies bien distinctes d'*Haematococcus* et réussir à rendre la culture unialgale. L'axénie a été obtenue par une centrifugation sur un gradient de densité discontinu de Percoll (Pharmacia) qui a permis d'isoler les "grosses" cellules enkystées d'*Haematococcus* des petites cellules et bactéries.

Le Percoll stérile a été ajouté au milieu de culture (préalablement stérilisé à l'autoclave, 121°C, 20 min) à raison de 20, 40, 60 et 80 % (v/v). Ces différentes densités ont été coulées successivement dans un tube pour centrifugation dans un ordre de concentrations décroissant en évitant leur interpénétration.

La suspension cellulaire est déposée à la surface des gradients puis centrifugée pendant 10 min à 2500 x g. Les fractions cellulaires situées au niveau des interfaces du gradient sont prélevées puis examinées au microscope. Les fractions contenant des cellules ovales chlorophylliennes sont utilisées pour réaliser des cultures synchrones

II - Synchronisation de la culture

Les cellules d'*Haematococcus* présentent un important polymorphisme et leur diamètre moyen peut passer de 15 µm (cellules ovales flagellées) à 60 µm (kystes ronds immobiles). La coexistence dans la même culture de tous les stades d'âge et de diverses tailles rendait difficile sinon impossible l'observation et l'étude du cycle de vie de cette microalgue. La réalisation des expériences de caroténogénèse due aux stress écophysologiques nous imposait également de travailler avec des cellules jeunes et des cultures synchrones. Il était donc important de travailler avec un matériel végétal uniforme. Le bioréacteur a permis de remplir, facilement, cette condition pour la première souche (Hélios C-0048), alors que la seconde souche (Calais) a été synchronisée par l'utilisation du gradient de densité discontinu de Percoll (voir § précédent). En effet, nous avons réalisé un isolement de petites cellules vertes à l'interface entre les fractions comportant 20 % et 40 % de Percoll. Cet aliquote a servi d'inoculum et permis la synchronisation de la culture utilisable pendant 12 semaines.

III - Culture d'*Haematococcus pluvialis*

A - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu Bristol modifié ou MMB (Bold, 1949). Cette modification a porté essentiellement sur la multiplication de la concentration d'azote par trois

pour améliorer la croissance de la souche utilisée sans toutefois inhiber la caroténogénèse. La composition de ce milieu est donnée dans le tableau I.

Tableau I : Composition du milieu de culture d'*H. pluvialis* (Bristol modifié).

	Composition	Concentration mg.l ⁻¹
Macroéléments	NaNO ₃	750
	CaCl ₂ .2H ₂ O	25
	MgSO ₄ .7H ₂ O	75
	Fe-EDTA	20
	K ₂ HPO ₄	75
	KH ₂ PO ₄	175
	NaCl	20
Microéléments	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
	MoO ₃	0,036
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,09

B - Culture non renouvelées (Batch) dans des fioles Erlenmeyers

La culture non renouvelée se fait dans un système clos avec seulement un échange gazeux stérile avec le milieu extérieur. La culture se fait dans des conditions environnementales favorables pour les microorganismes (pH : 7, température : 20°C ±1, lumière, salinité...).

La souche "Calais" a été cultivée dans des fioles "Erlenmeyer" avec ou sans agitation avec un éclairage de 50 µmoles photons.m⁻².s⁻¹. L'agitation a été assurée par un incubateur rotatif (Gallenkamp New-Brunswick) dont la vitesse a été réglée à 50 tours/min.

La culture en fioles sans renouvellement de milieu ni ajout d'éléments nutritifs a été utilisée essentiellement dans deux objectifs, la conservation de la souche ou bien la formation d'aplanospores par appauvrissement du milieu. Les repiquages successifs ont été les moins

fréquents possibles pour éviter de sélectionner les mutations spontanées de la souche. En général 12 à 13 semaines suffisaient pour produire des aplanospores par appauvrissement du milieu en éléments nutritifs sans aucun stress supplémentaire. La culture non renouvelée a été utilisée également dans les essais d'amélioration du milieu de culture (voir matériel et méthodes § IV).

C - Culture sur milieu solide

La culture de *Haematococcus* sur milieu gélosé destinée à conserver les souches, a été réalisée sur du Bristol auquel a été rajouté de l'Agar-Agar à raison de 10g/l. Ce mélange stérilisé a été réparti, en surfusion, dans des boîtes de Pétri. Sur ce milieu solide (refroidi) ont été inoculées des suspensions algales ou des colonies prélevées sur un autre milieu solide.

D - Culture continue en bioréacteur

Le bioréacteur utilisé de type "air lift" mis au point au laboratoire du Dr. Gudin (Salazar-Gonzalez, 1995), est une ampoule en verre Pyrex de 40 cm de longueur et 12 cm de diamètre extérieur avec un volume intérieur de 2,5 l. Il comporte une double paroi permettant une régulation de la température par circulation d'eau à 20 °C (± 1 °C). A la base de ce bioréacteur un système de bullage (air + CO₂) assure d'une part l'apport de l'oxygène et du CO₂ pour le déroulement de la respiration et de la photosynthèse et d'autre part l'homogénéisation de la culture en remettant en suspension les cellules qui ont tendance à sédimenter dans le fond de l'ampoule. La diffusion de l'air se fait à travers un verre fritté avec un débit de 10 V/V/H (volume du gaz/volume de culture/heure) et enrichi de 1 % de CO₂ (Fig. 16). Un apport d'éléments nutritifs dans le bioréacteur a été assuré par un flux constant de milieu dont l'équivalent est éliminé sous forme de trop plein. Le débit de renouvellement du milieu nutritif est de 1,15 ml/min. L'équivalent du contenu du bioréacteur est, ainsi, entièrement renouvelé en 35 heures. Le bioréacteur est éclairé de façon continue (24h/0h) par une série de tubes fluorescents blancs (50% de Gro-Lux F30W/Gro et 50% Cool White F30W/133 Sylvania Germany) disposés verticalement autour de ce bioréacteur. Cette combinaison de sources lumineuses permet d'obtenir un spectre de lumière qui se rapproche de celui de la lumière du jour. Ces tubes délivrent 50 $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au niveau du bioréacteur.

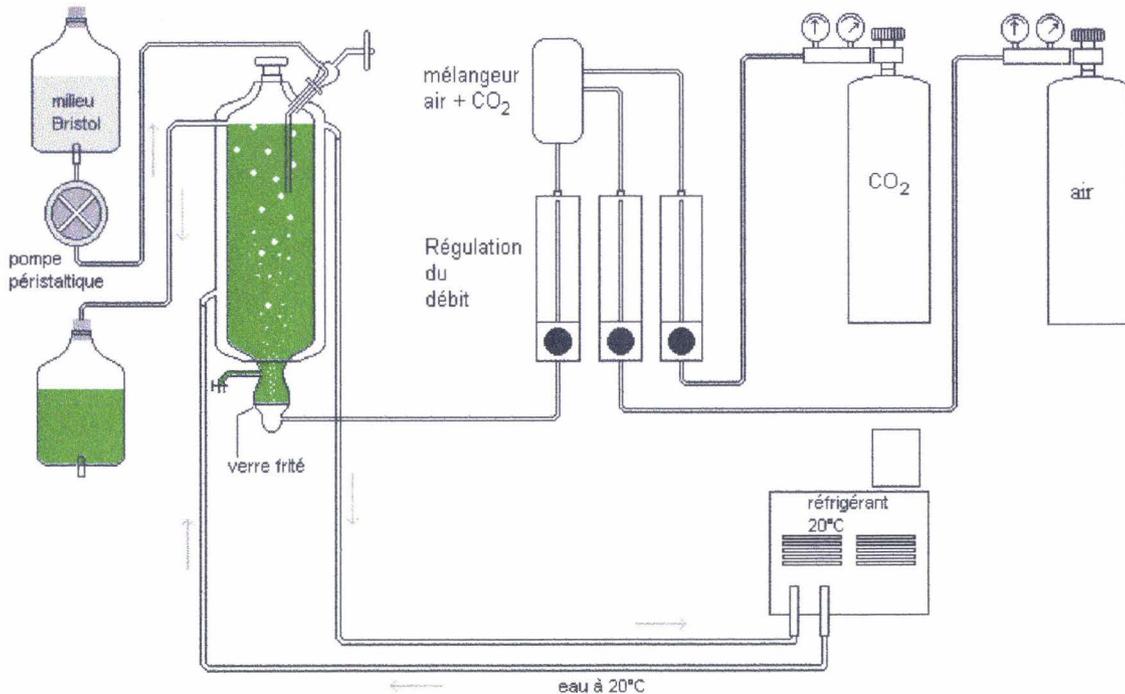


Figure. 16 : Schéma du dispositif de culture continue en bioréacteur

IV - Essai d'optimisation du milieu de culture

Dans un souci d'améliorer les conditions de culture, nous avons tenté de modifier la composition de la culture en l'adaptant à la souche régionale et ceci en variant la concentration de certains éléments chimiques (macroéléments) utilisés dans le milieu Bristol.

Nous avons étudié plusieurs concentrations et à des temps d'incubation différents. En effet, nous avons effectué des mesures des niveaux de fluorescence chlorophyllienne après 10, 30 et 60 minutes (court terme) et après 5, 6 et 7 jours (long terme) de culture en présence de concentrations en un élément donné allant de 1,5 à 4 fois la concentration prévue dans le MMB. Ces études ont été menées sur deux types de suspension cellulaire, une culture verte en phase de croissance exponentielle et une culture rouge dont les cellules sont aux premiers stades d'enkystement.

V - Evaluation de la matière fraîche et sèche

Afin d'évaluer l'impact des traitements sur la suspension algale nous avons mesuré le poids frais (et/ou le poids sec)/unité de volume des cultures. Un filtre en papier cellulosique (9 cm de diamètre, Durieux) est humidifié par le passage de 20 ml d'eau distillée sur un filtre Buchner raccordé à une trompe à vide, puis pesé " P_{fh} ". Ce même filtre est séché à l'étuve à 100°C pendant 24 h puis refroidi dans un dessiccateur ensuite pesé " P_{fs} ". Sur ce même filtre 20 ml de la suspension cellulaire ont été filtrés comme précédemment et le filtre comportant les cellules est pesé " P_{fah} ". Cet ensemble est ensuite placé à l'étuve (100 °C, 24h) puis pesé " P_{fas} ".

Le poids frais des algues est donc $PF = P_{fah} - P_{fh}$

$$\text{le poids sec } PS = P_{fas} - P_{fs}$$

Pour éviter une ré-humidification des filtres secs ou un dessèchement des filtres humides lors du transport et des pesées, ils ont été enfermés dans des fioles pour poids sec en verre Pyrex.

VI - Etude du "rougissement" : action de la lumière sur la caroténogénèse

La lumière est un des facteurs régulateurs de la biosynthèse des céto-caroténoïdes. Elle peut agir par son intensité et sa qualité.

A - Illuminateur spectral

Dans un premier temps nous avons fait agir des lumières colorées à l'aide d'un illuminateur spectral constitué de lampes Xénon 400W, l'interposition de filtres interférentiels (Intervex DA 50x50 mm) dans le faisceau lumineux permettant d'obtenir une bande passante de quelques nm (voir les spectres de transmission des filtres, Fig. 17). Pour éviter le phénomène de surchauffe, des filtres anticaloriques (Specivex 50x50 mm) ont été placés entre la source lumineuse et le filtre interférentiel. Une fiole Erlenmeyer contenant la suspension cellulaire, disposée dans un caisson totalement obscur n'est éclairée que par le faisceau traversant le filtre interférentiel. En plus de la lumière blanche différentes longueur d'ondes ont été utilisées par interposition des filtres interférentiels : 489, 525, 545, 572, 631 et 661 nm. L'éclairement ($600 \mu\text{moles photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a duré 48 h.

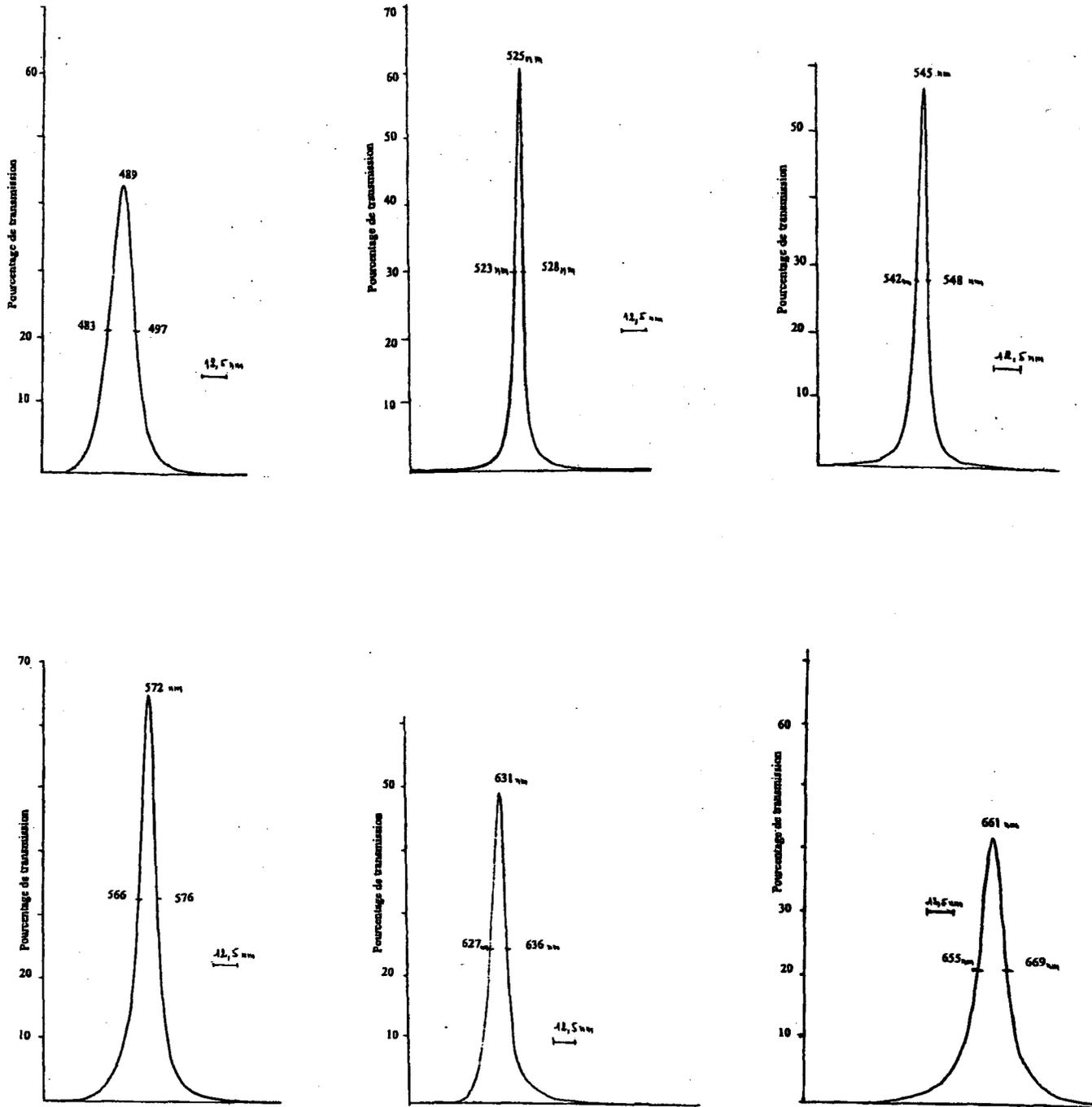


Figure 17 : Spectres de transmission des filtres

B - Stress lumineux :

La suspension de cellules vertes flagellées (600 ml) est prélevée du bioréacteur et mise dans un maturateur qui est un réacteur rectangulaire en plexiglass (38/18 cm) dont le réservoir a une largeur de 14 mm afin d'exposer les algues à un maximum du flux lumineux qui stimule la biosynthèse de l'astaxanthine. Ce maturateur est éclairé par 2 puissantes lampes halogène (MTIL-F 250W, Mazda) situées de part et d'autre et qui fournissent une énergie de 1100 $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Une circulation d'eau dans des chemises situées de part et d'autre permet de stabiliser la température des algues à $20^{\circ}\text{C}\pm 1$. Un bullage d'air de 10 V/V/H enrichi à 1 % en CO_2 permet d'homogénéiser la suspension cellulaire. (Salazar-Gonzalez, 1995)

VII - Chromatographie Liquide Haute Performance

A - Le dispositif expérimental

Ce dispositif est composé d'abord d'un système de gradient "basse pression" (Spectra Physics, SP 8700, Darmstadt, Allemagne) assurant l'aspiration, le mélange et la circulation sous pression des solvants et assorti d'un injecteur (Rhéodyne 7125) muni d'une boucle de 50 μl . La séparation des pigments est assurée par une colonne phase inverse Zorbax C18 (5 μm , 250 mm x 4,6 mm, NEN). Un détecteur à barrettes de diode "UV-Vis, 190-800 nm, Waters 991-25, Milledford USA) permet l'enregistrement des spectres à intervalles de temps réguliers, et un micro-ordinateur PC 486 (NEC) permet le stockage et le traitement des données (Fig. 18). Les éluions sont réalisées selon le programme suivant établi et modifié à partir de la méthode de Lemoine *et al.*, (1985).

<u>temps (min)</u>	<u>dichlorométhane (%)</u>	<u>méthanol (%)</u>	<u>acétonitrile (%)</u>
0	0	30	70
8	0	30	70
11	40	18	42
25	40	18	42
27	0	30	70
45	0	30	70

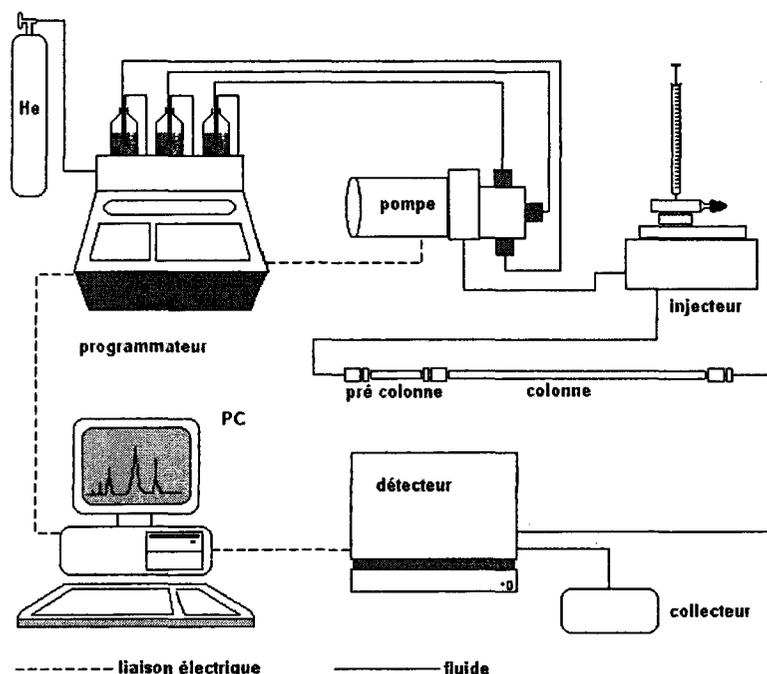


Figure 18 : dispositif de chromatographie liquide à haute pression (CLHP)

B - Préparation de l'échantillon

Un volume précis de la suspension algale a été prélevé avant et/ou après un traitement puis centrifugé, le culot est récupéré dans un mélange de solvants organiques (méthanol/dichlorométhane, 3:1, v/v). Pour éclater les cellules et récupérer les pigments nous avons utilisé au début de ce travail un vibrogène (type V1-4 Bühler; Tübingen) (Fig.19) avec des microbilles (0,5 à 0,75 mm de diamètre) qui brisent les parois cellulaires grâce aux chocs mécaniques. Un temps de repos de 15 secondes a été aménagé entre les cycles de 15 secondes pour éviter un échauffement du broyat qui aurait dégradé les pigments.

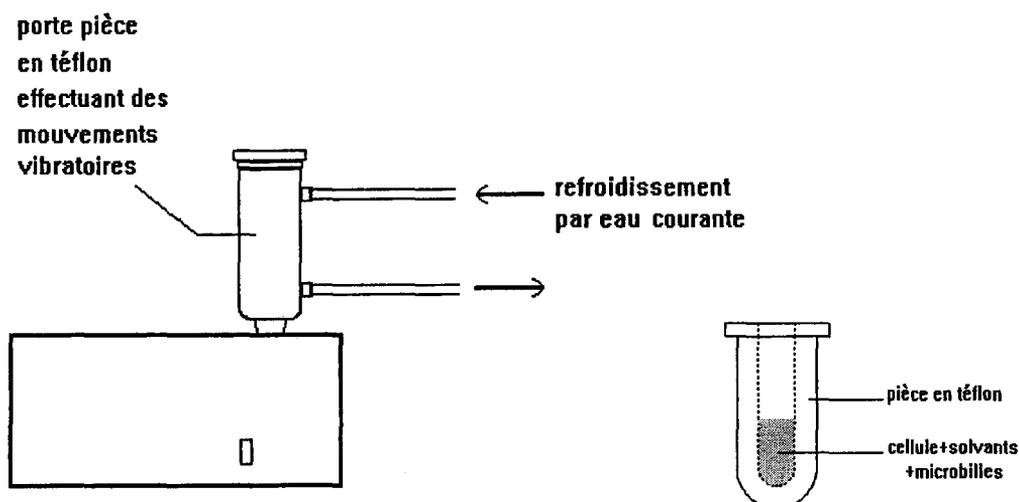


Figure 19 : Schéma du vibrogène

Par la suite nous avons utilisé la presse de FRENCH (SLM-Aminco) pour casser les cellules. La cellule utilisée est de 20 ml avec une pression de 1100 Psi.

Une fois les cellules éclatées, les pigments hydrophobes sont solubilisés dans les solvants organiques. Après l'élimination éventuelle des microbilles (pour la première méthode), on procède à une centrifugation pendant 10 minutes à 2500xg. Le surnageant qui contient les pigments est conservé, tandis que le culot, de couleur blanchâtre contenant les débris cellulaires est éliminé.

Les solvants sont évaporés à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif puis les pigments sont repris dans le dichlorométhane et filtrés sur une membrane PTFE de 0,45 μm de porosité (13 mm Interchim USA). Le filtrat est récupéré dans un flacon de verre et séché sous Azote U. L'extrait sec des pigments est repris dans un volume précis de méthanol et analysé par chromatographie (CLHP ou CCM)

C - Traitement des résultats

Dans un premier temps les résultats sont obtenus sous forme d'un chromatogramme en trois dimensions. De celui-ci on peut extraire à la fois des profils chromatographiques aux longueurs d'onde voulues et le spectre d'absorption de chaque pigment élué. Les longueurs d'onde sont choisies pour permettre de quantifier chaque pigment à proximité de son maximum d'absorption pour avoir une meilleure sensibilité :

Longueur d'onde	pigment
410 nm	phéophytine a
430 nm	chlorophylle a
437 nm	néoxanthine, violaxanthine et lutéine
450 nm	β -carotène, antéaxanthine, zéaxanthine
464 nm	chlorophylle b
480 nm	Astaxanthine libre et ses esters, échinénone

VIII - Séparation des pigments sur microcolonne de silice Sep Pak

Cette méthode a été utilisée afin de séparer entre eux les pigments dont les pics d'élution s'interfèrent et se masquent lors des éluions en CLHP.

Avant le dépôt des extraits pigmentaires sur la microcolonne de silice (Phase normale, 100 mg-1ml Alltech USA) cette dernière a été stabilisée par le mélange de solvants d'élution avec un volume de 4ml. L'extrait pigmentaire est repris dans 200 μ l de dichlorométhane puis déposé sur la colonne et les pigments sont élués par 6 ml de phase mobile constituée de dichlorométhane 60- acétate d'éthyle 5- hexane 61,5 (v/v/v). Cette élution est facilitée par l'aspiration grâce à une seringue reliée à la sortie de la colonne. L'astaxanthine et ses esters peuvent ainsi être élués et les chlorophylles restent retenues par la microcolonne. Elles peuvent être éluées avec du méthanol. Les fractions pigmentaires récupérées sont analysées par CLHP après séchage sous azote.

IX - Chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est une méthode utilisée essentiellement pour déterminer la nature des pigments présents dans l'extrait brut et pouvoir disposer de quantités plus importantes des pigments. La migration est relativement rapide (1 heure pour une plaque de 20 cm de hauteur). Les solutés apolaires comme les carotènes, migreront plus rapidement, par contre les solutés polaires comme les xanthophylles resteront à la base de la plaque. Chaque pigment sera caractérisé, dans un système donné, par sa référence front R_f . $R_f = h_p / h_{FS}$ avec h_p et h_{FS} représentant respectivement les distances parcourues par le pigment et par le front du solvant. (Fig. 20)

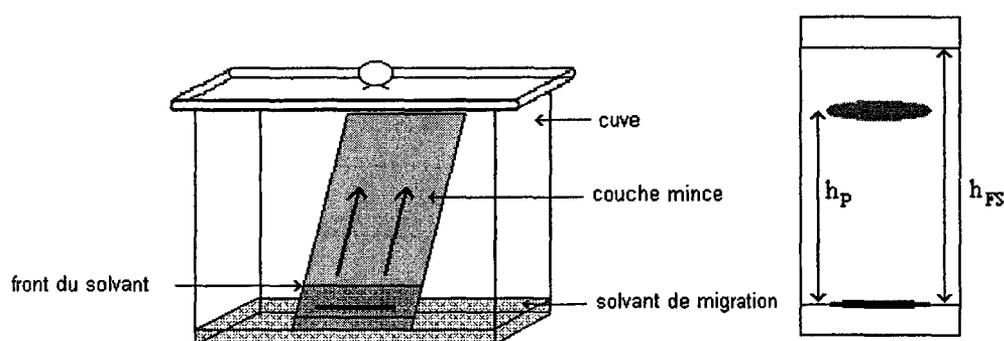


Figure 20 : Dispositif de chromatographie sur couche mince (CCM)

A - Préparation de l'échantillon

L'extraction des pigments a été réalisée dans le mélange méthanol-dichlorométhane en appliquant le protocole suivi pour la préparation des échantillons à analyser en CLHP.

Les plaques de gel de silice sur feuille d'aluminium ou sur verre pour chromatographie du commerce (Merck, Darmstadt, Allemagne) ont un pH acide, or certaines structures chez les pigments nécessitent des soins particuliers, par exemple les fonctions 5,6-époxy sont très sensibles aux pH acides et sont transformées en isomères Furanoïdes 5,8-époxy (Fig. 21).

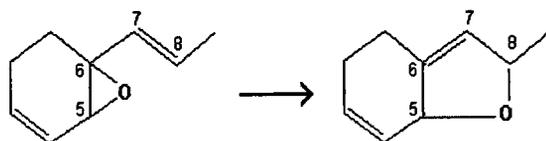


Figure 21 : représentation des transformations causées par l'acidité.

Nous avons neutralisé le pH des plaques en faisant préalablement migrer un tampon phosphate à pH neutre. La plaque est ensuite séchée à l'étuve et refroidie avant de déposer l'extrait pigmentaire.

B- Les mélanges de solvants éluants : phases mobiles

Méthode 1 : dans un premier temps la phase mobile utilisée est un mélange de solvants organiques : dichlorométhane-hexane-acétate d'éthyle avec des volumes respectifs 60:30:5 v/v/v (Maillard, 1993).

Méthode 2 : une deuxième phase mobile a été utilisée : acétonitrile-méthanol-dichlorométhane-hexane : 55:25:10:10 v/v/v/v (Maillard, 1993). Cette combinaison permet de mieux séparer les chlorophylles de l'astaxanthine libre et de l'échinénone.

Méthode 3 : Pour pouvoir séparer les formes estérifiées d'astaxanthine nous avons également utilisé un mélange d'éther éthylique et d'hexane dans 2 proportions différentes et qui permettent de récupérer successivement les monoesters et diesters d'astaxanthine. Le premier mélange d'éther éthylique et d'hexane (40:60, v/v) fait migrer uniquement le β -carotène et les diesters d'astaxanthine. Le reste de l'extrait pigmentaire qui n'a pas migré est repris, après grattage de la silice, dans du méthanol puis déposé sur une autre couche mince. Ce second dépôt est entraîné par un second mélange d'éther éthylique et d'hexane (25:75, v/v) qui fait migrer les monoesters d'astaxanthine. Le reste de l'extrait qui n'a pas migré est encore repris de la même façon puis déposé sur une troisième plaque. Pour cette dernière migration nous avons utilisé comme solvant d'éluion un mélange de méthanol-ether éthylique, (3:10, v/v) faisant ressortir cette fois-ci l'astaxanthine libre.

X - Isolement des complexes Pigments-protéines dans les globules lipidiques extraplastidiaux

A - Préparation des échantillons

Nous avons fait subir à une suspension algale (600 ml) constituée de cellules vertes ovales et biflagellées, un stress lumineux dans le "maturateur" ($1100 \mu\text{moles photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Des prélèvements ont été réalisés à intervalles réguliers pour analyser la composition pigmentaire par CLHP et suivre l'évolution du "rougissement" (caroténogénèse) par la mesure de l'absorption à 480 nm. Le prélèvement est centrifugé (5 minutes à 2500 x g) pour séparer les cellules du milieu de culture. Le culot est repris dans une solution de saccharose 2M. Les cellules sont ensuite éclatées à l'aide de la presse de FRENCH (1100 Psi). Cette technique a été choisie en raison de la très grande résistance des cellules rondes rouges aux techniques habituelles telles que le vibrogène, les ultrasons ou le broyage au mortier dans l'azote liquide. Cette résistance est due à l'épaississement de la paroi cellulaire qui accompagne le stress.

Le broyat est centrifugé pendant 2 heures à 20 000 x g. Des gouttelettes lipidiques colorées en rouge se retrouvent à la surface des tubes sous forme d'une fine pellicule. A la fin de chaque extraction et centrifugation nous avons vérifié l'état de ces globules par une simple observation au microscope.

B - Isolement des complexes par électrophorèse

Une faible quantité (50 μl) de la fraction des globules lipidiques est reprise dans 950 μl de méthanol, homogénéisée puis dosée à 480 nm. La DO obtenue permet par le biais du coefficient d'extinction de l'astaxanthine dans le méthanol ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2100$; Britton, 1996) de quantifier ce caroténoïde dans la fraction de globules récupérée. On rajoute ensuite du tampon de Laemmli (voir tableaux VI et VII annexe 3) à la fraction de globules afin d'obtenir un rapport SDS/astaxanthine = 20. L'homogénéisation du mélange est assurée par des ultrasons (10 sec.). L'échantillon est ensuite centrifugé 10 min à 5000 x g. Le surnageant est déposé sur un gel non

dénaturant de polyacrylamide (12,5%) sur un système MiniPorteur gel (Biorad). La migration dure 1 heure à 5°C sous un courant de 60 mA pour deux gels simultanément.

Pour chaque expérience deux gels sont utilisés, le premier sert à la récolte, par simple découpage, des bandes contenant les pigments rouges. Les pigments associés sont extraits dans le méthanol puis identifiés par leur spectre d'absorption au spectrophotomètre ou en CLHP. Le second gel était utilisé pour la révélation des protéines associées aux bandes colorées.

XI - Etudes des lipides contenus dans les gouttelettes extraplastidiales.

Les lipides forment un groupe très hétérogène caractérisés par leur solubilités dans les solvants organiques et insolubilités dans l'eau. Le constituant de base des lipides est l'acide gras (AG).

Les AG sont des acides organiques monocarboxyliques à chaîne hydrocarbonée. Ce sont des constituants de toutes les cellules où ils participent à la composition des membranes et servent en tant que matériel de réserve et précurseurs métaboliques. Un AG est caractérisé par son nombre d'atomes de carbone ainsi que son nombre de doubles liaisons et leur position.

A - Extraction des lipides totaux

Certaines précautions opératoires sont à respecter lors d'extraction des lipides notamment travailler sous atmosphère enrichie en azote et à température modérée pour éviter l'oxydation des doubles liaisons des AG.

Les lipides sont extraits selon la méthode de Dyer & Bligh, (1959) en utilisant un mélange constitué d'un solvant organique non polaire (le chloroforme), d'un alcool (méthanol) et d'eau. Le chloroforme est un solvant organique très efficace alors que le méthanol permet de détruire les liaisons lipides-protéines et inactiver les dégradations enzymatiques lors d'extraction. L'eau permet l'obtention d'un mélange homogène permettant la solubilisation des fractions non lipidiques hydrosolubles.

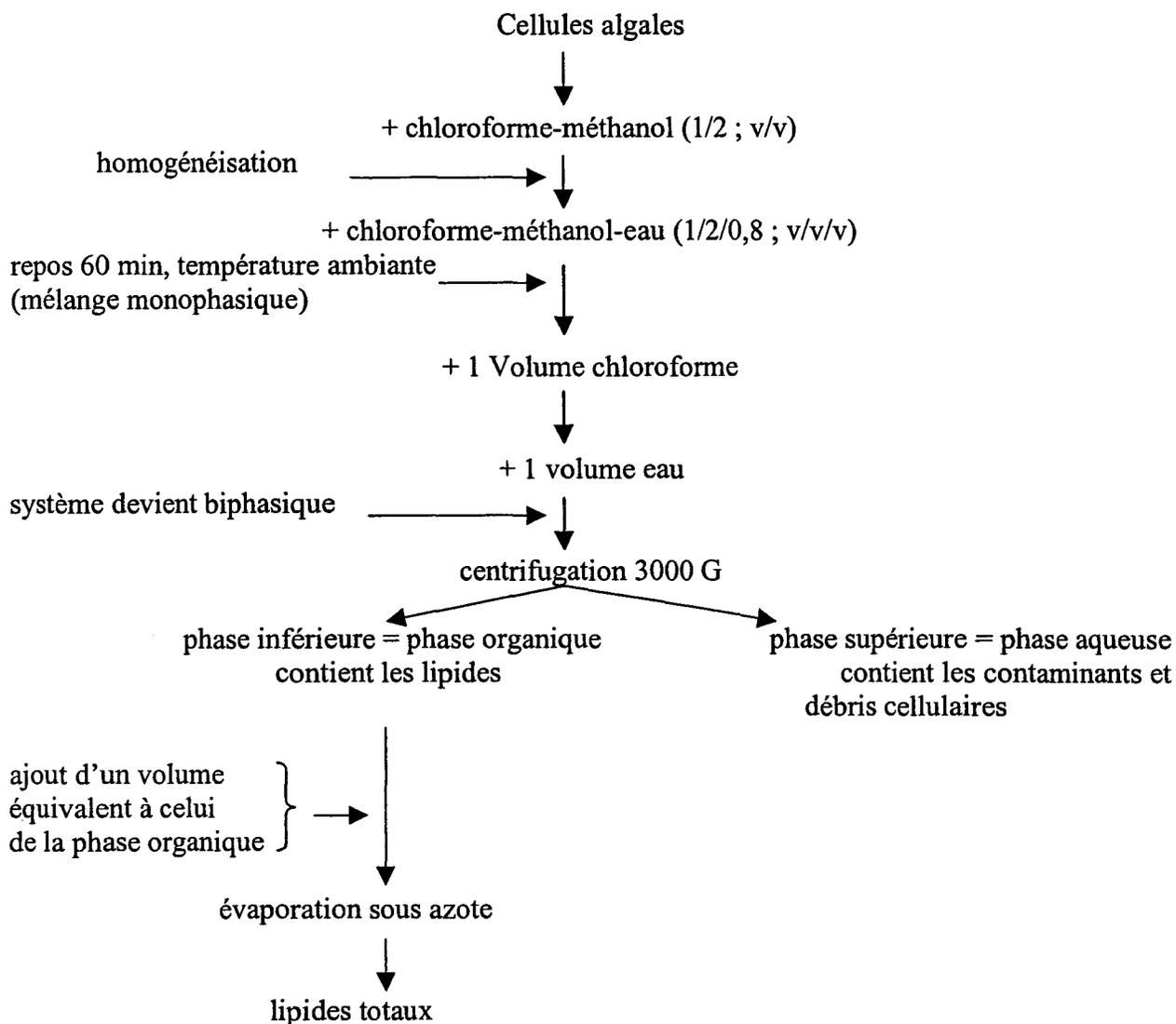


Figure 22 : Protocole d'extraction des lipides totaux

La variation des proportions de ces trois composants au cours des étapes de l'extraction conduit à un système biphasique qui permet l'élimination des parties non lipidiques. Afin de respecter les proportions d'eau spécifiées dans le protocole nous avons lyophilisé les échantillons après le broyage des cellules ou la récupérations des globules, ce qui permet d'éliminer l'eau du milieu et des cellules.

Séparation des lipides neutres et polaires.

L'extrait des lipides totaux est élué sur une colonne de gel de silice avec 10 ml de chloroforme. Cette première élution permet de récupérer les lipides neutres. L'élution avec 10 ml de méthanol permet de recueillir les lipides polaires.

B - Etude de la compositions des acides gras

La méthylation permet d'obtenir des esters d'AG plus volatiles permettant leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. Le dispositif utilisé (CPG Shimadzu) est muni d'une colonne capillaire à phase stationnaire polaire (BPX70, 30 m x 0,2 mm) et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium. Le gradient de température utilisé est : 90°C pendant 2 min, la température monte ensuite jusqu'à 140°C à raison de 10°C/min puis s'élève à 210°C à raison de 2°C/min. Cette température (210°C) est maintenue durant 5min.

La méthylation comporte deux étapes principales :

- hydrolyse des liaisons esters ou amides dans lesquelles sont impliqués les AG
- transformation de ces AG en esters méthyliques

Méthylation des lipides totaux au méthanol-H₂SO₄

Le résidu sec des lipides totaux est repris dans un mélange méthanol-H₂SO₄ (97,5:2,5 ; v/v) au quel on ajoute 20 µg de C_{17:0}. L'ensemble est incubé à 70°C dans un bain marie pendant 45 min avant d'être refroidi dans la glace. Ensuite on ajoute 3 ml d'hexane et 1 ml d'eau distillée. Après agitation on laisse décanter avant de prélever la phase organique supérieure qui contient les AG méthylés, laquelle est évaporée sous azote et le résidu sec est repris dans un volume précis d'hexane pour être analysé en CPG.. La phase polaire aqueuse permet d'éliminer les constituants lipidiques polaires (glycérol...).

L'addition d'une quantité connue d'un témoin interne (C_{17:0}) permet d'apprécier la masse de chacun des AG détectés par le rapport des surfaces de leur pic d'élution avec celui du C_{17:0}. Ces AG sont identifiés grâce à l'injection de leur standards de commerce (Sigma).

XII - Mesure de la production d'oxygène

Les mesures du dégagement d'oxygène ont été réalisées à l'aide d'une électrode à oxygène (DW2 Hansatech). Sa calibration a été faite en injectant de l'azote ou en rajoutant dans le milieu une solution d'hydrosulfite de sodium pour déterminer le zéro, alors que le 100 % ($0,276 \mu\text{mole.ml}^{-1}$ à 20°C) a été déterminé avec de l'eau saturée en air. Cette calibration a été vérifiée avant chaque expérience. L'éclairement a été réalisé soit par une lampe Schott 150 W à l'aide du guide optique du fluorimètre PAM ou par une source lumineuse constituée de 7 LED (LH7 Hansatech).

L'enregistrement de l'évolution de la production d'oxygène a été réalisée à l'aide d'un enregistreur potentiométrique (Linear).

XIII - Mesures Spectrophotométriques

A - Spectres d'absorption *in vivo* :

Une comparaison rapide des suspensions algales à différents stades de rougissement ou de verdissement a pu être faite en réalisant des spectres d'absorption *in vivo*. Ces spectres ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceaux (Spectrometer UV/Visible UV4, ATI UNICAM, GB). La référence utilisée est le milieu de culture. Pour les mesures concernant les cellules rondes immobiles et les kystes, il a été indispensable de rajouter du glycérol dans la suspension pour éviter la sédimentation des algues au fond des cuves.

B - Spectres d'absorption des pigments

Dans certaines expériences (CCM ou isolement des complexes pigments-protéines) nous avons opté pour l'identification des pigments en solution par spectrophotométrie d'absorption pour sa rapidité par rapport à la CLHP.

XIV - Mesure des niveaux de la fluorescence chlorophyllienne

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été réalisés dans l'azote liquide à 77 K (-196 °C) à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin Elmer LS50B, Buckinghamshire, G.B.). Dans cet appareil la source de la lumière excitatrice est une lampe à xénon et le spectrofluorimètre est équipé d'un photomultiplicateur "R928" avec une zone de sensibilité 200-900 nm. La basse température (77K) permet, outre une meilleure résolution des pics, d'avoir un rendement de fluorescence accru par suppression de la photochimie et de permettre d'estimer la répartition de l'énergie d'excitation entre les photosystèmes. La suspension cellulaire a été introduite dans un tube en verre Pyrex de 1,5 mm de diamètre intérieur et de 60 mm de longueur. L'ensemble est congelé rapidement dans l'azote liquide avant son introduction dans l'appareil.

A - Spectre d'émission de la fluorescence à 77 K

Dans un premier temps la lumière excitatrice a été fixée à 440 nm (largeur de la fente est de 10 nm) après passage à travers un monochromateur et l'émission de fluorescence est mesurée entre 600 et 800 nm. Un filtre arrêtant toute la lumière excitatrice au delà de 530 nm a été placé devant le l'échantillon de manière à être sûr que la lumière d'excitation n'interfère pas avec la fluorescence émise.

Dans le souci d'éviter le phénomène de réabsorption de l'émission dans le rouge par des pigments émettant leur fluorescence à des longueurs d'ondes plus élevées, nous avons réalisé des mesures d'excitation de fluorescence sur une série de dilutions en cascade d'une même suspension algale pour choisir une concentration cellulaire qui permet d'éviter ces réabsorptions. Nous avons ainsi choisi d'utiliser des concentrations de 10^4 cellules/ml.

B - Spectre d'excitation de fluorescence à 77 K

Selon les complexes auxquels ils appartiennent, les divers pigments transfèrent l'énergie d'excitation vers les chlorophylles responsables d'une bande d'émission de fluorescence donnée. Ces transferts peuvent être mis en évidence à l'aide d'enregistrement de spectres d'excitation d'une bande d'émission de fluorescence à 77 K. Lorsqu'un pigment transfère son énergie à un

complexe chlorophyllien, le spectre d'excitation de fluorescence de ce dernier doit montrer des bandes correspondant à l'absorption par ce pigment (Schoefs, 1994; Jupin & Lamant, 1997). Les spectres d'excitation de la fluorescence émise à 77 K à 681, 697 et 715 nm ont été corrigés pour la réponse du monochromateur.

XV - Mesure de variation du rendement de fluorescence en lumière modulée

La fluorescence chlorophyllienne, qui est une perte inévitable d'énergie, peut être considérée comme une sonde intrinsèque de l'appareil photosynthétique des Végétaux. En effet, les niveaux de rendement de la fluorescence sont affectés directement ou indirectement par les paramètres qui influent sur la photosynthèse tels que les stress dûs aux facteurs environnementaux ou la disponibilité de substances nutritives. Cette mesure non destructive est de plus en plus utilisée dans des objectifs divers tels que les mesures de l'action des herbicides et l'impact de la pollution sur les végétaux. A température ambiante la fluorescence émise traduit l'état du PSII.

La fluorescence a été mesurée avec le fluorimètre "PAM 101-103" (Pulse Amplitude Modulated Fluorimeter, Walz GmbH, Effeltrich, Germany). Ce fluorimètre permet de mesurer le rendement de la fluorescence à l'aide d'une lumière détectrice modulée à 1,6 KHz inactinique ($0,025 \mu\text{moles photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) émise par une diode électroluminescente (LED type USBR, Stanley). La transmission de la lumière excitatrice et de la fluorescence se fait grâce à un guide optique à cinq branches convergentes (Fig. 23). Un filtre (DT Cyan, Balzers) élimine l'émission de la lumière au delà de 600 nm. Le détecteur est fait d'une PIN-photodiode (type S1723, Hamamatsu), protégée de la lumière modulée excitatrice par un filtre (RG9, Schott). La méthode de travail adoptée est celle des éclairs saturants (Schreiber *et al.*, 1986). Nous avons choisi d'utiliser des éclairs saturants ($800 \mu\text{moles photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de 1,5 secondes fournis par une lampe Schott et espacés par 40, 60 ou 90 secondes (Fig. 23 et 24).

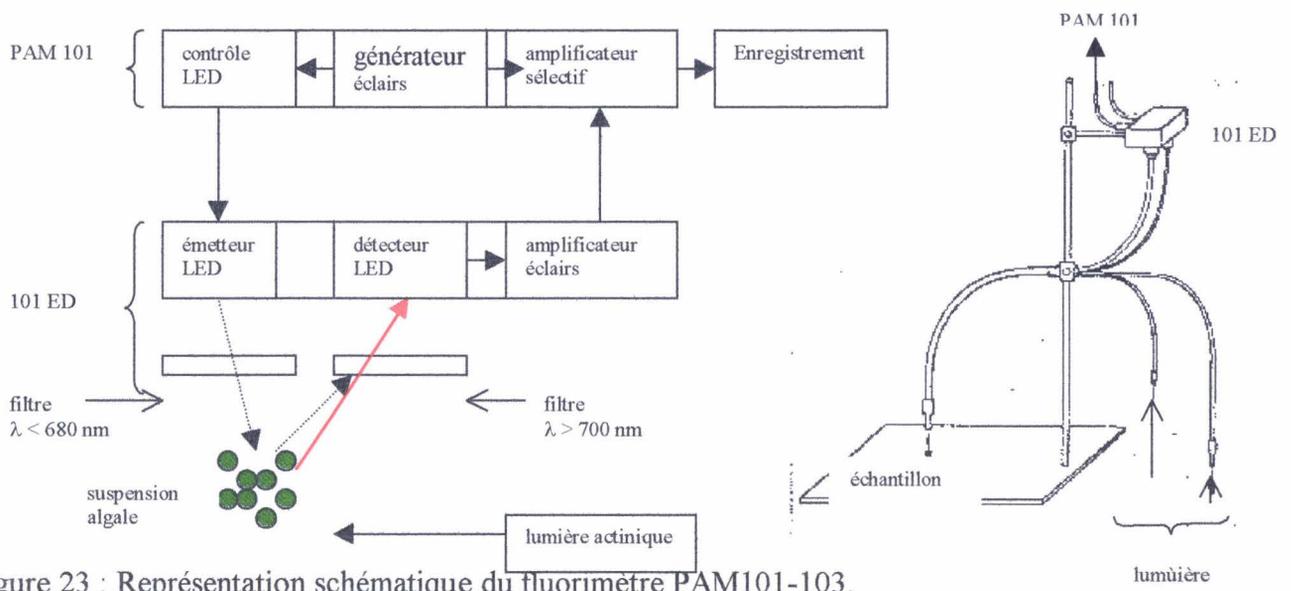


Figure 23 : Représentation schématique du fluorimètre PAM101-103.

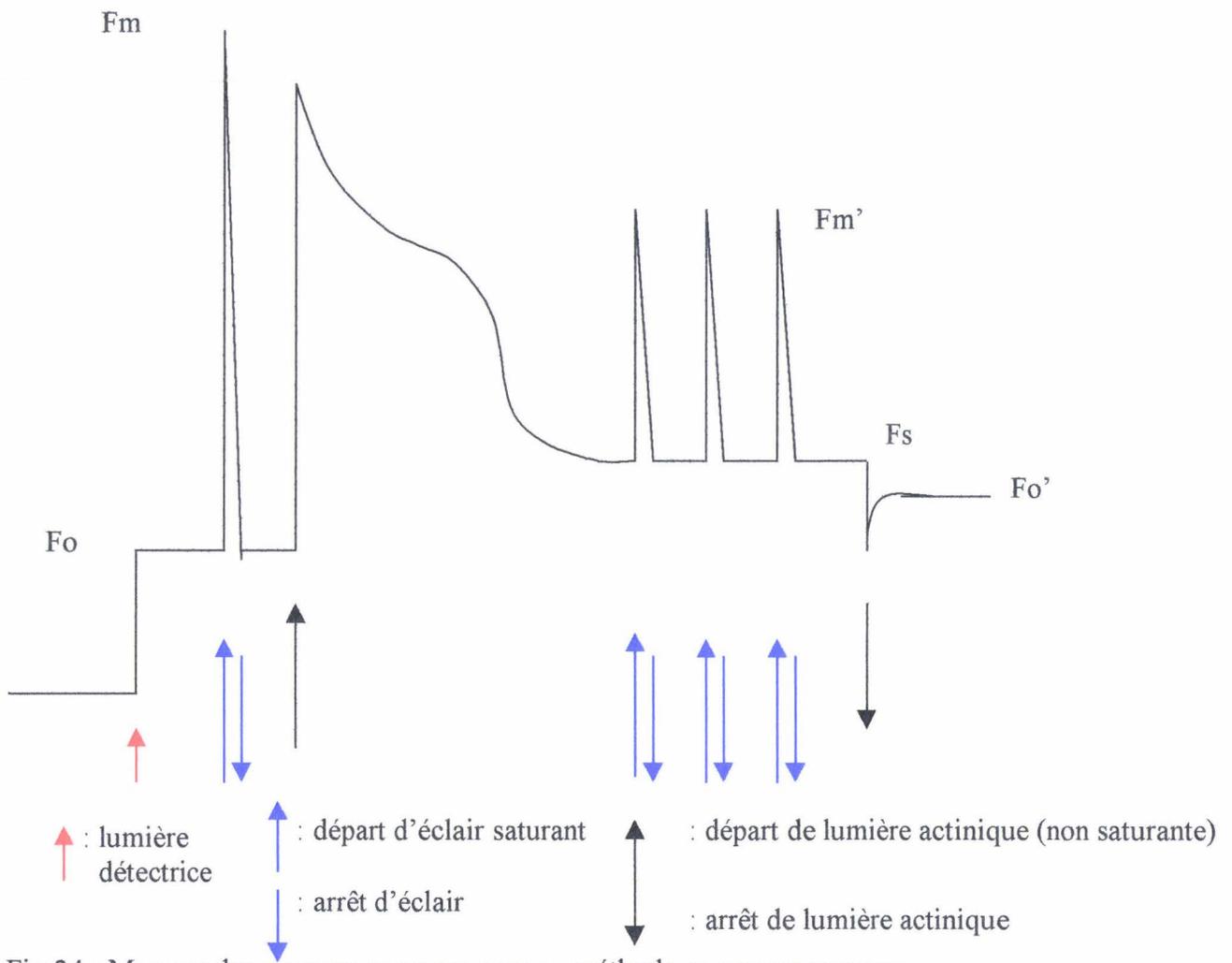


Fig 24 : Mesures des niveaux de fluorescence : méthode de l'éclair saturant.

On peut mesurer plusieurs paramètres :

- Fluorescence fixe : F_o ou niveau minimal de fluorescence. Ce niveau est mesuré lorsque moment où tous les centres photochimiques sont ouverts. Pour réaliser cette condition les algues sont préalablement maintenues à l'obscurité pendant 15 min.
- Fluorescence maximale : F_m ou niveau maximal de fluorescence. Cette valeur est obtenue à l'issue d'une période d'obscurité par l'application d'une lumière saturante qui permet de fermer tous les centres photochimiques (toutes les molécules de la quinone "QA" sont donc réduites)
- Fluorescence variable : F_v est obtenue par la différence entre ces deux précédents paramètres. En effet, $F_v = F_m - F_o$.
- Fluorescence stationnaire : F_s niveau de fluorescence stable atteint en présence d'une lumière actinique après plusieurs minutes d'éclairement.
- Fluorescence maximale instantanée : F_m' mesuré par fourniture d'un éclair saturant en présence de lumière alors que l'appareil photosynthétique a évolué selon le traitement lumineux que le végétal a subi.
- Fluorescence minimale instantanée : F_o' niveau minimal de fluorescence en cours d'expérience. Ce niveau est mesuré comme pour le F_o en présence de la seule lumière détectrice inactinique.

A l'inverse de F_o et F_m mesurés avant tout traitement lumineux F_o' et F_m' sont mesurés sans période de repos à l'obscurité.

- Fluorescence variable instantanée : F_v' est donc la différence entre F_m' et F_o'

$$(F_v' = F_m' - F_o')$$

Ces différents paramètres servent à l'élaboration de quelques formules telle que celle permettant de calculer la valeur de l'extinction non photochimique de la fluorescence (quenching non photochimique) : $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ ou celle exprimant l'efficacité photochimique du PSII : F_v/F_m (Genty et al., 1989).

L'acquisition des données a été réalisée par un ordinateur PC 486 muni d'une carte de conversion analogique-digital (Advantech PCL 818) et d'un logiciel d'acquisition spécifiques (Parésys).

XVI - Suivi de la croissance cellulaire

A- Comptage des cellules au microscope

Cette méthode classique permet une estimation assez précise du nombre de cellules par unité de volume. Le comptage s'est fait à l'aide d'un hématimètre : cellule de Thoma. Le comptage des cellules flagellées (mobiles) à été réalisé après fixation de celles-ci en rajoutant une goutte de Lugol dans 4 ml de la suspension cellulaire.

(Préparation de la solution de Lugol : 1g d'iode et 2 g d'iodure de potassium pour 100 ml d'eau distillée).

B - Méthode spectrophotométrique

Lors des expériences de rougissement (caroténogénèse), nous avons réalisé à l'aide du spectrophotomètre (UV4 ATI UNICAM) la mesure de la densité optique (DO) à trois longueurs d'onde 440, 480 et 760 nm pour chaque prélèvement de la suspension cellulaire. Ces mesures ont été appliquées aussi au suivi des différentes phases de croissance cellulaire.

Le spectre d'absorption d'une suspension cellulaire d'*H. phuvialis in vivo* montre une absence d'absorption de la lumière par les pigments au delà de 700 nm. La DO à 760 nm permet donc de mesurer la turbidité (Maillard, 1993), cette DO variant de façon linéaire et proportionnelle à la quantité des cellules (Fig. 25).

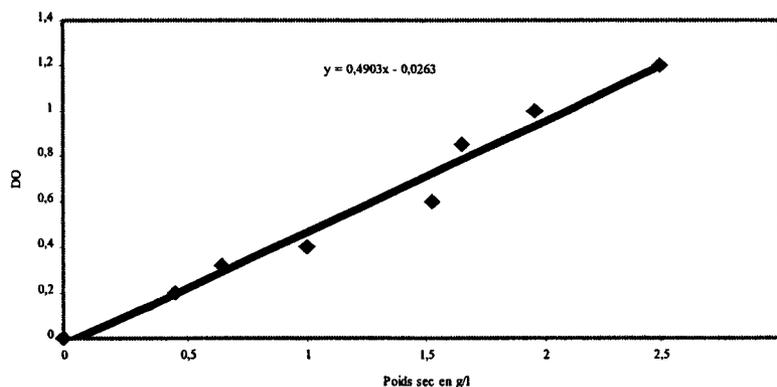


Figure 25 : correspondance DO à 760 nm et poids sec de la suspension cellulaire.

L'axénie est indispensable pour pouvoir réaliser ce suivi de la croissance par densité optique. En effet, tout corps étranger (bactéries) engendre une erreur due à son absorption de la lumière. L'équation de la droite calculée d'après des points de mesure est $y = 0,4903 x - 0,0263$. Nous avons assimilé cette équation à celle d'une droite théorique $y = 0,5 x$. Le suivi de la DO à 440 et 480 nm a permis une évaluation rapide respectivement de la quantité des chlorophylles et d'astaxanthine.

XVII - Influence des inhibiteurs de la synthèse protéique ou du transfert des électrons sur la biosynthèse de l'astaxanthine

La biosynthèse de l'astaxanthine est très étudiée actuellement dans nombreux laboratoires avec différentes méthodes d'approche (biochimique, génétique ...).

Nous avons choisi de faire agir certains inhibiteurs de la synthèse protéique et d'essayer par ce biais de préciser la voie de synthèse de l'astaxanthine chez *Haematococcus pluvialis* et déterminer les intermédiaires de cette synthèse. Sous des conditions de stress lumineux qui provoquent l'accumulation d'astaxanthine, nous avons ajouté à la suspension de cellules vertes mobiles dans le maturateur une quantité précise d'un inhibiteur. Une période d'incubation (30 min) à l'obscurité en présence de l'inhibiteur a été ménagée avant le début du stress. Ce temps est estimé nécessaire à la pénétration de ces molécules à l'intérieur des cellules. Quatre inhibiteurs ont été étudiés :

- Cycloheximide : (Sigma) (3-[2-(3,5-Diméthyl-2oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl] glutarimide) ($C_{15}H_{23}NO_4$) à une concentration de 0,1 $\mu\text{g/ml}$
- Chloramphénicol : (Sigma) (Chloromycetin; D-[-]-threo-2-dichloroacétamido-1-[p-nitrophényl]-1,3-propanediol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) à 150 $\mu\text{g/ml}$

Ces deux molécules inhibent la synthèse protéique par blocage de la traduction au niveau ribosomal (Margulies, 1962 ; Lers *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1993).

- Ellipticine : (Sigma) (5,11-Diméthyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) ($C_{17}H_{14}N_2$) à une concentration 100 $\mu\text{moles/l}^{-1}$. Cette molécule inhibe l'activité de la monooxygénase en se liant au Fer ferrique de l'hème du cytochrome P450 empêchant ainsi le transfert d'électrons de la cytochrome P450 réductase (P450R) au P450 (Lemaire & Livingstone, 1995).

L'Ellipticine a été d'abord solubilisée dans le diméthylformamide avant d'être introduite dans la suspension cellulaire.

Norflurazon : (Merck) 4-Chloro-5(méthylamino)-2-[3-(trifluorométhyl)phényl]-3(2H)-pyridazinone ($C_{12}H_9ClF_3N_3O$) à 25 $\mu\text{g/ml}$. Cette molécule est connue dans le commerce sous d'autres appellations par exemple : SAN-9789 ; Zorial... Le Norflurazon inhibe spécifiquement la phytoène desaturase et provoque une accumulation de phytoène, bloquant ainsi les synthèses de caroténoïdes.

En plus du témoin initial et du prélèvement à la fin des 30 min d'incubation à l'obscurité en présence de l'inhibiteur, nous avons effectué un prélèvement toutes les 30 minutes au cours d'un stress lumineux de 6 heures. Le contenu pigmentaire a été analysé par CLHP.

Résultats

I. - Synchronisation de la culture : gradient discontinu sur Percoll

Le polymorphisme cellulaire chez l'*H. phuvialis* rendait difficile l'étude du cycle biologique de cette microalgue. Il était donc nécessaire de travailler avec des cultures composées de cellules d'un même âge notamment pour les cultures en milieu non renouvelé. Au cours du vieillissement la densité des cellules de *Haematococcus* s'accroît ce qui permet d'utiliser une centrifugation pour isoler des cellules de même taille et les utiliser comme inoculum.

En centrifugeant une suspension algale sur un gradient discontinu de Percoll nous sommes arrivés à isoler des cellules flagellées de la même taille à l'interface des bandes contenant 20 et 40 % de Percoll. Ces cellules, récupérées stérilement, ont servi à inoculer un milieu liquide en fioles Erlenmeyer et obtenir une culture constituée pour la grande majorité de cellules de la même taille destinées à l'étude du cycle de vie de cette microalgue.

Au niveau de la fraction correspondant à une proportion de 20 % de Percoll on trouve éventuellement des bactéries notamment lors des manipulations d'axénisation de la culture (souche de Calais). A partir de 60 % de Percoll on trouve des cellules rondes de taille importante pour rencontrer des cellules de 40 à 60 μm de diamètre au fond du tube. (Fig. 26)

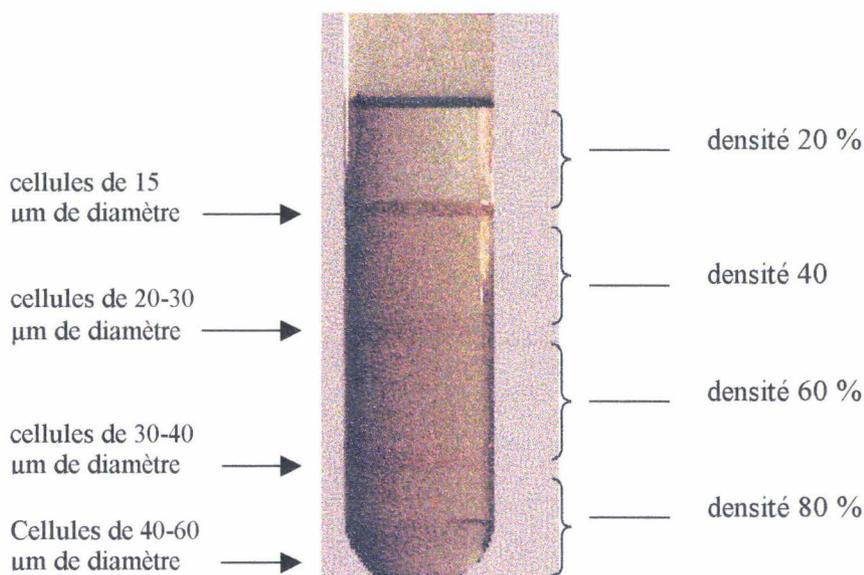


Figure 26 : Isolement des cellules selon leur taille sur gradient discontinu de Percoll

II. - Croissance cellulaire

A - Culture non renouvelée (batch) dans les fioles Erlenmeyer

Après un repiquage en milieu neuf sous éclairage continu et avec ou sans bullage d'air enrichi en CO₂, la courbe de croissance d'*H. pluvialis* présente plusieurs phases successives (Fig. 27) :

- phase de latence : Dans cette phase le nombre de cellules est sensiblement invariable. Elle dure en moyenne 1 jour. Sa durée dépend de l'état physiologique des cellules qui ont servi à l'inoculation. Cette phase peut s'expliquer par le temps nécessaire à la réactivation ou la synthèse des enzymes indispensables à la synthèse des métabolites et donc à la croissance cellulaire.
- phase exponentielle : les cellules sont dans leur meilleur état physiologique. Le taux de croissance est maximal et comme établi pour les bactéries, le nombre de cellules algales suit une évolution exponentielle. Cette phase dure, en culture en milieu non renouvelé, en moyenne 7 jours. Elle dure plus longtemps lorsque l'ensemencement est réalisé avec un inoculum peu concentré en cellules.
- phase stationnaire : pendant cette phase la multiplication cellulaire est très réduite et par conséquent le nombre de cellules reste sensiblement constant. Elle correspond à un appauvrissement du milieu en éléments nutritifs et se traduit par un vieillissement des cellules.
- phase de déclin : dans nos expériences, concernant les cultures en milieu non renouvelé (batch), nous n'avons pas continué nos observations et comptages pour déterminer cette phase. Elle se situe sûrement très tard dans la culture et conduit ultérieurement (3 mois) à la formation de kystes par épuisement du milieu

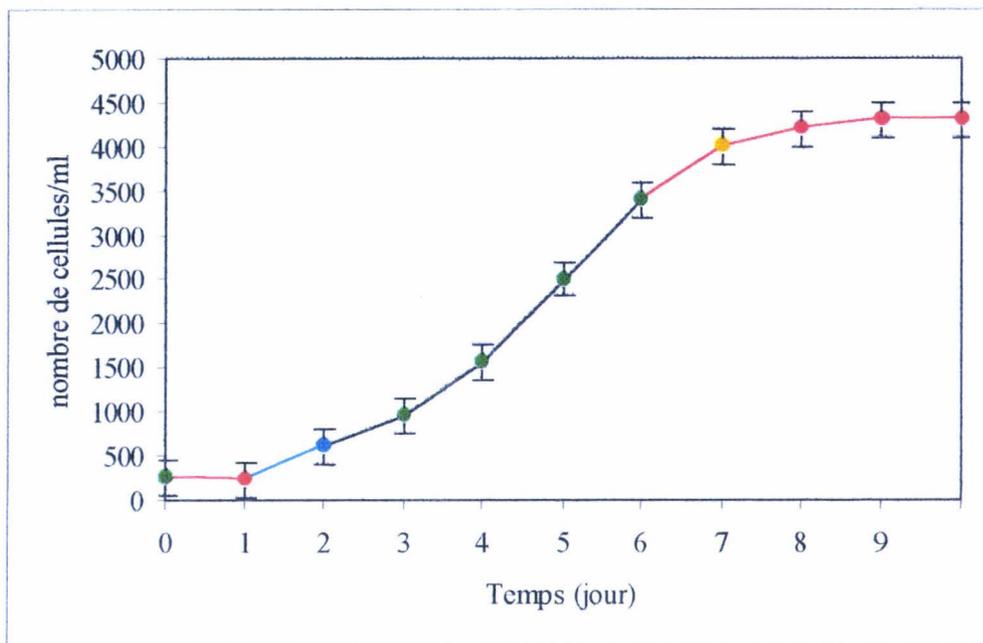


Figure 27 : Courbe de croissance d'*H. pluvialis* en fioles Erlenmeyer

B - Culture continue : bioréacteur

Nous avons toujours démarré cette culture à partir de kystes rouges obtenus par épuisement de milieu en culture en Batch pour être sûr de l'absence d'autres espèces algales de l'inoculum. Cette suspension servait à remplir le 1/3 du volume du bioréacteur auquel on rajoute du milieu de culture jusqu'à remplir la moitié du bioréacteur. Après 24 heures d'incubation on procède au remplissage progressif du bioréacteur à raison de 1,2 ml/min. Les kystes rouges de diamètre important de l'ordre de 60 μm commencent à verdir durant les 24 heures qui suivent leur ensemencement. Ce verdissement est accompagné de divisions cellulaires aboutissant à 4 ou 8 cellules sans division de la paroi des kystes (Lee & Ding, 1994) formant ainsi des "sacs" renfermant ces cellules rouges ou vertes (photographies 1,2 et 3). Lorsque ces cellules sont bien individualisées une rupture de la paroi du "sac" se produit et libère des cellules vertes souvent ovales parfois rondes mais nous pensons que la forme ronde n'est dûe qu'à une libération précoce

ou forcée dans les préparations microscopiques. Pendant les 24 heures qui suivent ces cellules deviennent biflagellées.

L'objectif de la culture continue est d'obtenir un rendement maximum et donc d'avoir une croissance active optimale ceci est la caractéristique des cellules en phase exponentielle. Nos conditions de culture (éclairage, débit du milieu de culture, température...) ont été fixées à leur optimum pour maintenir les cellules dans cette phase de croissance.

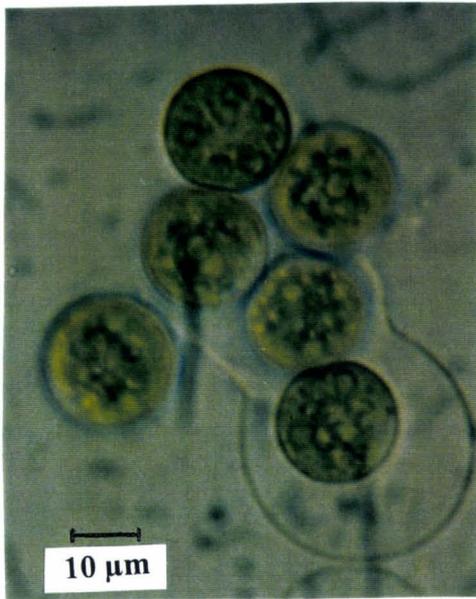
III - Cycle de vie d'*H. pluvialis*

Description du cycle de vie (Fig. 28)

Dans les conditions de culture optimales *Haematococcus* existe sous forme de cellules ovales mobiles (zoospores) (Lee & Ding 1994, Kobayashi *et al.*, 1997). Ces cellules ont un diamètre de 10 à 15 μm . Lorsque l'une de ces conditions est modifiée (voir introduction) ces cellules perdent leur flagelles, deviennent rondes et sont appelées aplanaspores (photographies 4 et 5). Lorsque ce stress persiste, la paroi des cellules s'épaissit et leur volume augmente (Lee & Ding 1994) pour atteindre 60 μm de diamètre chez le kyste qui est la forme de résistance par excellence chez cette espèce (photographies 6, 7 et 8). Quand il y a retour aux conditions de croissance favorables le cytoplasme de ce kyste, ou celui des formes intermédiaires d'enkystement, se divise en plusieurs cellules au moment où la paroi reste entière formant ainsi un "sac" qui contient 4 à 8 cellules. Ce sac s'ouvre à maturité pour libérer ces cellules vertes ovales au bout de 48 heures. Si le retour aux conditions normales a lieu avant l'épaississement de la paroi et l'augmentation du volume cellulaire on assiste simplement à un verdissement de la cellule suivi d'un retour à la forme ovale et la naissance de flagelles. Nous avons observé parfois des cellules vertes flagellées qui restent rondes. Ce verdissement peut durer 24 à 48 heures.

Nous n'avons pas pu maîtriser la provocation de production de gamètes. Le gamétophyte peut être une cellule soit rouge soit verte, ronde ou ovale. Nous avons pu observer l'accolement de gamètes qui donne naissance à un zygote dont la germination comportant une méiose donnerait naissance aux cellules vertes ovales. Nous n'avons jamais observé cette dernière partie du cycle.

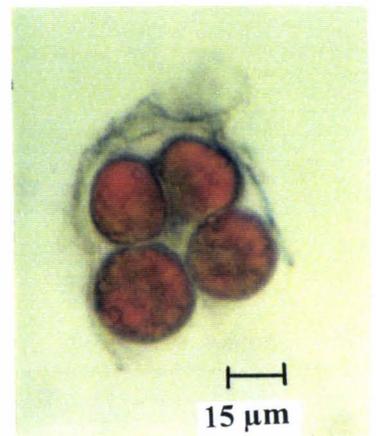
1



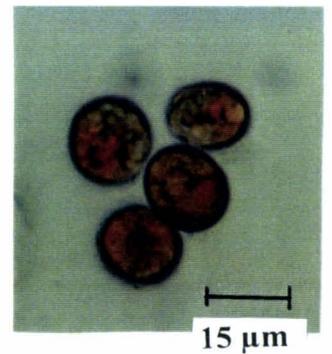
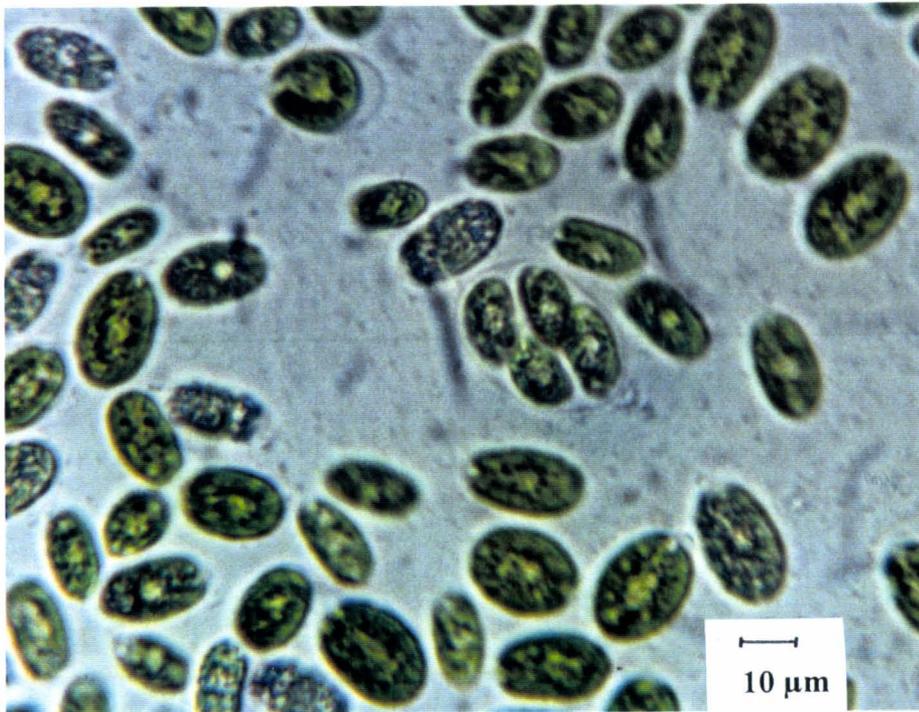
2



3

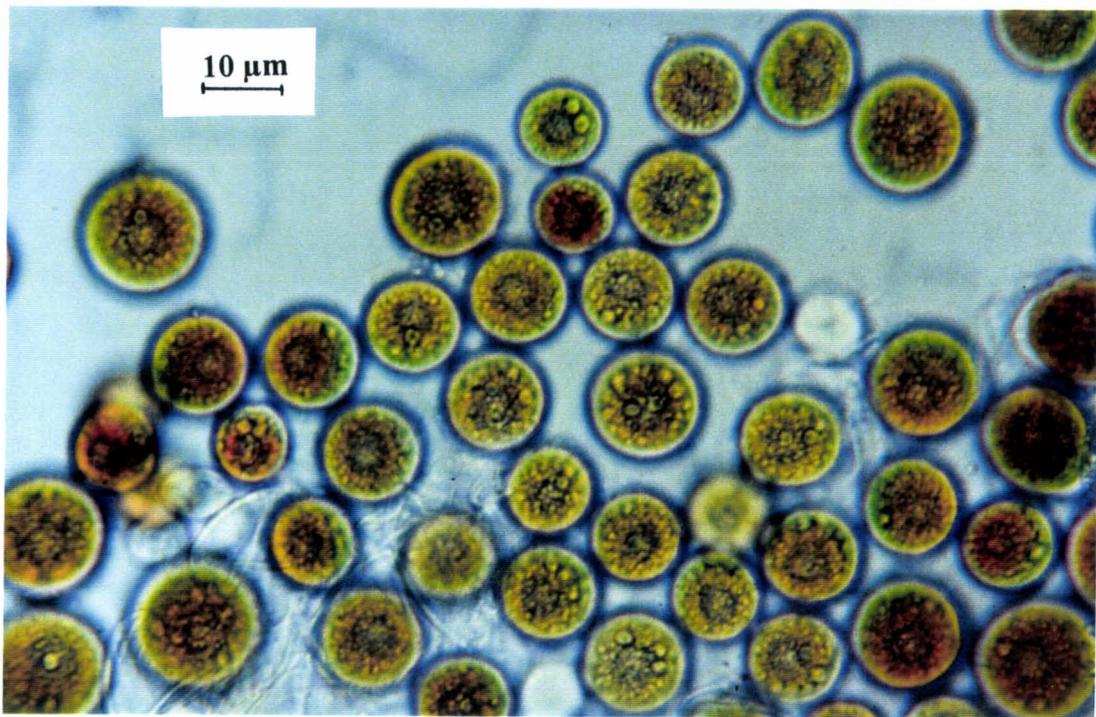


Photographies 1, 2 et 3 : Photographies de "sac" contenant des cellules libérées après rupture de la paroi de la cellule mère.

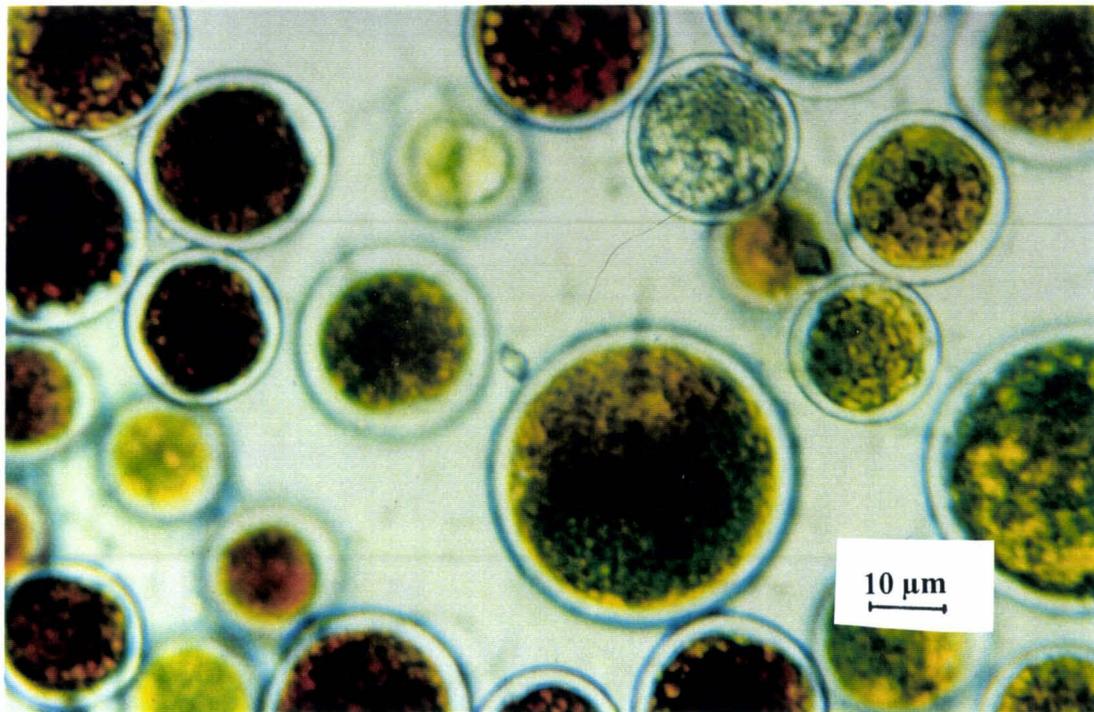


Photographie 4 : Cellules vertes ovales mobiles.

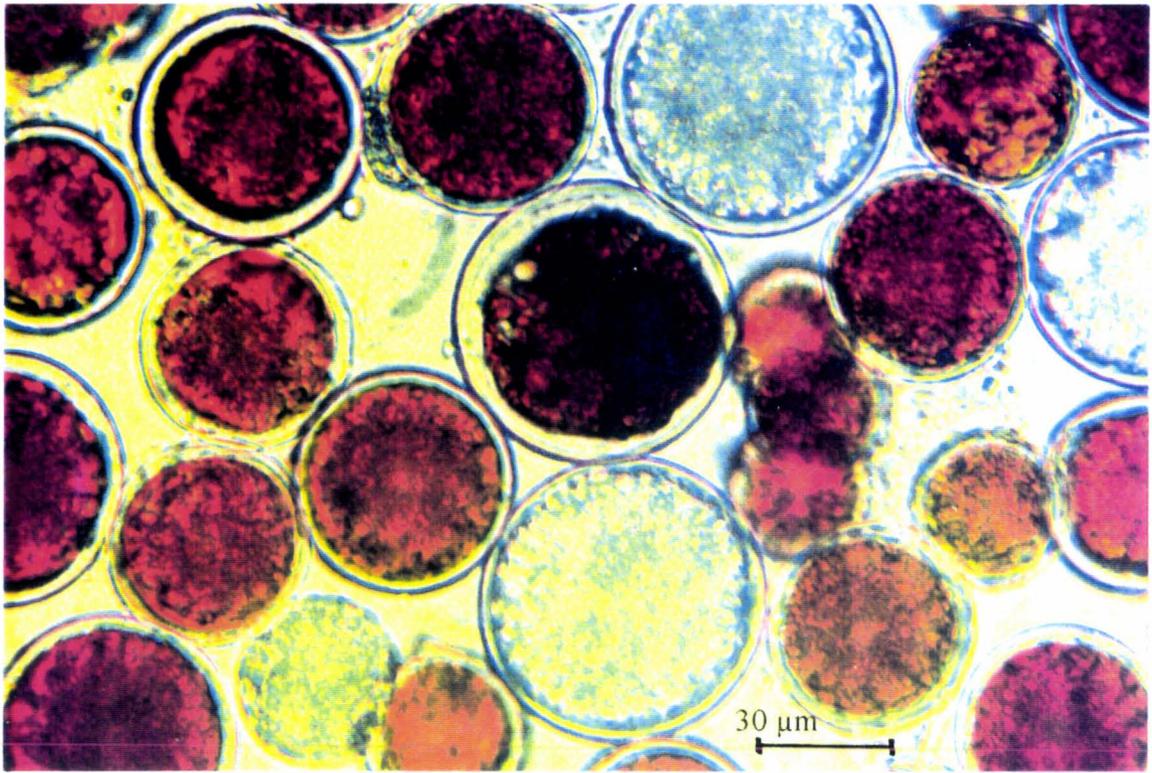
Photographie 5 : Cellules sphériques rouges



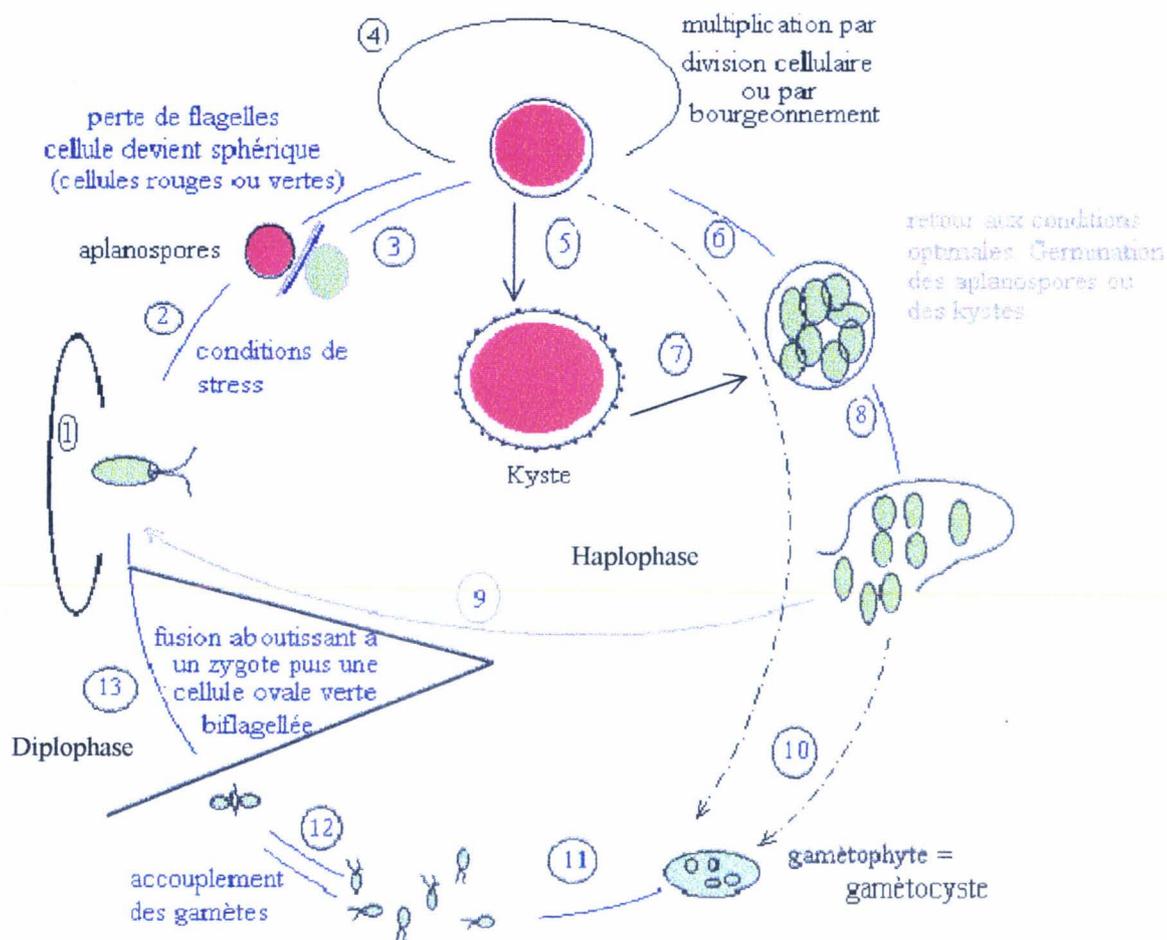
Photographie 6 : Cellules sphériques obtenues par stress par appauvrissement du milieu.



Photographie 7 : Cellules sphériques à paroi épaisse.



Photographie 8 : Cellules enkystées à paroi épaisse.



- 1 : multiplication par scissiparité
- 2 : transformation des cellules et formation d'aplanospores suite à un stress ou appauvrissement du milieu
- 3 : augmentation progressive de taille des aplanospores
- 4 : multiplication par scissiparité ou par "bourgeonnement"
- 5 : transformation des aplanospores en Kystes
- 6 et 7 : lors du retour aux conditions optimales le contenu cellulaire des formes de résistance se divise en plusieurs cellules
- 8 : libération des cellules filles de la paroi mère
- 9 : chaque cellule devient mobile
- 10 : transformation de cellules en gamétophyte
- 11 : libération des gamètes
- 12 : accolement de gamètes
- 13 : fusion des gamètes donnant naissance à un zygote diploïde

Figure 28 : Cycle de vie d'*H. pluvialis*

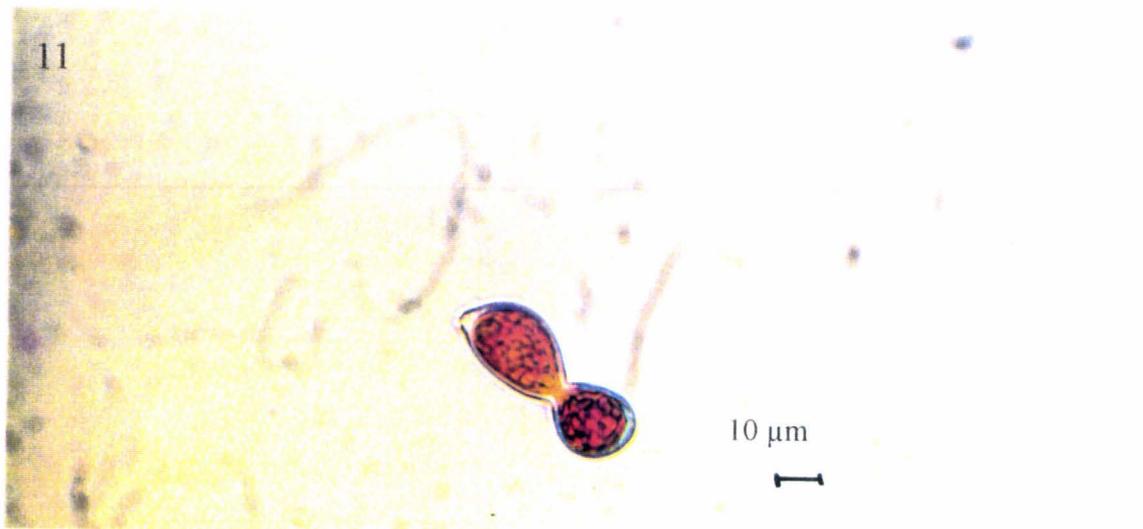
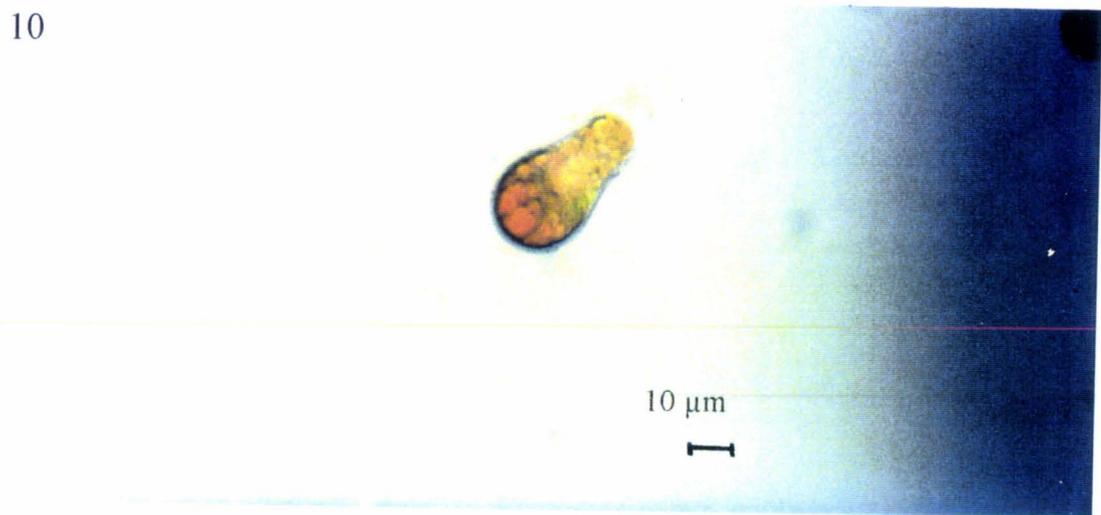
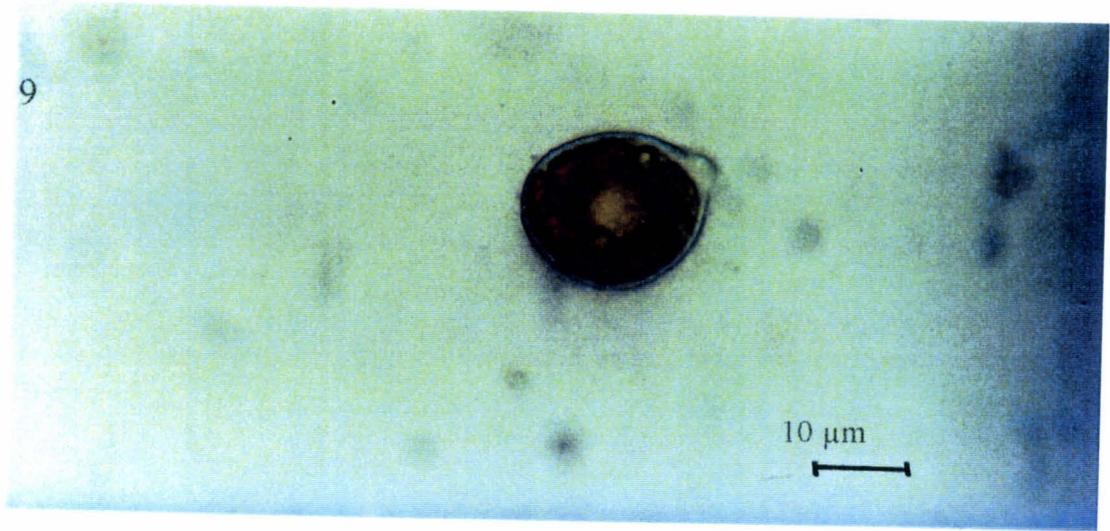
IV - Phototactisme et bourgeonnement

A la partie antérieure du chloroplaste se trouve le stigma (voir Généralités), responsable du phototactisme de la cellule (Grung *et al.*, 1994). Les photorécepteurs du stigma transmettent un signal aux vacuoles pulsatiles à l'aide de changements du potentiel électrique lesquelles provoquent un battement des flagelles. Cet organite, riche en caroténoïdes, joue également chez les volvocales, un rôle important dans l'accolement des cellules reproductrices par leur pôle flagellaire (Lee, 1989).

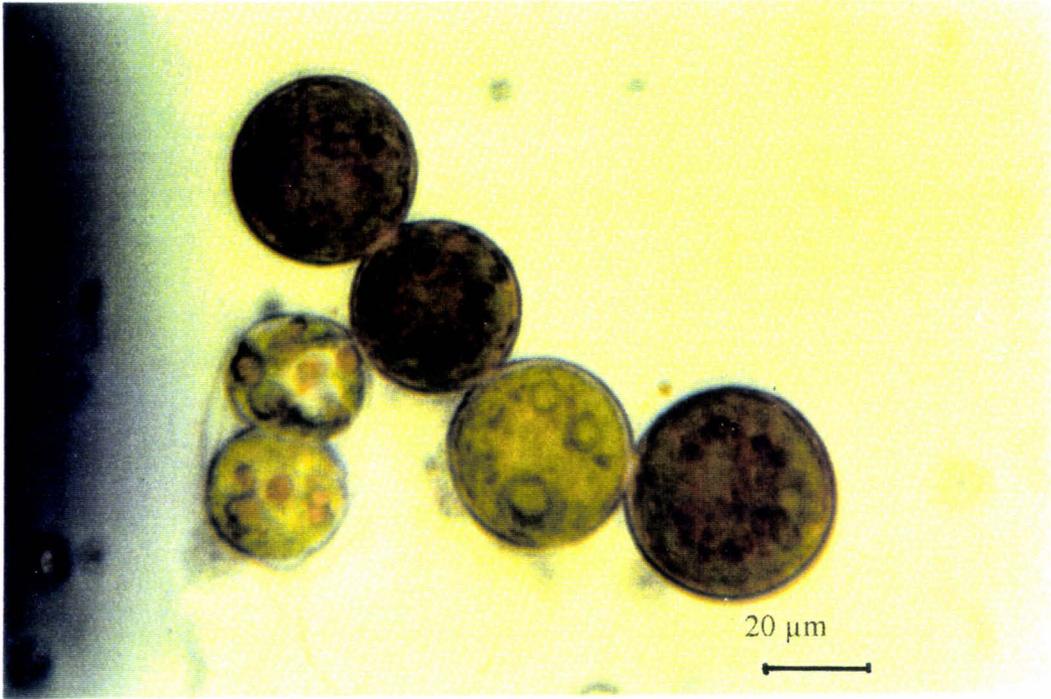
En pratiquant des cultures d'*Haematococcus* sur des milieux solides en boîte de Pétri, nous avons remarqué un développement vertical des colonies constituées de cellules rouges immobiles. Au microscope nous avons remarqué des excroissances des cellules sous forme de bourgeonnements (photographies 9,10 et 11). Deux interprétations ont été émises pour interpréter ce bourgeonnement et ce développement vertical des colonies, soit c'est un moyen qui permet de contourner les autres cellules pour se mettre en contact avec une source humide (endroits de gélose non colonisés) soit les cellules sont attirées par la source lumineuse auquel cas les cellules perdant leur motilité suite à la perte des flagelles gardent la possibilité de photoréception (stigma) et de photoorientation.

Afin de vérifier l'exactitude de l'une des deux possibilités nous avons placé des cultures sur milieu solide (Gélose) en boîtes de Pétri à l'intérieur de caissons totalement obscurs dans lesquels la lumière arrive par un seul orifice muni d'une lentille convergente.

L'examen microscopique des cellules montre un ou des bourgeonnements. Ces bourgeonnements donnent naissance à des cellules filles qui ne se détachent pas de la cellule mère formant ainsi des chapelets de cellules (photographie 12). Ce développement particulier pourrait être dû effectivement à une recherche de la lumière et orientation de ces cellules vers cette dernière.



Photographies (9,10 et 11) de différents stades du bourgeonnement des cellules.



Photographie 12 : Cellules en chapelet suite à des bourgeonnements cellulaires successifs.

V - Variation des niveaux de fluorescence : PAM

A - Essai d'optimisation de la composition du milieu de culture

L'étude de l'optimisation du milieu de culture à travers l'augmentation de la concentration des éléments chimiques du MMB a été réalisée sur la souche de Calais. Ces expériences ont été menées sur deux types de suspension cellulaire, une culture verte en phase de croissance exponentielle et une culture rouge dont les cellules sont aux premiers stades d'enkystement par épuisement du milieu de culture. L'étude des éléments dont l'augmentation de la concentration dans le milieu de culture s'est révélée néfaste à la croissance ($MgSO_4$, $NaCl$ et $CaCl_2$), a été abandonnée. Par conséquent, nous avons retenu KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et $NaNO_3$ pour des études plus approfondies (Fig. 29).

L'augmentation de la concentration de K_2HPO_4 dans une suspension cellulaire verte provoque une élévation du rapport F_v/F_m traduisant un meilleur état physiologique de la culture sans toutefois induire une meilleure croissance cellulaire. Cette observation est vraie pour une augmentation de la concentration de 1,2 et 1,5 fois la concentration utilisée initialement qui est donnée dans la composition du milieu Bristol. Par contre lorsqu'on double la concentration initiale de cet élément la croissance cellulaire montre une régression (résultat non montré) en accord avec la baisse relative du rapport F_v/F_m qui est observée (Fig. 29). Le début de la phase d'enkystement (30 j) est retardé par l'élévation de la concentration de cet élément avec un effet moins accentué lorsque la concentration de K_2HPO_4 a été doublée. Chez la suspension de cellules rouges en début d'enkystement l'élévation du rapport F_v/F_m n'est constatée, de façon très faible, que 30 min après l'ajout de cet élément. Cette augmentation devient visible à 60 min. Par contre aucune différence n'est observée lors de l'enkystement par rapport au témoin. Le même effet, sur la suspension rouge, est provoqué par KH_2PO_4 . Par contre cet élément retarde moins l'enkystement notamment quand la concentration étudiée est de 1,5 ou 2 fois la concentration initiale. $NaNO_3$ provoque également, chez la suspension verte, une élévation du rapport F_v/F_m mais accompagnée d'une stimulation de la croissance cellulaire. Cette élévation du rapport F_v/F_m est retrouvée aussi chez les cellules rouges avec une inhibition d'enkystement très visible. En effet, la valeur de ce rapport, 30 jours après l'ajout de cet élément chimique à $1,2x[i]$, est très voisine de celle du début de l'expérience. Par contre lorsque sa concentration est $1,5$ à $2x[i]$, F_v/F_m devient plus important qu'au début de l'expérience. Comme pour K_2HPO_4 et KH_2PO_4 les

variations provoquées chez les cellules rouges sont très faibles 30 min après l'ajout de l'élément et très nettes après 60 min. L'augmentation du NaNO_3 a provoqué chez la suspension rouge un verdissement corrélé à la concentration de cet élément.

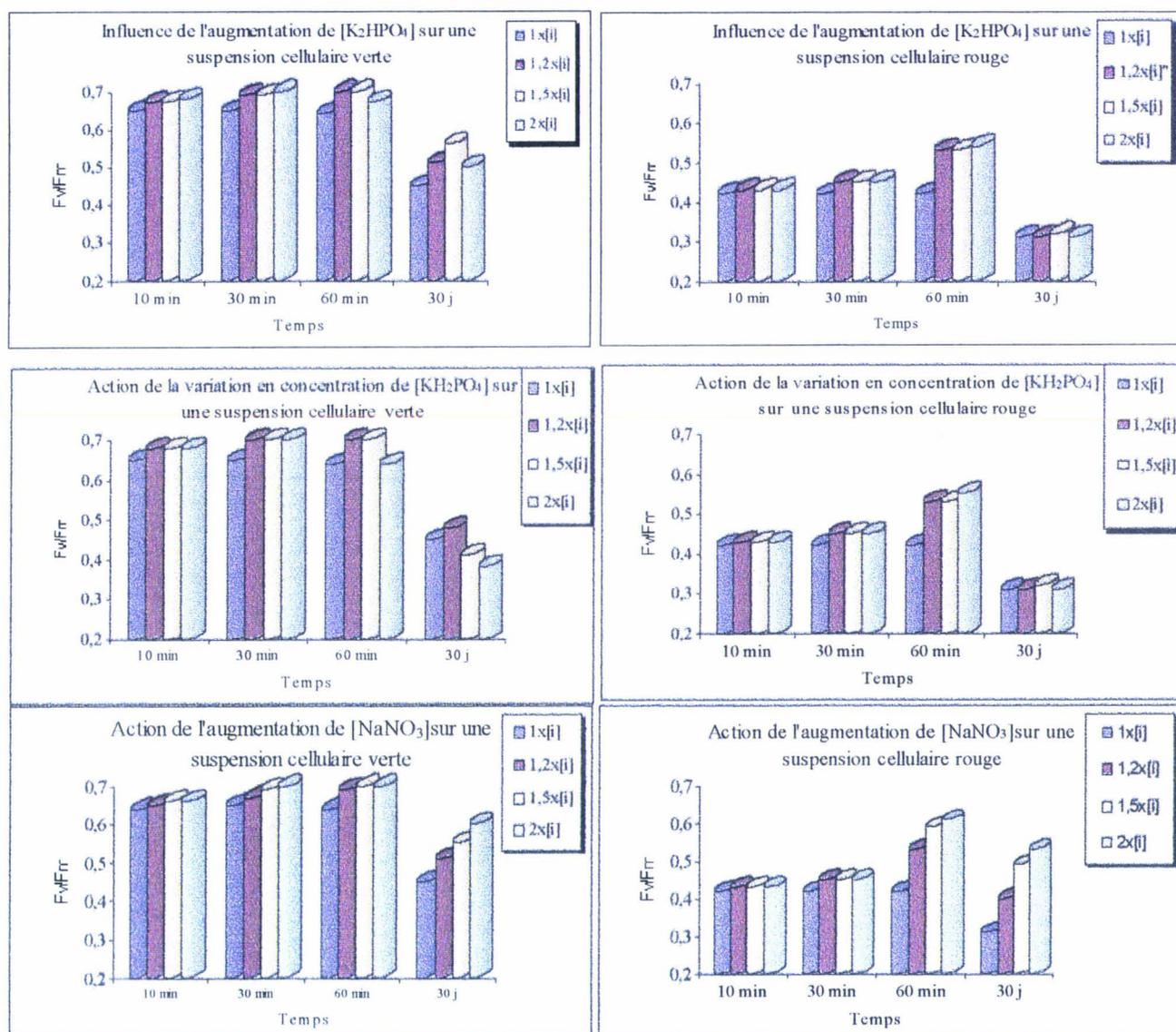


Figure 29 : Influence de l'augmentation de la concentration en phosphate de potassium ou en nitrate de sodium sur une suspension cellulaire verte ou en cours d'enkystement (rouge). [i] = concentration initiale utilisée et donnée dans la composition du milieu Bristol (voir tableau I)

B - Suivi des niveaux de fluorescence de la chlorophylle au cours du stress lumineux

Les suspensions cellulaires sont prélevées toutes les 60 min au cours d'un stress lumineux. Les suspensions sont incubées dans l'obscurité pendant 15 min avant de mesurer les niveaux de rendement de la fluorescence.

Le rapport F_v/F_m baisse au cours des 8 premières heures de stress et passe de 0,65 à 0,31 (Fig.30). Ce rapport se stabilise par la suite jusqu'à la 14^{ème} heure puis recommence à baisser légèrement durant les dix dernières heures de l'expérience.

L'extinction non photochimique de la fluorescence "NPQ" évolue de façon inverse au rapport F_v/F_m (Fig. 30). Ainsi le NPQ augmente très rapidement au cours de la première heure de stress et passe de 0,63 à 1,86. Durant les 7 heures qui suivent le NPQ continue à augmenter puis il se stabilise par la suite à 3,0 durant le reste de l'expérience.

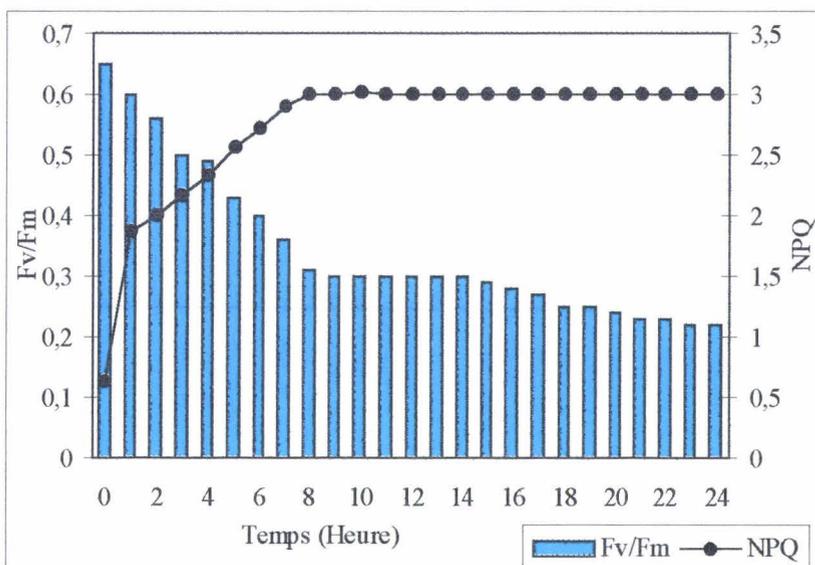


Figure 30 : Evolution du rapport F_v/F_m et de l'extinction non photochimique de la fluorescence (NPQ) chez *H. pluvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu\text{moles} \cdot \text{photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) $n = 6$.

Durant ce stress le F_0 instantané (F_0') exprimé de façon relative (F_0'/F_0)*100 augmente rapidement durant la première heure. Cette élévation se poursuit de façon moins importante jusqu'à la 17^{ème} heure et se stabilise ensuite durant le reste de l'expérience (Fig. 31).

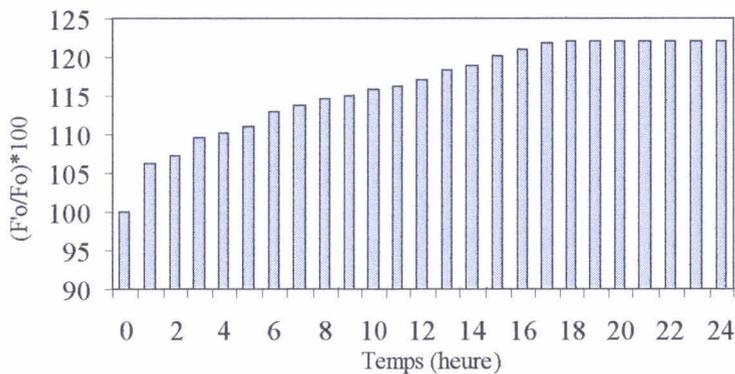


Figure 31 : Evolution relatif du Fo durant un stress lumineux de 1100 $\mu\text{moles photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. (n = 6).

VI - Mesures d'émission et d'excitation de la fluorescence

A - Spectres d'émission de fluorescence

Le spectre d'émission de fluorescence à 77 K des cellules vertes mobiles, montre trois bandes principales d'émission à 681, 697 et 715 nm (Fig. 32). La localisation exacte de ces maxima a été obtenue à l'aide du calcul des dérivées d'ordre 4 de ce spectre (Fig. 33). Nous avons étudié les modifications des spectres d'émission de fluorescence dans l'azote liquide au cours d'un stress lumineux de 48 heures. Sur les spectres d'émission normalisés à 681 nm, les bandes d'émission F_{697} et F_{715} décroissent progressivement au long de ce stress la bande F_{715} étant la plus affectée. Le rapport F_{681}/F_{715} (Fig. 34) qui était de 0,73 au début de l'expérience passe à 2,51 chez les cellules (rouges) ayant subit un stress de 48 heures. Ce rapport est de 3,40 chez les cellules enkystée. A l'issue de ce stress prolongé la suspension cellulaire présentait une photodégradation pigmentaire importante, de nombreuses cellules étant décolorées. Le rapport F_{681}/F_{697} qui était de 0,90 chez les cellules vertes mobiles s'élève à 1,6 chez les cellules ayant subit un stress lumineux de 48 h alors qu'il est de 1,72 chez les kystes obtenus par vieillissement de culture en fiole.

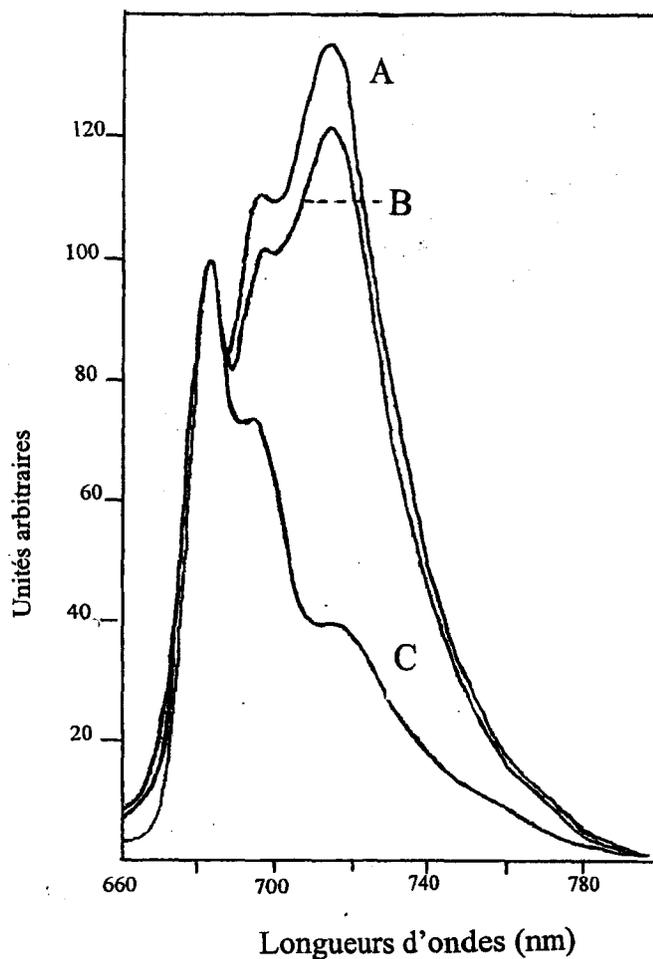


Figure 32 : Spectres d'émissions de fluorescence enregistrés à 77K chez des cellules de *H. pluvialis* (A) vertes flagellées et ayant subi un stress lumineux durant 2 heures (B) ou 48 heures (C).

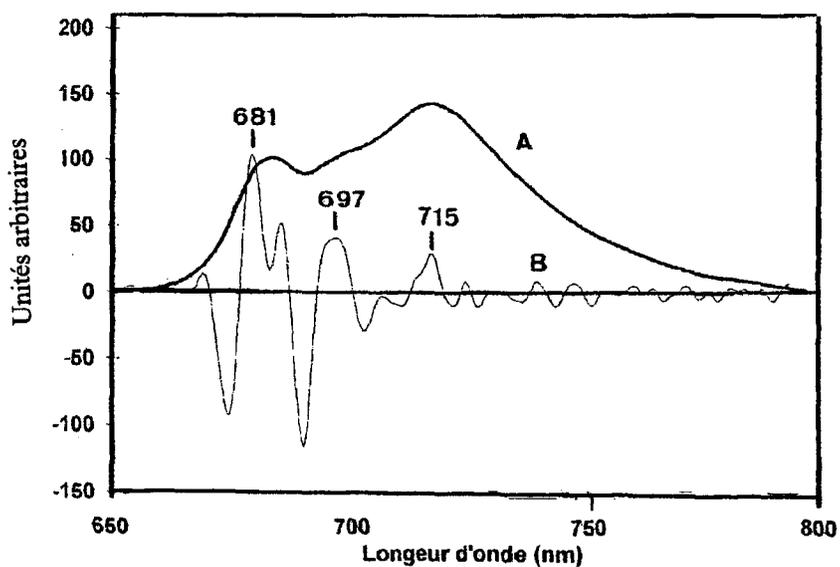


Figure 33 : Calcul des dérivées d'ordre 4 (B) des spectres d'émission de fluorescence (A).

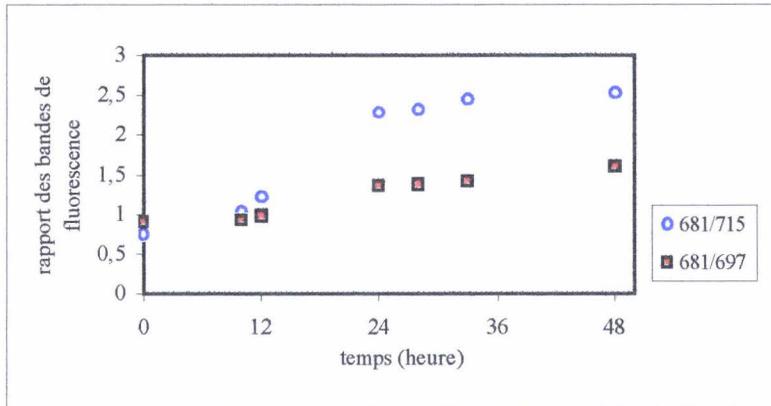


Figure 34: évolution des rapports des bandes d'émission de fluorescence au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) $n = 4$.

B - Spectres d'excitation de fluorescence

Les spectres d'excitation de la fluorescence chlorophyllienne permettent d'estimer l'efficacité du transfert d'énergie des pigments présents dans l'appareil photosynthétique vers la chlorophylle. Dans les conditions d'expérience choisies (77 K) chaque bande présente dans le spectre d'excitation correspond au spectre d'absorption d'un pigment qui transmet son énergie à la chlorophylle. Nous avons enregistré les spectres d'action de la fluorescence de la chlorophylle aux trois longueurs d'onde correspondant aux maxima relevés sur le spectre d'émission de la fluorescence chlorophyllienne des algues c'est à dire à : 681, 697 et 715 nm. Pour chacune de ces trois bandes trois spectres sont présentés. Ils correspondent respectivement à l'excitation de la fluorescence d'une suspension cellulaire verte et ayant subi un stress lumineux ($1100 \mu\text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 1 et 8 heures. Ces spectres sont normalisés à 440 nm 5 (Fig. 35).

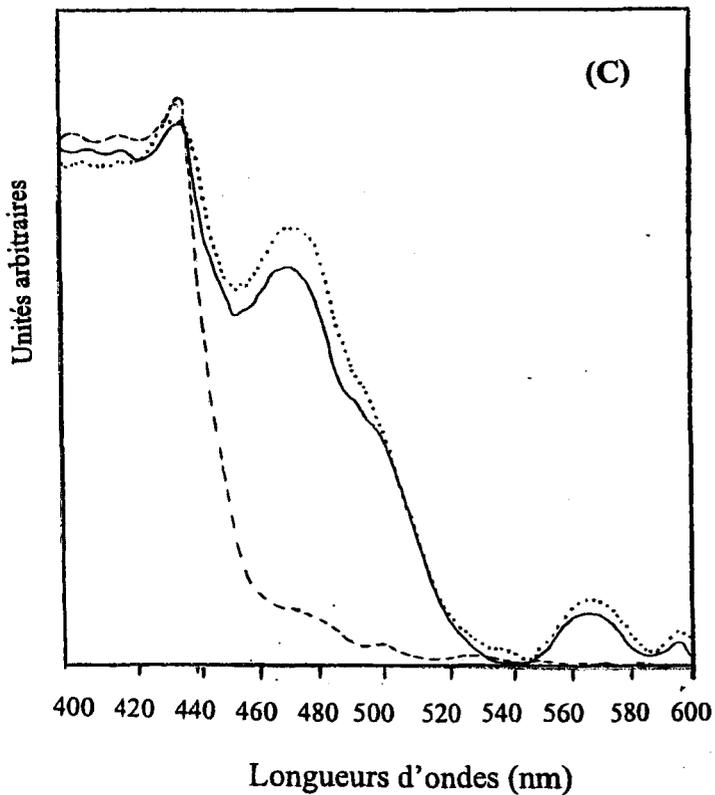
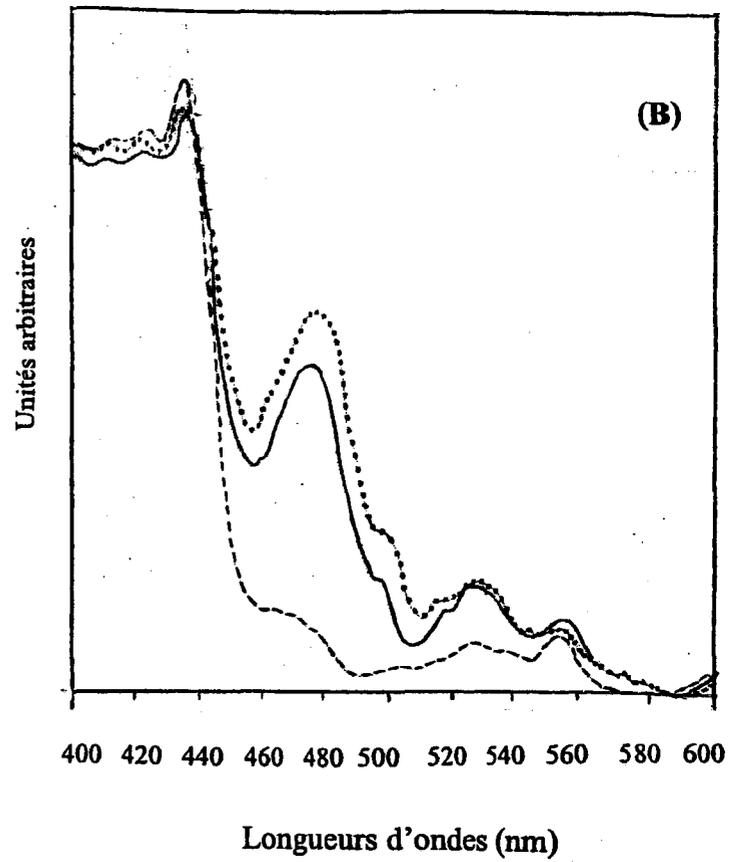
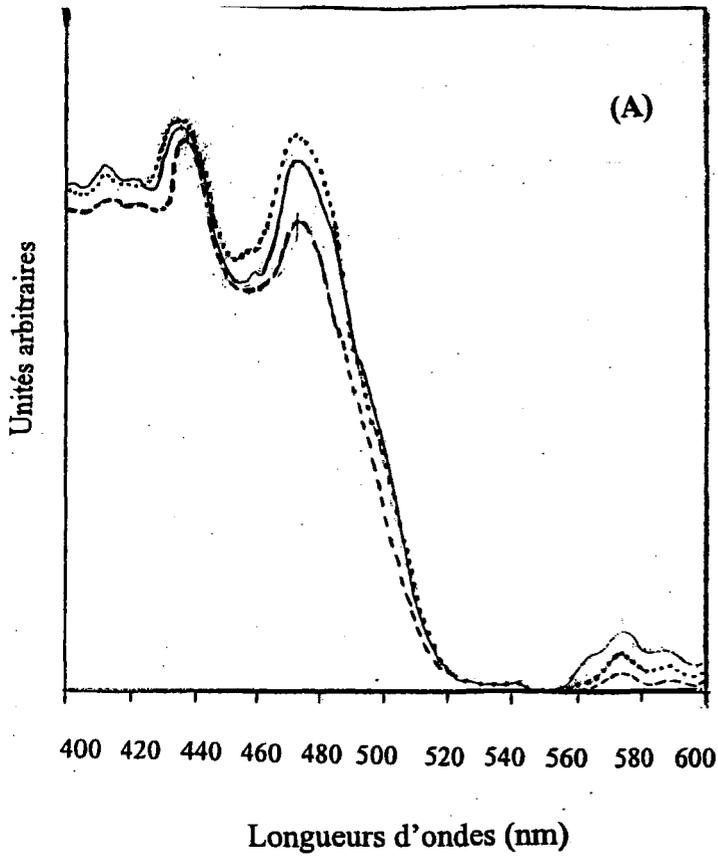


Figure 35 : spectres d'excitation à 77K des émissions de fluorescence de la chlorophylle F681 (A), F697 (B) et F715 (C), d'une suspension cellulaire d'*H. pluvialis* n'ayant subi aucun stress (.....) ou ayant subi un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durant 1 heure (—) ou 8 heures (-----).

◆ excitation de la fluorescence à 681 nm

les spectres d'excitation de la fluorescence chlorophyllienne à 681 nm ne montrent pas de variations importantes au cours du rougissement. En effet, une faible baisse d'amplitude est relevée au niveau des bandes dont les maxima sont voisins de 480, 570 et 590 nm.

◆ excitation de la fluorescence à 697 nm

les spectres d'excitation de la fluorescence de la chlorophylle à 697 nm montrent deux bandes majeures dont les maxima respectifs sont voisins de 440 et 480 nm et des bandes à faible amplitude avec des maxima proches de 520, 530, 540 et 555 nm (Fig. 35). Nous constatons qu'au cours du rougissement induit par le stress lumineux il y a effondrement de la bande à 480. Une baisse de l'amplitude des bandes à 500 et 530 nm.

• excitation de la fluorescence à 715 nm

les spectres d'excitations de la fluorescence de la chlorophylle à 715 nm montrent 5 bandes : 440, 480, 570 et 590 nm. Par ailleurs un épaulement peut être relevé à 500 nm. Après 8 heures de stress lumineux on constate un effondrement spectaculaire des bandes à 480, 500 570 et 590 nm.

VII - Action de la lumière sur la caroténogenèse

A - qualité de la lumière : utilisation de lumière colorées

Nous avons étudié l'effet de la qualité spectrale de la lumière sur le rougissement de l'*Haematococcus*. Nous avons comparé à la lumière blanche des lumières colorées dont le maximum est situé respectivement à : 489, 525, 545, 572, 631 et 661 nm (Fig. 36).

Les radiations vertes dont le maximum est situé à 545, 525 et 572 nm provoquent une légère biosynthèse d'astaxanthine. La lumière bleue induit un rougissement légèrement plus important que ces trois premières mais son effet est moins important que celui de la lumière rouge (631 et 661 nm). Cette dernière (661 nm) provoque une biosynthèse d'astaxanthine légèrement moins importante que celle induite par 631nm.

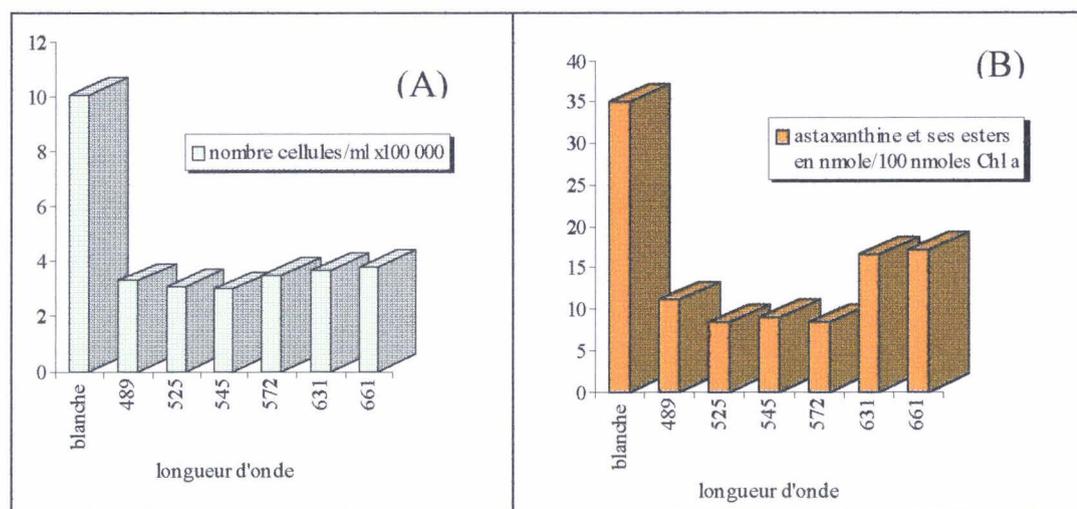


Fig. 36 : action de la qualité de la lumière sur la croissance (A) et la production d'astaxanthine (B) après 48 heures d'éclairement à $600 \mu\text{moles photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n = 4$).

B - intensité de la lumière blanche

Nous avons cherché à déterminer l'intensité lumineuse provoquant la biosynthèse et l'accumulation de l'astaxanthine et ses esters par *Haematococcus pluvialis* sans toutefois induire le phénomène de photoinhibition de la photosynthèse voire la photodestruction des pigments. Dans ce but, nous avons testé l'action de quatre intensités lumineuses (Fig. 37) : 500, 800, 1100 et $1450 \mu\text{ moles photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les trois premières intensités provoquent l'accumulation de l'astaxanthine avec une importance respectivement croissante, alors que la quatrième intensité ($1450 \mu\text{ moles photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) provoque plus rapidement le cycle des xanthophylles et plus tard (8 h de stress) le début de la photodestruction. La photoinhibition a été confirmée par la baisse du dégagement d'oxygène mesurée par une méthode polarimétrique en respectant les mêmes conditions de lumière et de concentration en CO_2 (Fig. 37 bis). Cette mesure montre en effet, qu'à partir d'une intensité lumineuse de $1150 \mu\text{ moles photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ la production d'oxygène par une suspension cellulaire d'*H. pluvialis* se stabilise à $435 \mu\text{moles O}_2\cdot\text{mg Chl}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Sous les intensités lumineuses supérieures à $1250 \mu\text{moles photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, l'ampleur du dégagement d'oxygène décroît mettant ainsi en évidence le phénomène de photoinhibition. A la suite de cette

analyse nous avons décidé de réaliser les études du rougissement en utilisant une lumière de 1100 μ moles photons. $m^{-2}.s^{-1}$ qui permet d'induire l'accumulation d'astaxanthine sans provoquer de photoinhibition.

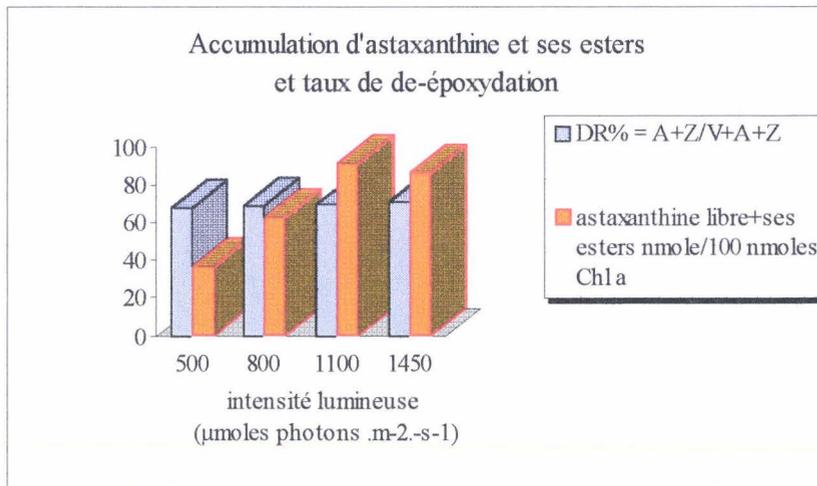


Figure 37 : Action de différentes intensités lumineuses sur la biosynthèse d'astaxanthine et sur le cycle des xanthophylles (n = 4).

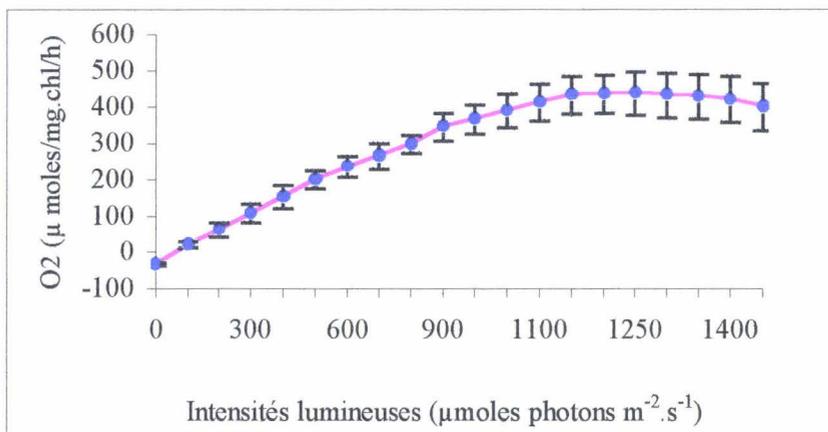


Figure 37 bis : Evolution du dégagement d'oxygène chez H. pluvialis en fonction de différentes intensités lumineuses (n = 8).

VIII - Stress lumineux et conséquences sur les cellules d' *H. pluvialis*

A - Polymorphisme des cellules et croissance des cultures

Les cellules cultivées dans le bioréacteur sont des cellules vertes biflagellées à 96 % alors que 4 % des cellules sont vertes rondes et immobiles parce qu'elles sont des cellules âgées non éliminées par le système de trop plein.

Lorsque les cellules subissent un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) dans le maturateur, elles perdent leur flagelles puis se transforment en cellules rondes. Alors qu'elles étaient vertes au début du traitement, elles montrent un rougissement progressif dû à l'accumulation des gouttelettes lipidiques extraplastidiales contenant l'astaxanthine. Cette accumulation d'abord centrale entoure le noyau avant de s'étendre à l'ensemble de la cellule (photographie 13) a donc pour effet de protéger l'appareil nucléaire et ensuite le reste de la cellule contre la lumière incidente qui peut devenir photodégradante lors de tout stress environnemental. Les cellules augmentent de volume et passent d'un diamètre moyen de 15 à 20 μm , pour les cellules vertes biflagellées, à 45 μm pour les cellules rouges sphériques. Ces cellules voient aussi leur paroi s'épaissir. La croissance cellulaire diminue très fortement au cours du stress (Fig. 38). C'est ainsi que les mesures de turbidité permettent de constater qu'au bout de 24 heures il y a doublement du nombre de cellules sous un éclairage de $50 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ alors que la croissance de la même suspension cellulaire subissant le stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) n'est que de 20% (Fig. 38).

Ces deux courbes ne montrent pas de phase de latence puisque les suspensions cellulaires ont été prélevées du bioréacteur et les cellules se trouvent donc déjà dans la phase exponentielle de la croissance. Par contre ces deux courbes peuvent être découpées en trois phases. En effet, dans la première phase qui correspond aux quatre premières heures d'incubation la suspension qui subit le stress semble croître plus rapidement que la culture évoluant sous un éclairage faible. Les deux courbes se rejoignent à la fin de cette phase. Lors de la deuxième phase qui se situe entre la quatrième et la douzième heure de stress les deux suspensions cellulaires continuent leur croissance mais à un rythme différent. Le stress inhibe de façon importante la croissance de la culture pour l'arrêter totalement à la fin de cette phase. Durant la troisième partie de l'expérience entre la douzième et la dix-huitième heure seule la culture qui ne subit pas de stress présente

encore une très faible croissance et à partir de la dix-huitième heure cette culture semble atteindre la phase stationnaire de croissance qui doit être dûe à un épuisement du milieu de culture.

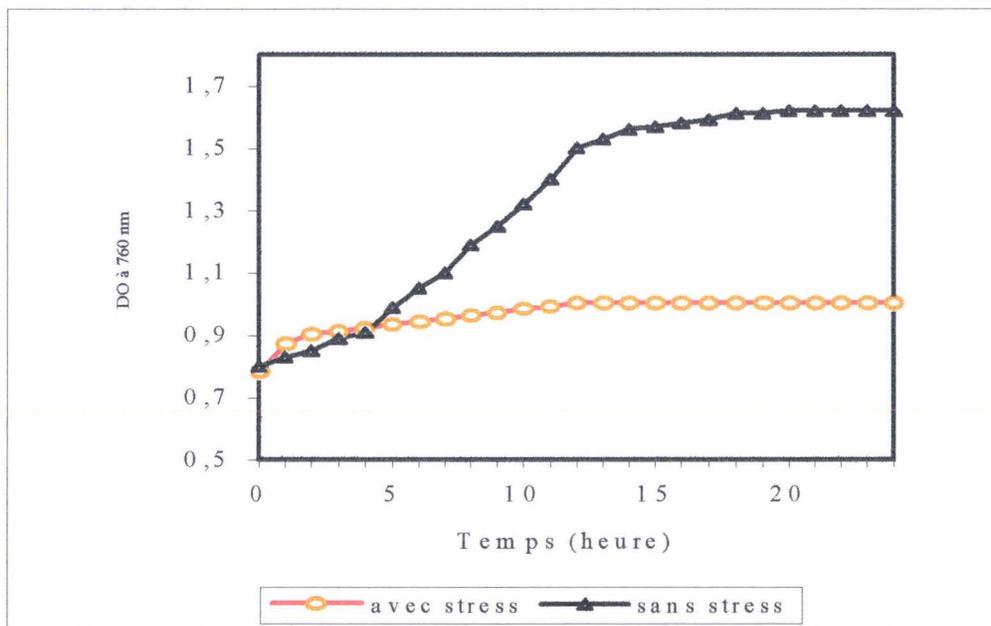
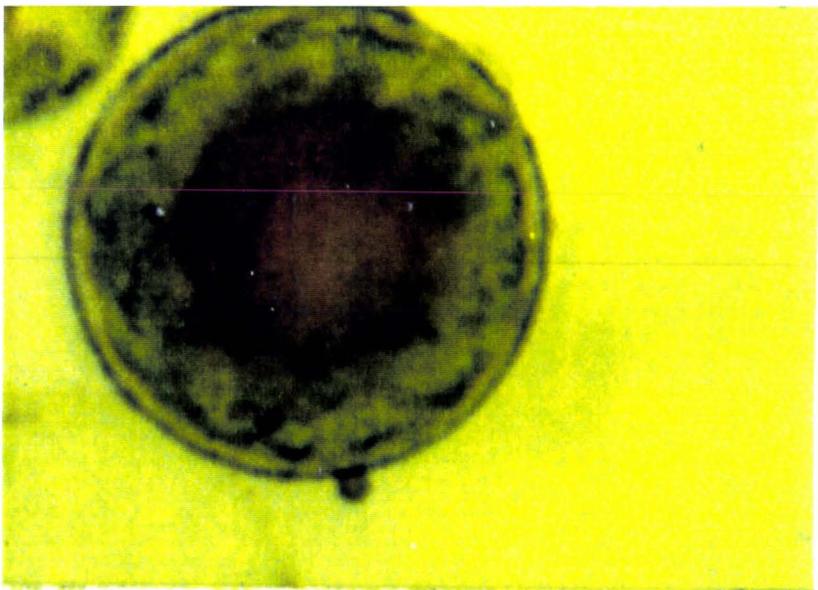


Figure 38 : Courbes de croissance en absence et en présence de stress lumineux ($11\ 00\mu\text{moles photons. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).





10 μ m

Photographie 13 : Cellule montrant un rougissement central dû à l'accumulation de gouttelettes pigmentées autour du noyau.

B - variations pigmentaires

1 - chlorophylles

Durant les quatre premières heures la teneur en chlorophylle b baisse de façon importante faisant augmenter le rapport Chl a/ Chl b d'un tiers de sa valeur initiale (Fig. 40). Au cours de la deuxième partie de l'expérience (4 à 18 h) nous observons une relative stabilité du rapport Chl a/ Chl b. Ce rapport augmente fortement entre la 18^{ème} et la 24^{ème} heure du stress suite à une dégradation importante de la Chl b. Par contre la Chl a ne montre pratiquement pas de variation au cours du stress (Fig. 39).

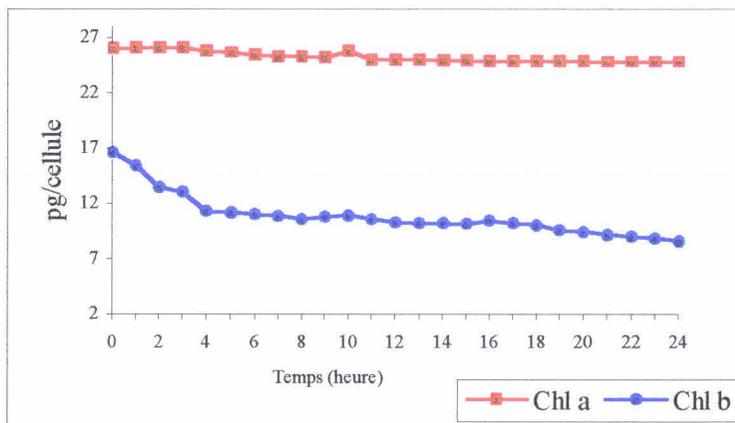


Figure 39 : variation de la teneur en Chl a et Chl b chez *H. pluvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de 24 heures ($n = 6$).

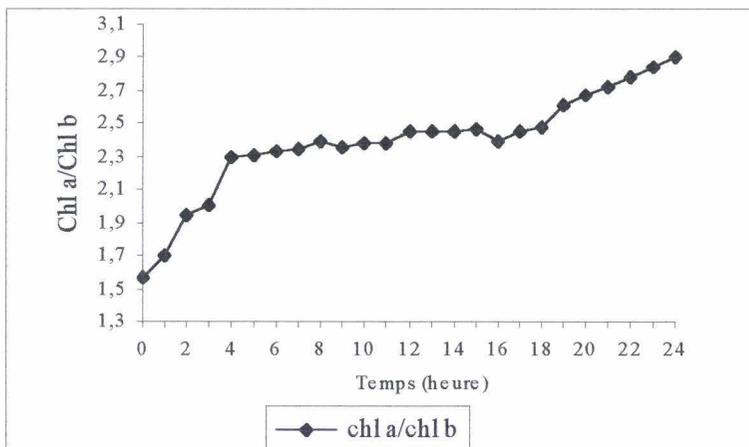


Figure 40 : Variation du rapport Chl a/Chl b au cours du stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ($n=6$).

2 - Caroténogenèse

a - Cycle des xanthophylles

La teneur en violaxanthine montre une forte baisse durant les 4 premières heures d'éclairement et passe de $9,7 \pm 0,7$ à $5 \pm 0,6$ molécules pour 100 molécules de Chl a. Une stabilisation de la teneur de ce caroténoïde est observée durant la 4^{ème} heure de stress. Une chute importante est ensuite observée au cours des 3 heures qui suivent (5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} heure de stress). La teneur en cette xanthophylle se maintient pendant le reste de l'expérience ($2,7 \pm 0,7$ moles/100 moles Chl a). 27 % du pool de violaxanthine n'étant pas concerné par les conversions du cycle des xanthophylles. L'anthéaxanthine et la zéaxanthine apparaissent respectivement au cours de la 1^{ère} et de la 2^{ème} heure du stress. La teneur en anthéaxanthine augmente rapidement pendant les trois premières heures et atteint une valeur maximale de $3,50 \pm 0,4$ molécules pour 100 molécules Chl a. Sa teneur baisse régulièrement jusqu'à la 10^{ème} heure et reste stable pendant le reste de l'expérience ($2,9 \pm 0,4$ molécules pour 100 molécules Chl a).

L'évolution de la teneur en zéaxanthine n'est pas uniforme au cours du stress et montre 5 phases (Fig. 41).

- Elle est absente au cours de la 1^{ère} heure
- Au cours de la 2^{ème} à la 3^{ème} heure du stress cette xanthophylle voit sa teneur augmenter rapidement pour atteindre 2 moles/100 moles Chl a. A ce stade environ 47,53 % de la violaxanthine a été dé-époxydée (Fig. 41)
- au cours de la 4^{ème} et la 5^{ème} heure de stress l'augmentation est très faible.
- Durant les 3 heures d'expérience qui suivent, l'augmentation de la teneur en zéaxanthine est de nouveau importante pour atteindre $5,6 \pm 0,7$ molécules pour 100 molécules Chl a.
- Durant le reste de l'expérience la teneur en zéaxanthine reste stable

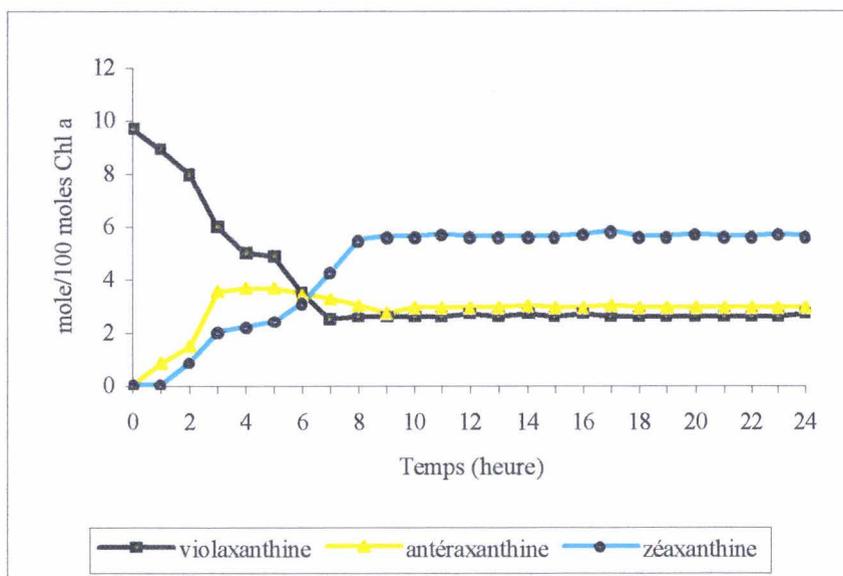


Figure 41 : évolution des pigments participant au cycle des xanthophylles au cours d'un stress ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de 24 heures (n = 6).

Le taux de dé-époxydation (DR%) augmente rapidement et atteint une valeur de 47,83 % à 3 heures de stress lumineux. Après un ralentissement de cette augmentation on assiste à une deuxième augmentation rapide entre la 5^{ème} et 7^{ème} heure de l'expérience pour montrer une constance ($\approx 76,50\%$) durant le reste de l'expérience (Fig. 42)

$$\text{DR}\% = [(\text{zéaxanthine} + \text{antheraxanthine}) / (\text{violaxanthine} + \text{antheraxanthine} + \text{zéaxanthine})] \times 100$$

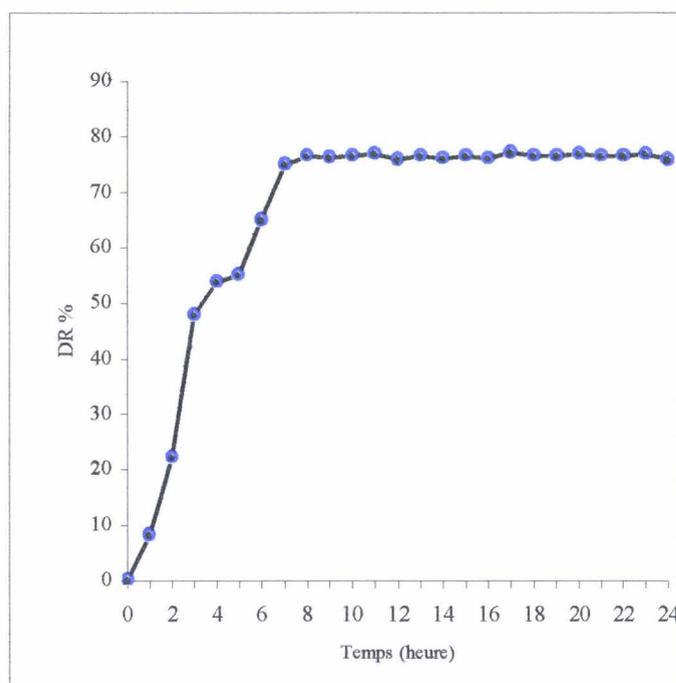


Figure 42 : évolution du taux de dé-époxydation de la violaxanthine au cours d'un stress lumineux de 24 heures ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (n = 6).

b - Caroténoïdes secondaires

Comme il a été vu précédemment le stress physiologique provoqué par une intensité lumineuse forte induit chez l'*Haematococcus pluvialis* une biosynthèse et une accumulation de l'astaxanthine libre et de ses esters (Fig. 43).

Le suivi par CLHP de chacun des pigments révèle la présence de l'astaxanthine sous sa forme libre après seulement 1h de forte illumination. Une expérience portant sur des temps de prélèvements plus courts, a révélé l'apparition d'astaxanthine après seulement 30 minutes de stress. Les esters d'astaxanthine (monoesters et diesters) sont détectés respectivement après une heure et deux heures de forte illumination.

- L'échinénone apparaît après 1 heure de stress avec une teneur de $1,2 \pm 0,12$ molécules pour 100 molécules de Chl *a*. La teneur de ce pigment reste relativement constante jusqu'à la 6^{ème} heure de stress et il disparaît par la suite.
- A l'issue de la première heure de stress l'astaxanthine libre représente $4,2 \pm 0,32$ molécules pour 100 molécules de Chl *a*. Cette teneur augmente pendant les 5 premières heures de stress et se stabilise par la suite.
- La teneur des monoesters d'astaxanthine, détectables à partir d'une heure de stress, ainsi que celle des diesters révélés à partir de 2 heures de stress, augmentent rapidement pendant toute l'expérience. La teneur des monoesters semble toutefois, se stabiliser à la fin du stress alors que celle des diesters d'astaxanthine continue d'augmenter même après 24 heures de fort éclairage.
- La quantité de β -carotène diminue linéairement et très fortement au cours des 5 premières heures et passe de $20 \pm 0,98$ à $4 \pm 0,36$ molécules pour 100 molécules de Chl *a*. Sa teneur se stabilise de la 6^{ème} à la 8^{ème} heure pour augmenter ensuite jusqu'à la 21^{ème} heure de stress. A partir de ce stade sa teneur se stabilise et montre une légère décroissance à la fin du traitement lumineux.

La biosynthèse d'astaxanthine et de ses esters peut donc être séparée en deux phases distinctes :

- la première phase, comprise entre le début de l'éclairage et 5 heures de stress, caractérisée par une forte diminution de la teneur en β -carotène et une augmentation équivalente de celle de l'astaxanthine libre et de ses esters.

- La 2^{ème} phase qui lui fait suite révèle une stabilisation puis une augmentation de la teneur en β -carotène alors que la teneur en esters d'astaxanthine continue de croître. Au cours de cette seconde phase on note donc une biosynthèse nette de caroténoïdes.

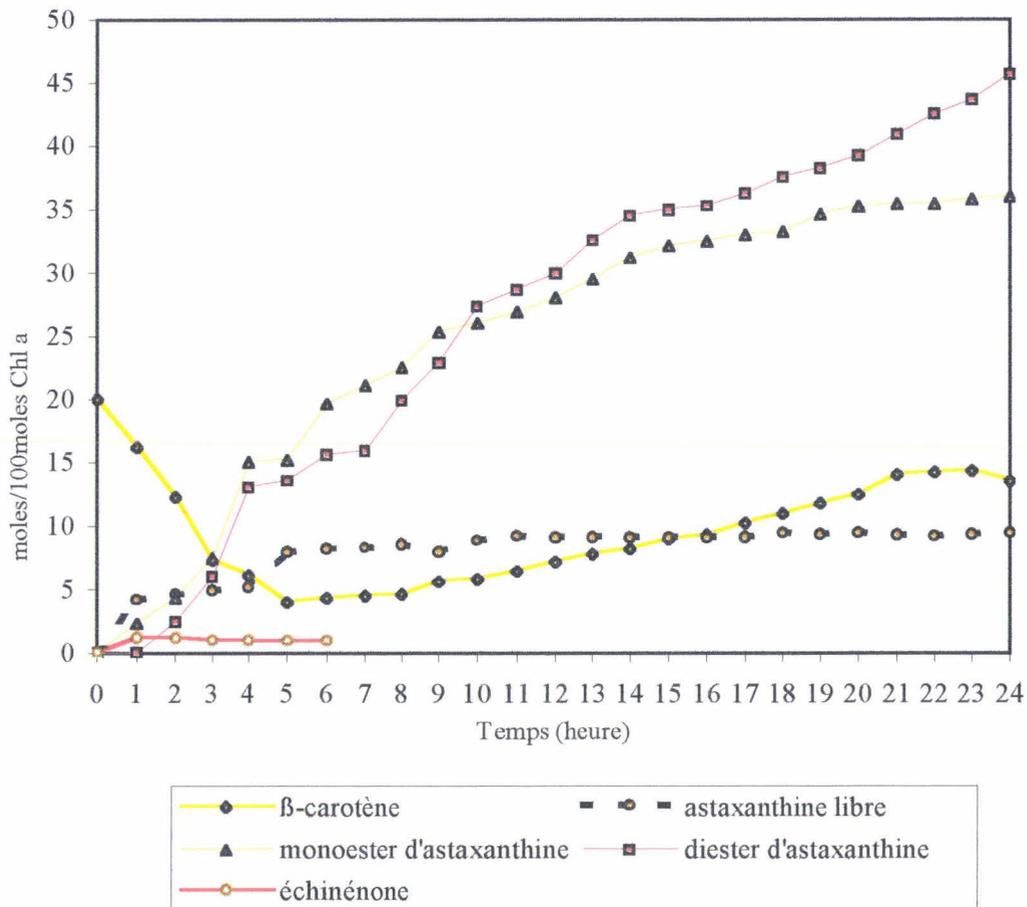


Figure 43 : Evolution des caroténoïdes secondaires et du β -carotène chez *H. pluvialis* lors d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de 24 heures ($n = 6$).

IX - Contribution à l'étude de la voie de biosynthèse de l'astaxanthine

Afin d'étudier la voie de biosynthèse de l'astaxanthine chez *Haematococcus pluvialis* lors des stress environnementaux nous avons d'abord essayé d'identifier les différents caroténoïdes

secondaires qui apparaissent lors de ces stress. Ces identifications ont été réalisées à l'aide des deux techniques chromatographiques en phase liquide et sur couche mince.

A - Etudes des modifications pigmentaires au cours d'un stress lumineux

Les algues d'environ 35 heures provenant du bioréacteur ont été exposées à un éclairage de $1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans le maturateur durant 6 ou 24 heures. Au cours de ce stress lumineux des échantillons sont prélevés toutes les 30 ou 60 minutes.

1 - Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les mono et diesters d'astaxanthine ont des temps d'élution en CLHP proches de ceux des chlorophylles notamment de la chlorophylle *a*. Il est donc très difficile de quantifier ces pigments sur des extraits pigmentaires bruts par CLHP. Cette coélution masque les esters d'astaxanthine lorsqu'ils sont en quantité faible au début du rougissement (Tsavalos *et al.*, 1993). Nous avons donc cherché à isoler ces molécules par CCM avant leur analyse par CLHP.

La première méthode consistant en l'utilisation de la phase mobile méthanol/dichlorométhane/hexane dans les proportions 25:10:55:10 (v/v/v/v) confirme l'existence des caroténoïdes secondaires chez les suspensions cellulaires ayant subi un stress lumineux. Les chlorophylles et l'astaxanthine ont des R_f très proches et ne sont pas bien séparées. La deuxième méthode utilisée avec une phase mobile constituée de dichlorométhane-hexane-acétate d'éthyle (60:30:5, v/v/v) donne des résultats différents. La figure 44 présente 3 plaques chromatographiques correspondant à 3 stades de rougissement d'*H. pluvialis* au cours d'un stress par une forte illumination (méthode1). Sur la plaque du témoin (Fig. 44a) correspondant à un extrait pigmentaire de cellules vertes flagellées n'ayant subi aucun stress nous retrouvons la composition pigmentaire généralement observée chez les végétaux supérieurs ou chez les Chlorophycées avec des R_f décroissants, à savoir β -carotène, lutéine, les chlorophylles *a* et *b*. ensuite la néoxanthine et la violaxanthine.

La 2^{ème} et la 3^{ème} plaque correspondent à un extrait pigmentaire d'une suspension algale ayant subi respectivement 3 h (Fig. 44b) et 24 h (Fig. 44c) de stress. Ces chromatographies confirment la modification de la composition pigmentaire au cours du stress. En effet, sur ces deux plaques nous remarquons l'apparition de bandes correspondant à l'anthéroxanthine et à la zéaxanthine,

confirmant le déclenchement du cycle des xanthophylles, ainsi que la présence d'échinénone, d'astaxanthine libre et de ses esters. Les bandes de la Chl a et de la Chl b sont distinctes de celles des esters d'astaxanthine. L'estérification de la molécule d'astaxanthine libre, par un ou deux acides gras (AG) modifie leur Rf par rapport à celui de l'astaxanthine libre en raison d'une diminution de leur polarité. Les monoesters d'astaxanthine migre ainsi moins vite que le diester. L'élution avec la méthode a donné le même ordre d'élution des pigments que la méthode 1 (Fig. 45)

Un autre mélange de solvants organiques (méthode 3) a été utilisé (éther éthylique et hexane) 25/75 (v/v) ou 40/60 (v/v). Le premier mélange 25/75 (v/v) permet d'éluer le β -carotène et l'astaxanthine diester (Fig. 46). La fraction de l'extrait brut qui reste au niveau du dépôt est récupérée et déposée sur une autre plaque pour être éluee avec les mêmes solvants mais dans un mélange 40/60 (v/v) ce qui permet de récupérer cette fois, l'astaxanthine monoesters. De la même manière le reste du dépôt de cette deuxième plaque est récupéré pour être déposé sur un troisième gel avec cette fois-ci une phase mobile constituée de méthanol / éther éthylique (300 μ l/10ml). Cette troisième migration permet de récupérer l'astaxanthine libre. Cette troisième méthode a été utilisée pour des caroténoïdes récupérés à la sortie des microcolonnes Sep-Pak connectées (voir paragraphe suivant).

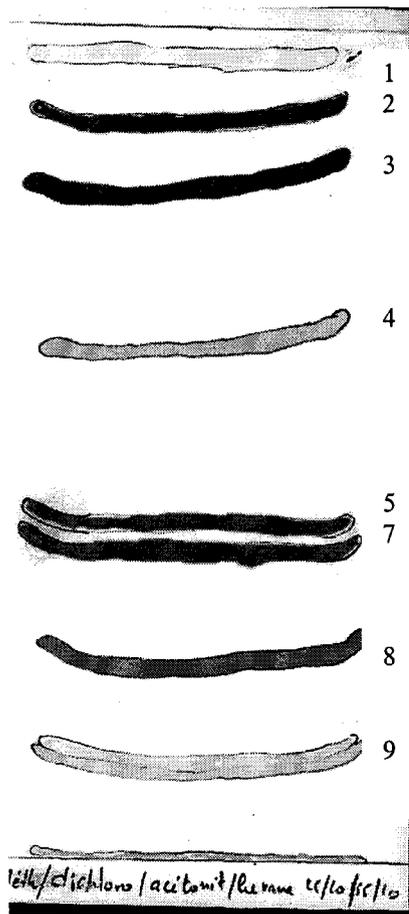
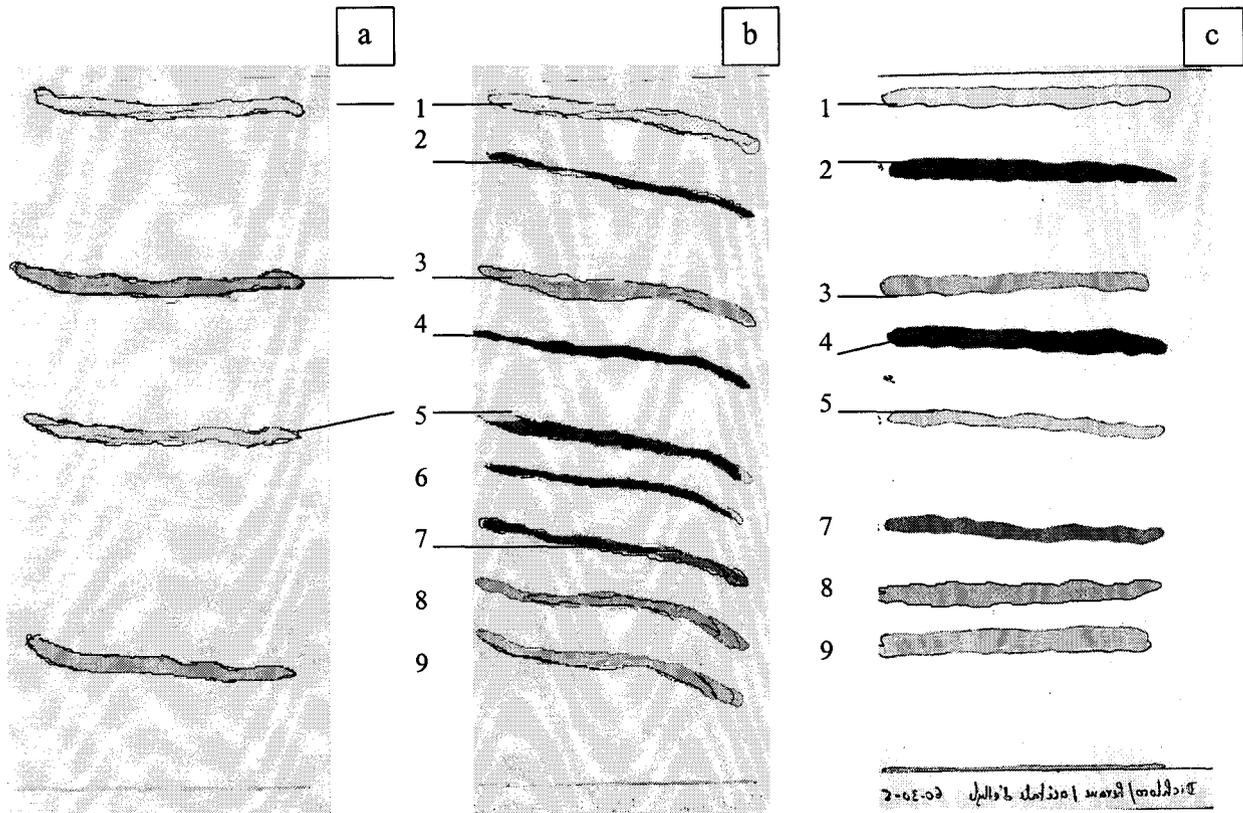


Figure 45: Analyse de la composition pigmentaire chez *H. pluvialis* après 24 h de stress lumineux, par chromatographie sur couche mince avec la phase mobile : A : méthanol/dichlorométhane/acétonitrile/hexane 25/10/55/10 (v/v).

1 : β -carotène, 2 : diesters d'astaxanthine, 3 : lutéine, 4 : monoesters d'astaxanthine, 5 : Chl a + Chl b, 6 : échinénone, 7 : astaxanthine libre, 8 : anthéroxanthine + zéaxanthine 9 : néoxanthine + violaxanthine.

Figure 44 : Analyse de la composition pigmentaire avant le stress lumineux (a), après 3 h (b) et 24 h (c) de fort éclaircissement. La phase mobile est : dichlorométhane/hexane/acétate d'éthyle 60/30/5 (v/v).



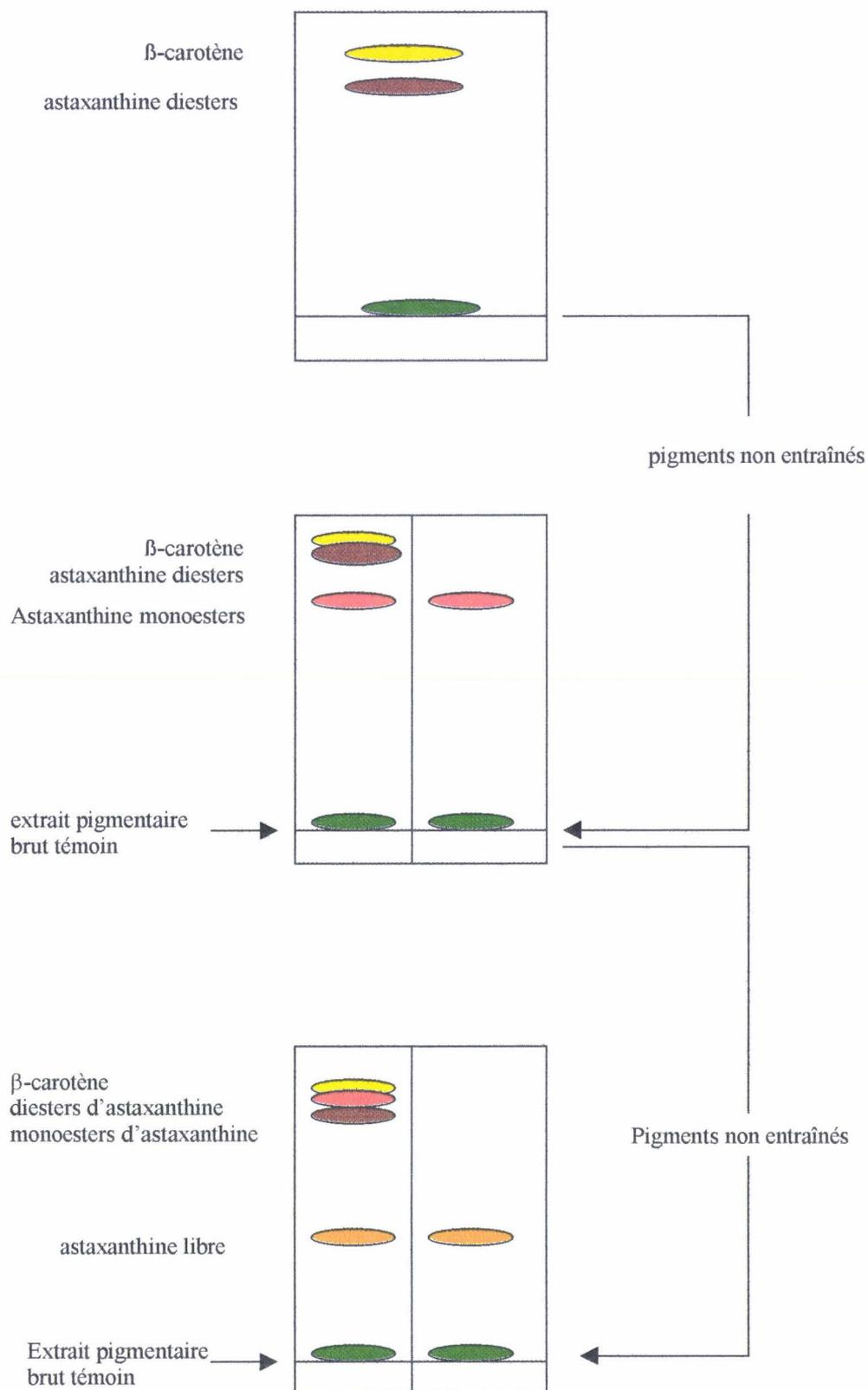


Figure 46 : Séparation de l'astaxanthine libre des monoesters d'astaxanthine et des diesters d'astaxanthine par chromatographie sur couche mince.

2 - Séparation des pigments à l'aide d'une microcolonne de silice

Afin de se débarrasser des chlorophylles qui coéluent avec les esters d'astaxanthine en CLHP nous avons entrepris de réaliser une séparation des pigments à l'aide de microcolonnes Sep-Pak connectées à une seringue. La phase mobile retenue avait la composition suivante : dichlorométhane/acétate d'éthyle/hexane (60/5/61,5) (v/v/v).

Nous avons ainsi recueilli d'abord une fraction orangée correspondant au β -carotène et ensuite l'astaxanthine libre et ses esters ont été récupérés dans une même fraction. Ces pigments ont été analysés et quantifiés par CLHP. Les pigments retenus par la microcolonne ont été élués ensuite par l'acétone puis analysés également par CLHP montrant la présence des chlorophylles, de la néoxanthine, de la violaxanthine et de la lutéine.

Cette technique nous a permis de détecter la présence des esters d'astaxanthine dans les premiers stades du rougissement pendant lesquels ils sont en très faibles quantités et donc masqués par la Chl *a*. Lors des stades avancés de rougissement durant le stress lumineux cette technique devient moins utile puisque la teneur de ces esters d'astaxanthine devient importante.

3 - Analyse de la composition pigmentaire par CLHP

Les pigments habituels des algues vertes retrouvés lors des séparations sur couche mince et les modifications pigmentaires provoquées par un stress ont été recherchés par des analyses de la composition pigmentaire des extraits bruts en CLHP (Fig. 47, 48, 49 et 50). Tous les extraits contiennent de la néoxanthine, de la violaxanthine, de la lutéine, les Chlorophylles *a* et *b* et du β -carotène à des teneurs variables selon la durée du stress. L'anthéroxanthine, la zéaxanthine, l'astaxanthine et ses esters ainsi que l'échinénone sont absents chez les algues vertes et n'apparaissent que lors du stress lumineux. Ces variations pigmentaires s'accroissent chez les kystes (voir Tableaux II et III).

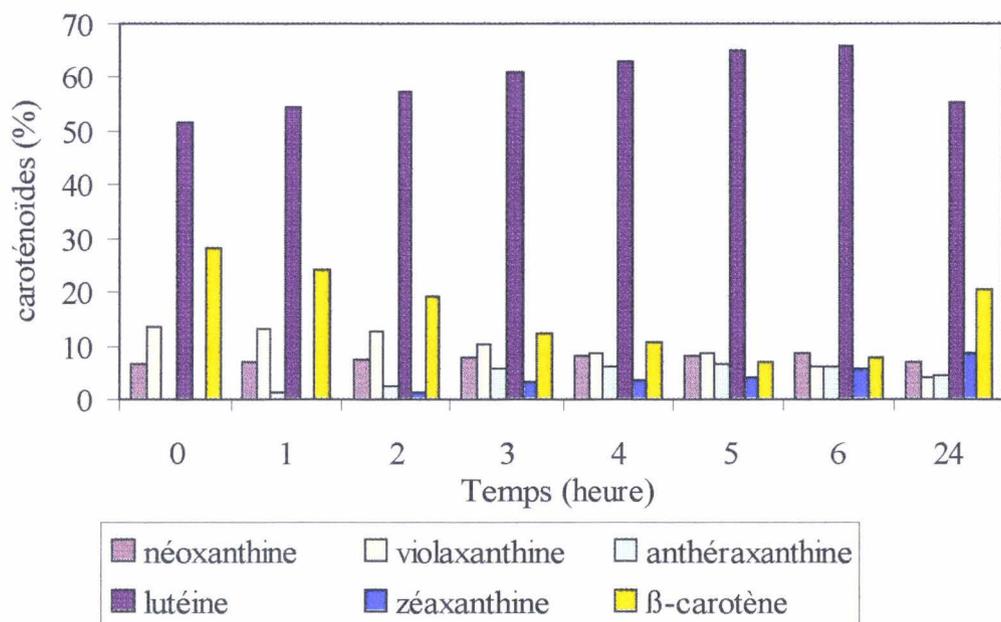


Figure 47 : Teneur en pigments en % des caroténoïdes primaires chez *H. pluvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Tableau II : Teneurs en chlorophylles a et b chez *H. pluvialis* à différents stades de culture. Suspension de cellules vertes et des kystes provenant d'une culture en fiole âgée de 3 mois.

	Chl a/Chl b	Chl a (moles/cellule)	Chl b (moles/cellule)
cellules vertes	1,57	$7,63 \cdot 10^{-6}$	$4,86 \cdot 10^{-6}$
kystes	3,34	$3,62 \cdot 10^{-6}$	$1,08 \cdot 10^{-6}$

Tableau III : Tableau comparatif des teneurs en caroténoïdes (moles/cellule) chez les cellules vertes et chez les kystes d'*H. pluvialis*.

	néoxanthine	violaxanthine	anthéroxanthine	zéaxanthine	Lutéine	β-carotène	astaxanthine*
Cellules vertes	$1,56 \cdot 10^{-6}$	$3,23 \cdot 10^{-6}$	0	0	$12,73 \cdot 10^{-6}$	$6,67 \cdot 10^{-6}$	0
Kystes rouges	$0,21 \cdot 10^{-6}$	$0,37 \cdot 10^{-6}$	$0,52 \cdot 10^{-6}$	$0,54 \cdot 10^{-6}$	$8,6 \cdot 10^{-6}$	$0,87 \cdot 10^{-6}$	$79,15 \cdot 10^{-6}$

* astaxanthine libre + les esters d'astaxanthine

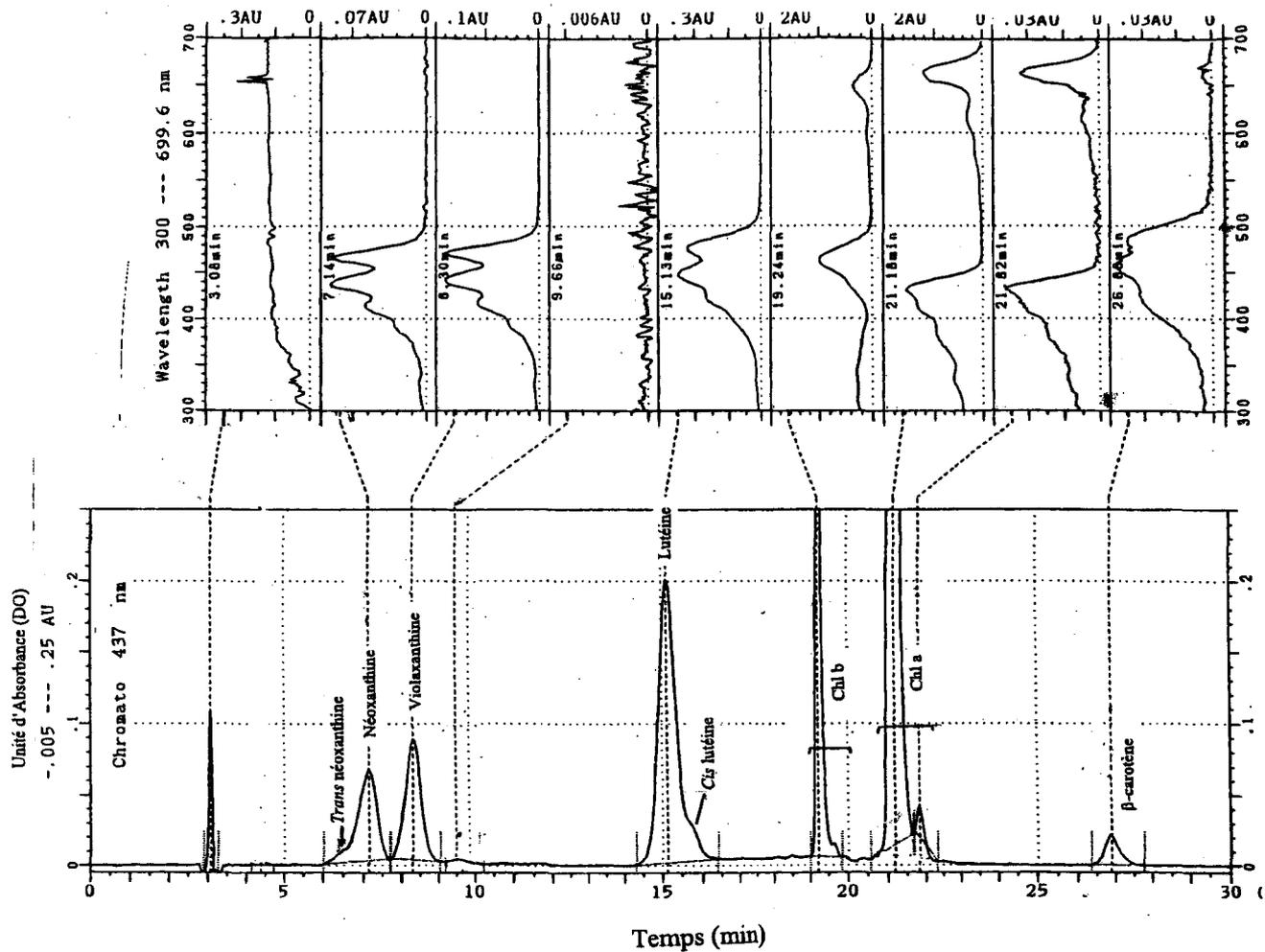


Figure 48 : Profil d'élution en CLHP de l'extrait pigmentaire d'une suspension cellulaire verte de *H. pluvialis* enregistré à 437 nm.

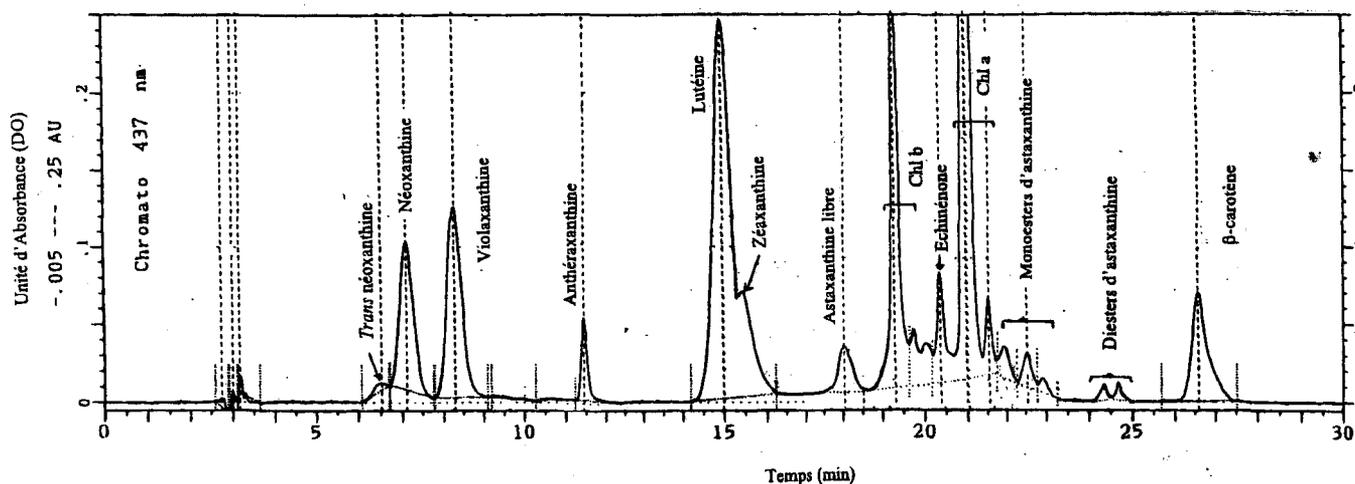


Figure 49 Profil d'élution en CLHP d'extrait pigmentaire enregistré à 437 nm, d'une suspension cellulaire de *H. pluvialis* ayant subi un stress lumineux ($1100 \mu\text{moles photons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pendant 3 heures.

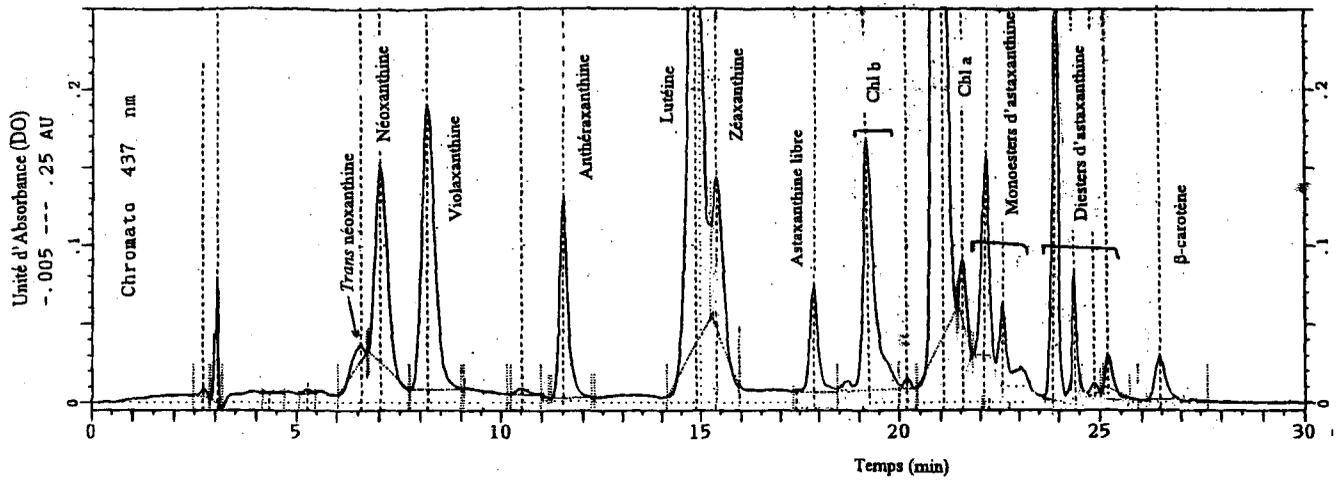


Figure 50 : Profil d'élution en CLHP d'extrait pigmentaire enregistré à 437 nm, d'une suspension cellulaire de *H. pluvialis* ayant subi un stress lumineux ($1100 \mu\text{moles photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 24 heures.

B - Utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique ou de transfert d'électrons

La suppression de la période d'incubation à faible lumière lors des expériences de stress en présence d'inhibiteurs réduit l'effet de ces derniers sur la caroténogénèse. L'incubation permet une meilleure pénétration de ces molécules à l'intérieur de la cellule et assure leur efficacité précoce lors du stress. Nous avons donc maintenu les suspensions cellulaires en présence des inhibiteurs durant 30 min à 20°C et à faible lumière ($20 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avant de provoquer le stress qui induit le rougissement des algues.

Dans le but d'identifier les caroténoïdes intermédiaires dans la biosynthèse de l'astaxanthine, et suivre l'ordre de leur biosynthèse, nous avons testé l'action de 2 inhibiteurs de synthèse protéique la Cycloheximide inhibiteur de la traduction au niveau cytoplasmique, et le Chloramphénicol inhibiteur de la traduction au niveau chloroplastique, l'Ellipticine inhibiteur d'enzymes à cytochrome P450 et le Norflurazon inhibiteur de la synthèse des caroténoïdes.

La suspension algale constituée de cellules vertes d'*H. pluvialis* est placée dans le maturateur et incubée en présence de l'inhibiteur étudié pendant 30 min à faible lumière. Cette suspension subit ensuite un stress lumineux pendant 24 heures.

1 - Cycloheximide (0,1 $\mu\text{g/ml}$)

a : Evolution de la biomasse

L'évolution de la turbidité ($\lambda = 760 \text{ nm}$) ne montre pas de variation importante lors de ce stress qui dure 6 heures (Fig. 51). Cette observation est confirmée par la constance de la masse matière sèche (Fig. 52). Par contre nous avons remarqué une baisse importante du poids frais à partir de 3 heures de forte illumination. Cette baisse dure jusqu'à la fin de l'expérience. Le poids sec représentait au début de l'expérience 10,88 % du poids frais des cellules. Ce taux reste relativement stable pendant les trois premières heures, ce pourcentage augmente à partir de 3 heures et devient 13,52 % au dernier prélèvement

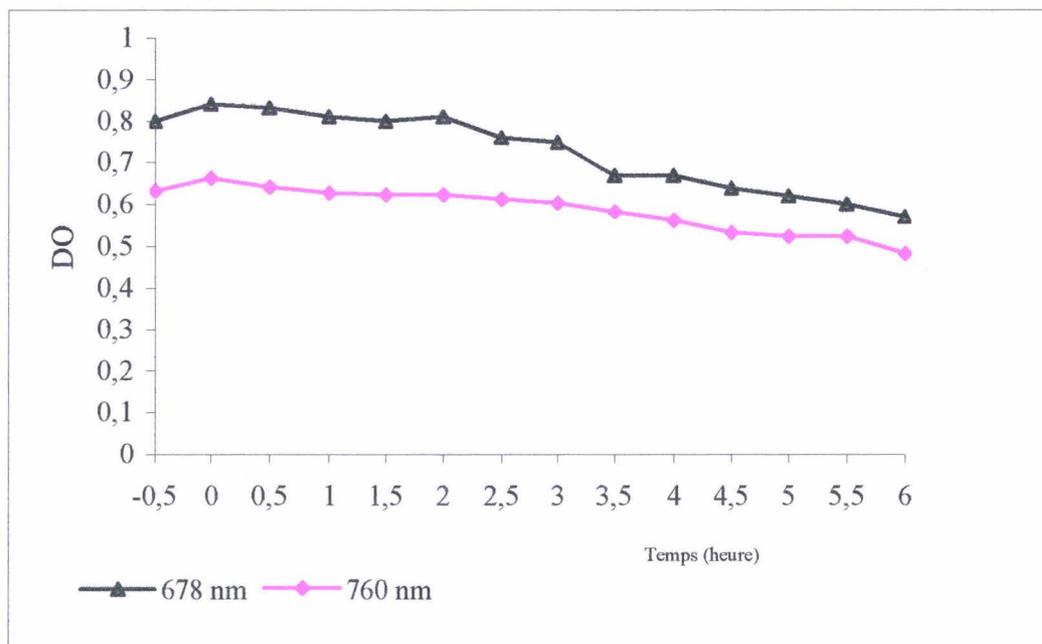


Figure 51 : évolution de l'absorption à 678 nm et 760 nm au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Cycloheximide ($n = 6$).

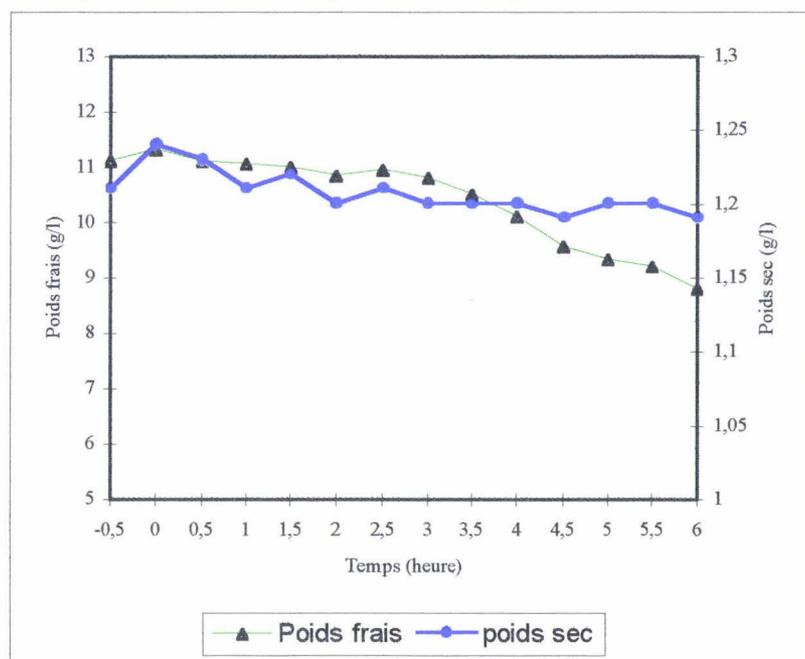


Figure 52 : Evolution de la biomasse fraîche et sèche au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Cycloheximide ($n = 6$).

b : Variation de la teneur en pigments

- le cycle des xanthophylles

La teneur en violaxanthine présente une baisse importante durant ce stress. Les quantités d'anthéroxanthine et de zéaxanthine, qui apparaissent dans la première demi-heure d'illumination, augmentent pendant les trois premières heures de stress puis se stabilisent durant le reste de l'expérience (Fig 53). Le taux de dé-époxydation (DR%) atteint 57,32 % en 3 heures et reste stable (Fig. 54) alors qu'en absence d'inhibiteur (Fig. 41) on atteint une valeur de 47,83 en 3 heures avec un maximum de 76,50 % (Fig. 42).

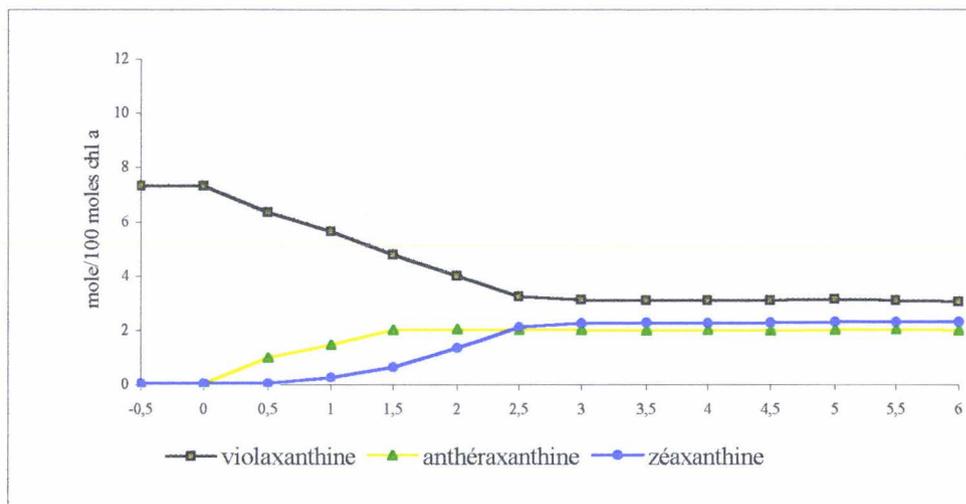


Figure 53 : évolution des pigments du cycle des xanthophylles en présence du Cycloheximide durant un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ($n = 6$).

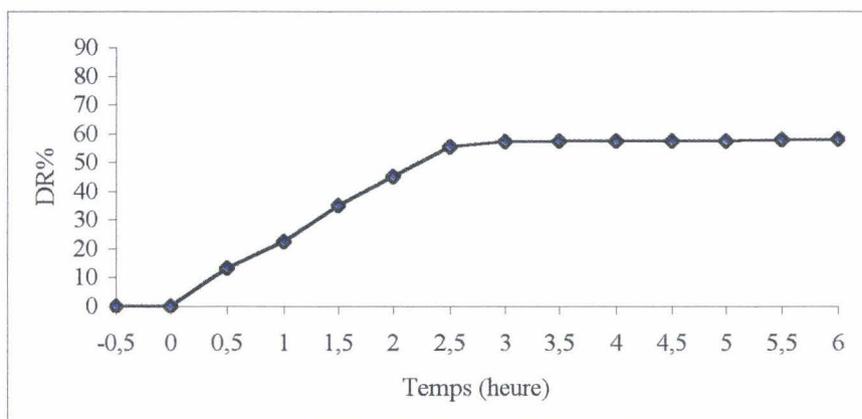


Figure 54 : Suivi du taux de dé-époxydation en présence de Cycloheximide lors d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ($n = 6$).

- les chlorophylles

La teneur en chlorophylle b diminue pendant les 3 premières heures de stress de façon importante alors que la chlorophylle a ne varie pas beaucoup pendant cette partie de l'expérience (Fig. 55). En effet, la teneur en Chl a ne montre une baisse que lors de la deuxième phase de l'expérience (3 à 6 h de stress). La variation du rapport Chl a/ Chl b (Fig. 56) est très différente de celle de ce même rapport en absence d'inhibiteur de synthèse protéique. En effet, ce rapport varie entre la valeur 1,55 et 1,93 et se stabilise à partir de 3,5 heures alors que dans l'expérience sans inhibiteur il passe de 1,57 à 2,5 (12 à 13 h de stress).

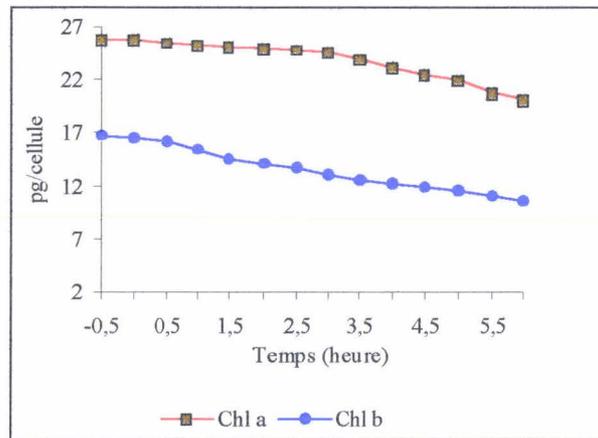


Figure 55 : Evolution de la teneur de Chl a et Chl b durant un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Cycloheximide ($n = 6$).

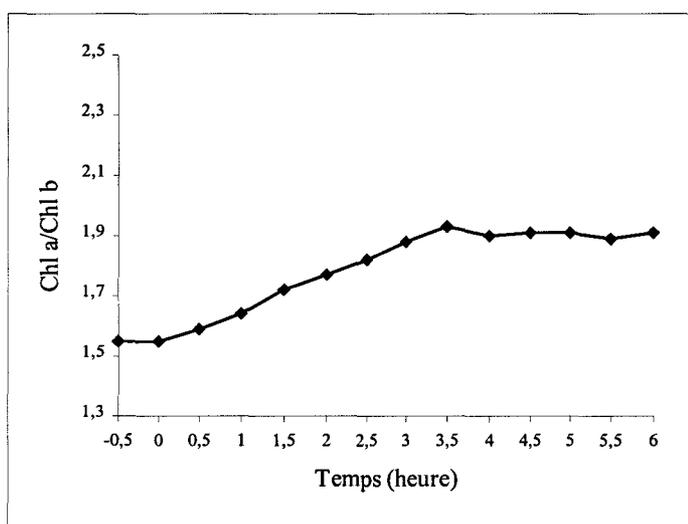


Figure 56 :évolution du rapport Chl a/ Chl b au cours d'un stress de 24 h présence de Cycloheximide sous un éclairage de $1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (n = 6).

- les caroténoïdes secondaires

L'astaxanthine sous ses différentes formes, qui n'existait pas au début du stress, n'apparaît pas lors de cette expérience alors que le β -carotène reste relativement stable.

2 - Chloramphénicol (100 μ g/ml)

a: Evolution de la biomasse

Nous avons observé une légère augmentation de la masse cellulaire (matière sèche et masse fraîche) pendant les 30 min d'incubation. Durant l'éclairage la masse de matière sèche et la masse de matière fraîche diminuent de façon équivalente pendant les 4 premières heures de stress, par contre pendant les deux dernières heures de l'expérience le poids frais diminue de façon plus importante que le poids sec (Fig. 57)

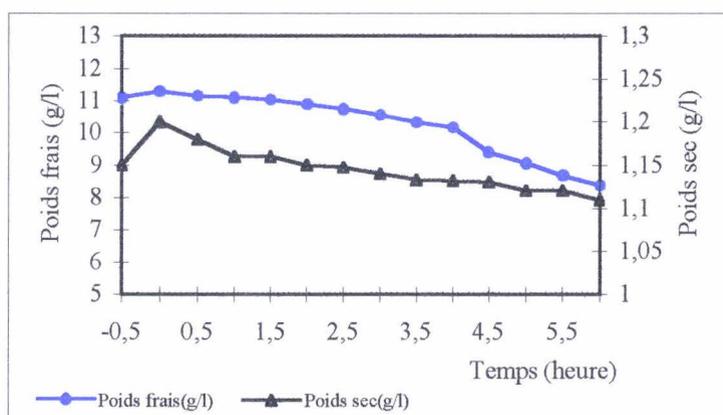


Figure 57 : évolution de la masse fraîche et du poids sec au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence du chloramphénicol ($n = 6$).

b : Variation de la teneur en pigments

- le cycle des xanthophylles

La teneur en violaxanthine chute de façon très importante pendant les 3 premières heures de stress et se stabilise durant le reste de l'expérience (Fig. 58). A l'inverse de cette xanthophylle les teneurs en anthéroxanthine et en zéaxanthine, détectées respectivement à partir de 30 et 60 min de stress, augmente rapidement pendant les 3 premières heures de l'expérience. La quantité relative de ces caroténoïdes se stabilise à son tour à partir de 3 heures d'illumination.

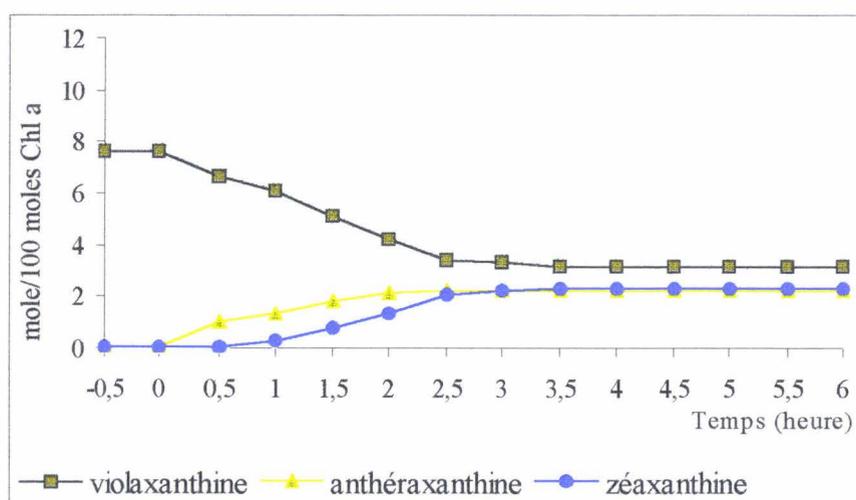


Figure 58 : teneur en pigments impliqués dans le cycle des xanthophylles au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de chloramphénicol ($n=6$).

Le taux de dé-époxydation (DR%) augmente linéairement et atteint 57,16 % après 3 h d'illumination (Fig. 59) alors qu'en absence de cet inhibiteur ce taux atteint 76,50 % (Fig.42).

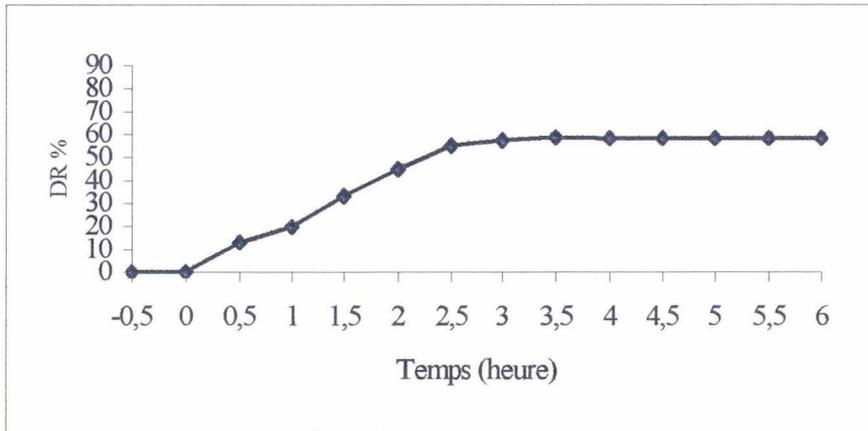


Figure 59 : évolution du taux de dé-époxydation au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de chloramphénicol ($n = 6$).

- les chlorophylles

La teneur en chlorophylles (Fig. 60) varie de manière très proche à son évolution en absence d'inhibiteur, ainsi le rapport Chl a/ Chl b augmente pendant les 3 premières heures d'illumination puis se stabilise durant les 3 heures suivantes. (fig. 61).

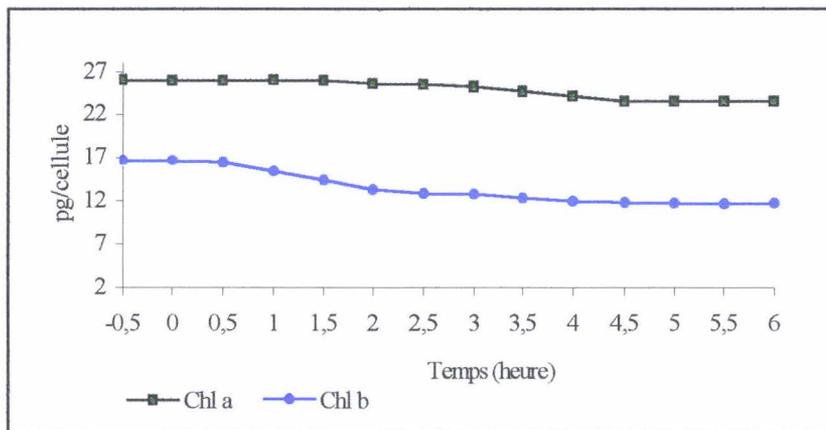


Figure 60 : Evolution de la teneur en Chl a et en Chl b durant un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Chloramphénicol ($n = 6$).

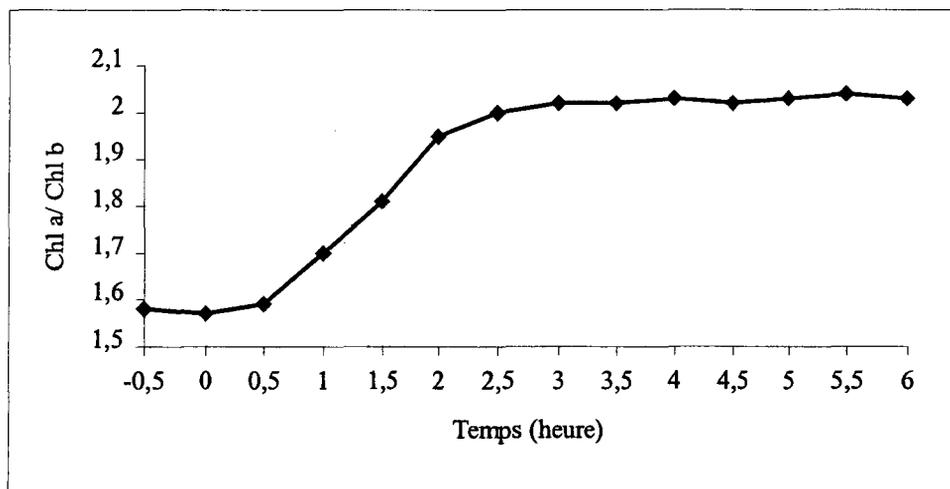


Figure 61 : évolution du rapport Chl a/ Chl b durant un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de 6 h en présence de chloramphénicol ($n = 6$).

- les caroténoïdes secondaires

La quantité de β -carotène diminue fortement au cours des 4 premières heures de stress et passe de $17 \pm 0,78$ à $4,56 \pm 0,41$ molécules pour 100 molécules de Chl a (Fig. 62). Sa teneur tend à se stabiliser durant les deux heures qui suivent. L'astaxanthine libre est détectée après 30 min de stress. A l'issue de 90 min de stress l'astaxanthine libre représente $3,34 \pm 0,41$ molécules pour 100 molécules de Chl a. Cette teneur reste stable durant le reste de l'expérience. Lors de l'expérience témoin la teneur en astaxanthine atteint $8,2 \pm 0,34$ après 6 h de stress et $9,46 \pm 0,44$ à l'issue de 24 h de fort éclairage. Les monoesters d'astaxanthine sont détectés respectivement après une heure de forte illumination et leur teneur atteint 4 moles pour 100 Chl a à la fin de l'expérience. En absence d'inhibiteur leur teneur atteint respectivement $19,65 \pm 0,95$ et $36 \pm 0,90$ moles pour 100 moles de Chl a après 6 h et 24 h de stress. Les diesters d'astaxanthine apparaissent à l'issue de 2 h de stress. Leur teneur après 6 heures de forte illumination est de $4,3 \pm 0,87$ moles pour 100 moles de Chl a. Leur teneur en absence d'inhibiteur atteint respectivement $15,6 \pm 0,95$ et $45,62 \pm 0,89$ moles pour 100 moles de Chl a après 6 et 24 h de stress lumineux. L'échinénone apparaît également après 30 min de fort éclairage avec une faible teneur de

$1 \pm 0,15$ molécule pour 100 molécules de Chl a. Cette teneur est de $0.85 \pm 0,13$ à la fin de cette expérience.

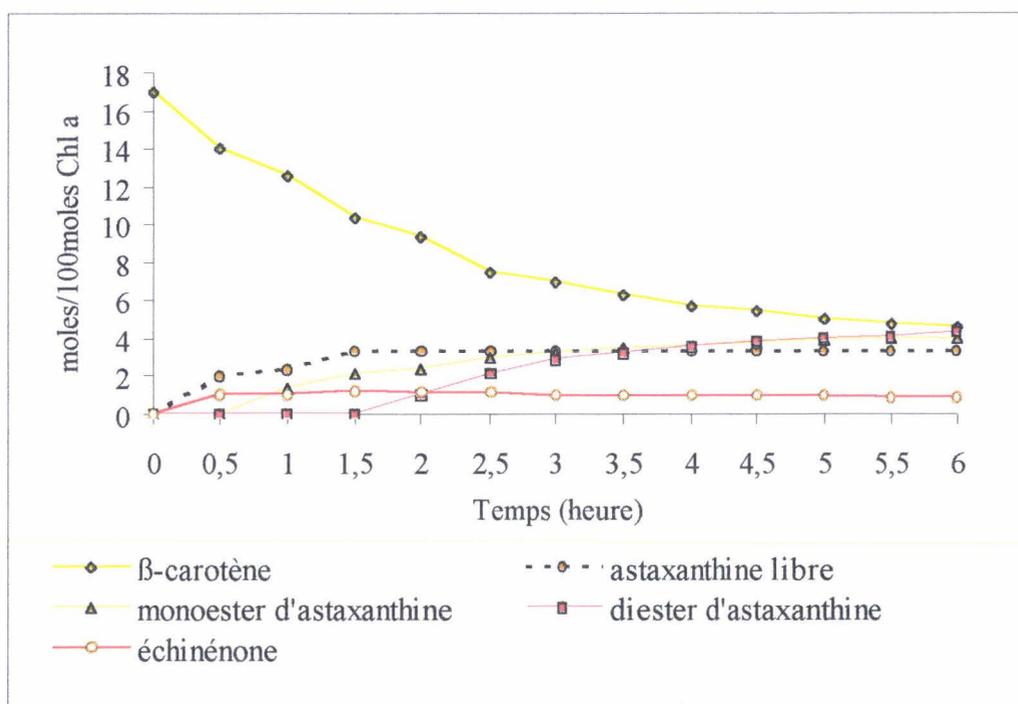


Figure 62 : Evolution du β -carotène et des caroténoïdes secondaires chez *H. puvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Chloramphénicol ($n=6$).

3 - Ellipticine

Rappelons que cette molécule inhibe l'activité de la monooxygénase en empêchant le transfert d'électrons de la cytochrome P450-réductase au P450 (Lemaire & Livingstone, 1995). Nous avons prolongé cette expérience plus longtemps que les autres études réalisées avec les inhibiteurs de la synthèse protéique afin de tenter de suivre l'évolution de l'échinénone et de la canthaxanthine et espérer détecter d'autres intermédiaires de synthèse d'astaxanthine.

a : Evolution de la biomasse

Au cours du stress en présence d'Ellipticine les variations des absorptions à 760 nm et 678 nm (Fig. 63) sont comparables à celles de la biomasse algale (Fig. 64). Les courbes des variations des masses de matière fraîche et de matière sèche montrent une légère augmentation durant l'incubation à la faible lumière ($20 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) suivie d'une décroissance pendant tout le stress. Cette baisse s'accroît après 19 heures d'illumination. La chute du poids frais est plus accentuée que celle du poids sec.

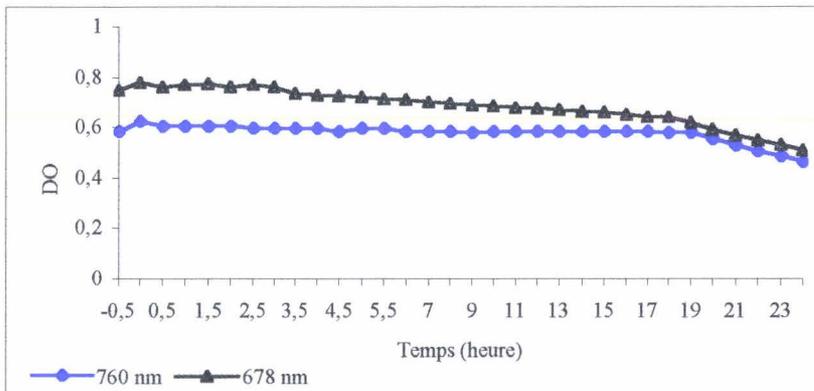


Figure 63 : Suivi des absorbances 760nm et 678 nm d'une suspension cellulaire d'*H. phuvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu\text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence d'Ellipticine (n = 2).

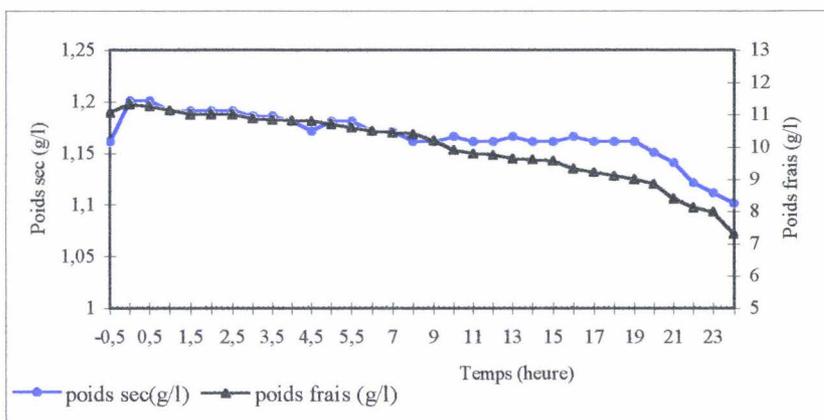


Figure 64 : Variations de masses de matière fraîche et de matière sèche d'une suspension cellulaire d'*H. phuvialis* au cours d'un stress lumineux en présence d'Ellipticine (n = 2).

b : Variation de la teneur en pigments

- le cycle des xanthophylles

Dès le début de l'exposition des algues à un stress lumineux On observe une forte décroissance de la teneur en violaxanthine qui passe de $8,02 \pm 0,42$ à $1,99 \pm 0,52$ moles pour 100 moles de Chl a (Fig. 65). Cette baisse est très importante durant les 3 premières heures. La teneur en anthéroxanthine, détectée après 30 min de stress, augmente rapidement pendant les deux premières heures d'illumination et atteint une valeur de $2,33 \pm 0,42$ moles/100 moles de Chl a à l'issue de 3 heures de stress ce qui correspond à 29 % de la teneur initiale en violaxanthine. La quantité de zéaxanthine, détectée après 60 min d'exposition à la lumière, augmente également d'une manière très rapide entre le début et 5 h d'éclairement et représente alors $3,6 \pm 0,62$ moles/100 moles Chl a. A la fin de l'expérience on assiste à une baisse de la teneur de ces xanthophylles due certainement à une photodestruction imputable au stress prolongé. Le taux de dé-époxydation (DR%) augmente très rapidement durant les 6 premières heures de l'expérience à l'issue desquelles il atteint 74,68 %. Par la suite ce taux se stabilise excepté à la fin du stress où on observe une légère augmentation imputée à la dégradation de tous les pigments (Fig. 66)

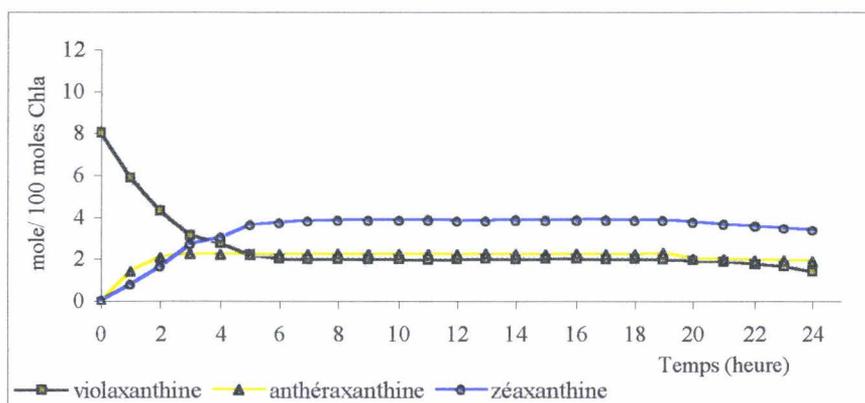


Figure 65 : Evolutions des teneurs en pigments du cycle des xanthophylles au cours d'un stress lumineux en présence d'Ellipticine (n = 2).

En présence de cet inhibiteur et durant le stress lumineux le taux de dé-époxydation est proche de celui du témoin et atteint une valeur de 75,50% sauf durant les 2 dernières heures où il augmente (78,80%) en raison de la dégradation des pigments.

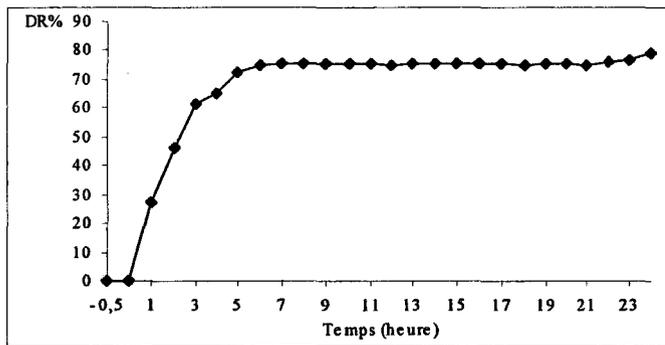


Figure 66 : Evolution du taux de dé-époxydation de la violaxanthine (DR%) au cours d'un stress lumineux en présence d'Ellipticine (n = 2).

- les chlorophylles

Le rapport Chl a/ Chl b croit de façon importante durant les 2,5 premières heures (Fig. 67).du stress en raison d'une baisse de la teneur en chlorophylle b (Fig. 68). Cette baisse devient par la suite très faible jusqu'à la 17^{ème} heure après laquelle on assiste à une chute simultanée des teneurs des deux chlorophylles a et b. Cette chute est plus importante entre la 17^{ème} et 21^{ème} heure du stress notamment pour la Chl a

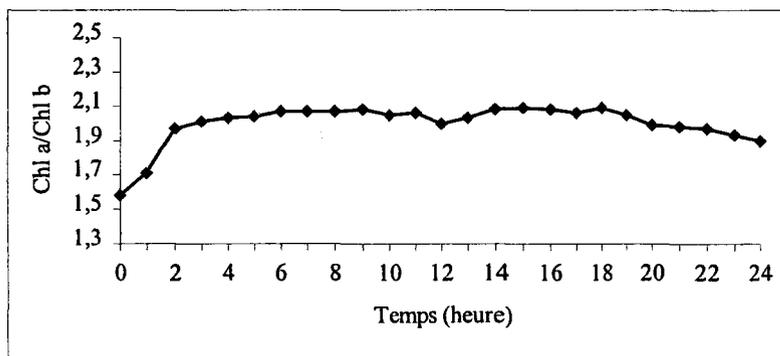


Figure 67 : Variation du rapport Chl a/ Chl b au cours d'un stress lumineux en présence d'Ellipticine (n=2).

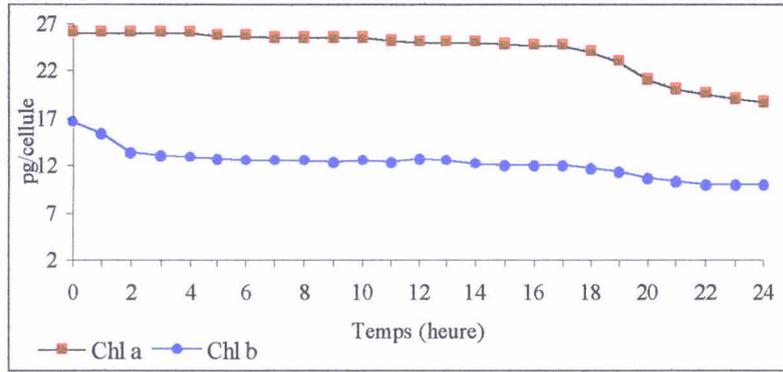


Figure 68 : Variation des teneurs en Chl a et en Chl b au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence d'Ellipticine ($n = 2$).

- les caroténoïdes secondaires

Au cours de cette expérience la teneur en β -carotène montre une forte baisse durant les 2 premières heures suivie d'une augmentation pendant les deux heures suivantes. Cette quantité reste stable durant la reste de l'exposition à la forte lumière. Toutefois on assiste à une légère baisse au cours des 4 dernières heures, comme pour les xanthophylles, dûe certainement à la photodégradation.

Les deux caroténoïdes secondaires qui apparaissent pendant cette expérience sont l'échinénone et la canthaxanthine. Au cours des deux premières heures, l'évolution des teneurs de l'ensemble de ces deux céto-caroténoïdes est complémentaire de celle du β -carotène (Fig. 69). Au delà de 19 h de fort éclaircissement les teneurs en échinénone et en canthaxanthine montrent une légère baisse comme le β -carotène.

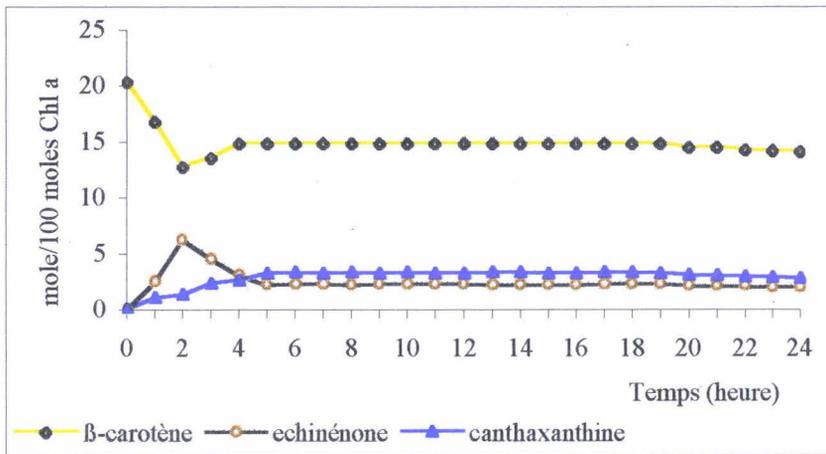


Figure 69 : Evolution des teneurs en β -carotène et en échinénone au cours d'un stress lumineux de 24 h ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence d'Ellipticine ($n = 2$).

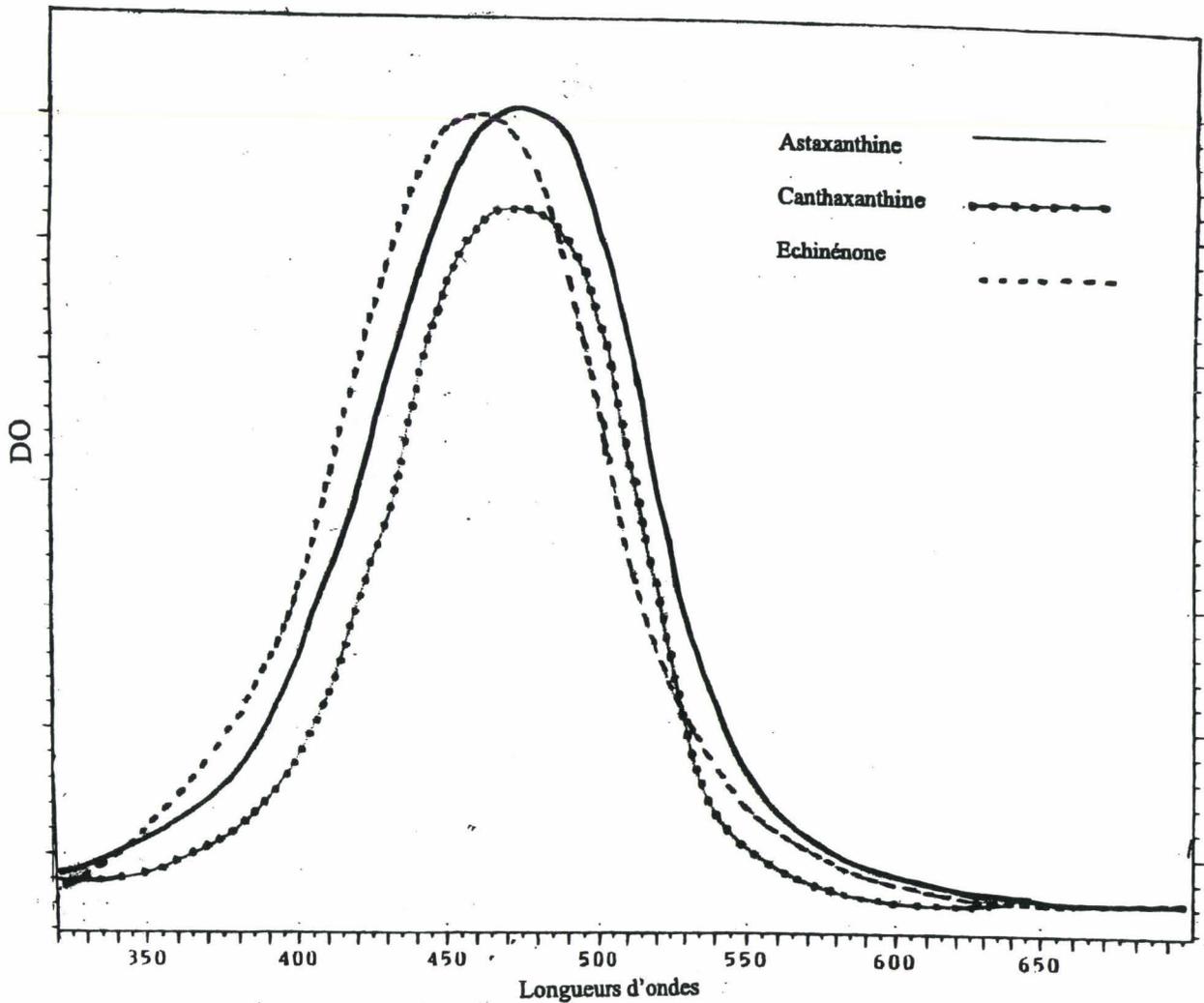


Figure 70 : Spectres d'absorption d'astaxanthine, de canthaxanthine et d'échinénone possédant des maxima respectifs à 478 nm, 474 nm et 461 nm.

4 - Norflurazon 25 µg/ml

Cette phenylpyridazinone agit par une interférence directe avec la phytoène desaturase dont elle inhibe l'activité, empêchant la transformation du phytoène en phytofluène sans agir sur la synthèse de cette enzyme (Harker & Young, 1995).

a : Evolution de la biomasse

Durant l'incubation le poids sec et le poids frais montrent une légère augmentation confirmée par la variation de DO à 760 nm (Fig. 70 et Fig. 71). Ces différentes mesures montrent de très faibles variations pendant les 6 heures de stress. Le poids sec représentait 10,75 % du poids frais au début de cette expérience et à la fin de celle-ci cette valeur devient 12,62 %.

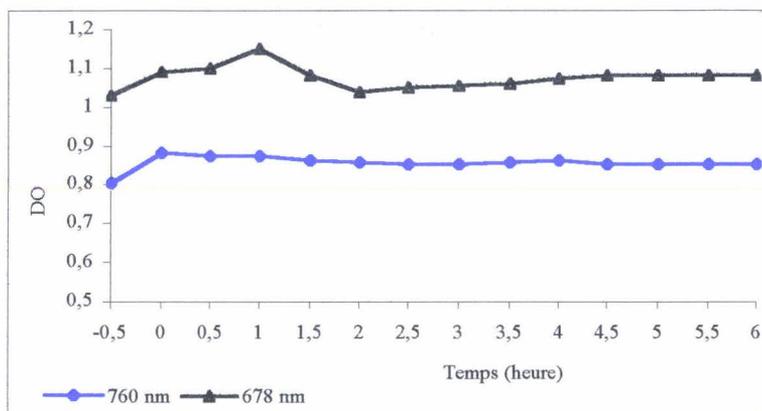


Figure 71 : Variations de l'absorbance d'une suspension d'*H. pluvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Norflurazon ($n = 6$).

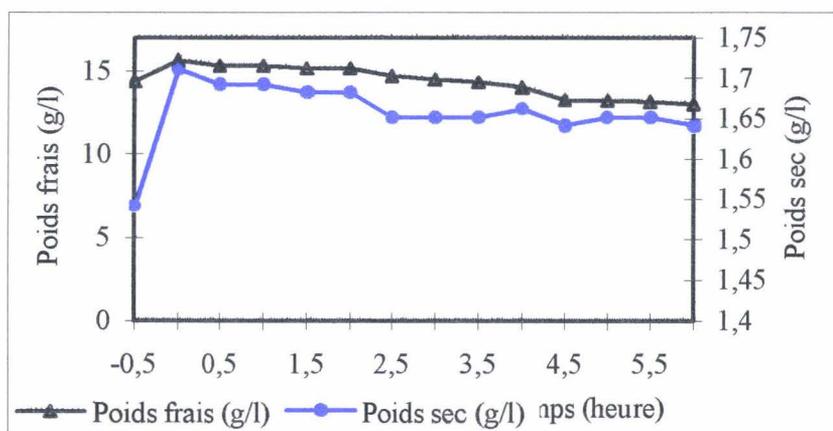


Figure 72 : Evolution de la masse fraîche et de la masse sèche d'une suspension cellulaire d'*H. pluvialis* au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Norflurazon ($n = 6$).

b : Variation de la teneur en pigments

- le cycle des xanthophylles

La teneur en violaxanthine chute de manière importante durant les 3 premières heures d'illumination. Simultanément on observe une importante augmentation de la teneur en anthéroxanthine et en zéaxanthine (Fig 73). Ces deux dernières xanthophylles sont détectées respectivement après 30 et 60 min de stress. Les teneurs en violaxanthine, anthéroxanthine et zéaxanthine restent quasiment stables au delà de la 4^{ème} heure de stress et représentent respectivement $3,20 \pm 0,56$; $2 \pm 0,42$ et $2,31 \pm 0,68$ mole/100 moles Chl a à l'issue de 6 h de stress lumineux.

Le taux de dé-époxydation (DR%) (Fig. 74) reste stable au cours des 2 dernières heures d'illumination et atteint 57,39 % à la fin de l'expérience.

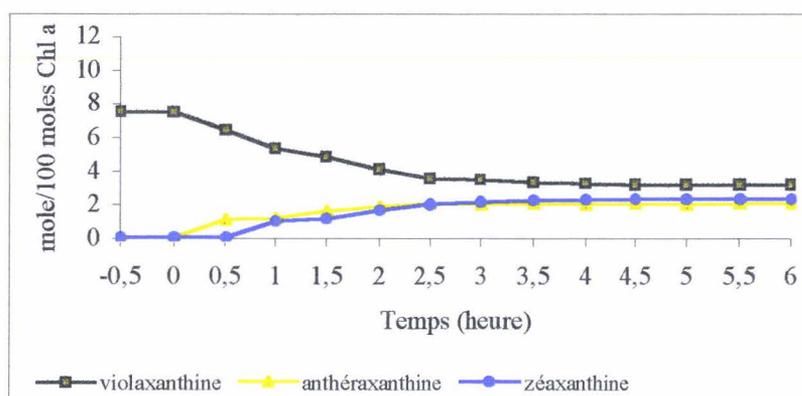


Figure 73: Evolution de la teneur des xanthophylles impliquées dans le cycle de la violaxanthine au cours d'un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence du Norflurazon ($n = 6$).

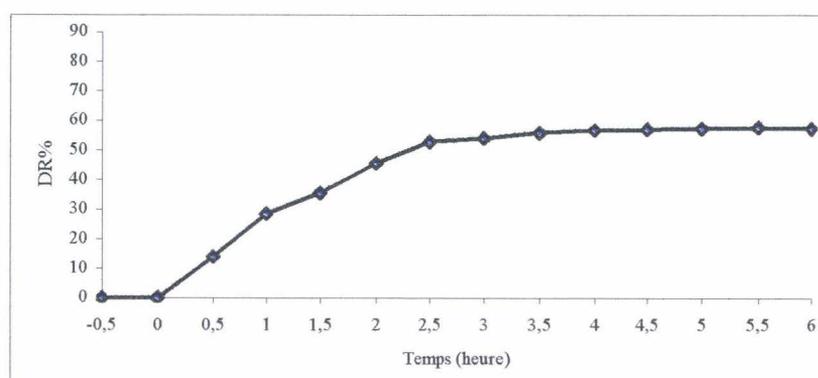


Figure 74 : Evolution du taux de dé-époxydation durant un stress lumineux ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en présence de Norflurazon ($n = 6$).

- les chlorophylles

A la différence des expériences précédemment décrites, en présence ou en absence d'inhibiteurs, le rapport Chl a/ Chl b n'augmente pas de manière importante (Fig. 75). Seule la teneur de la chlorophylle b présente une baisse au début du stress (de 0 à 3 h). alors que durant le reste du stress les teneurs de la Chl a et Chl b ne montrent qu'une très faible baisse simultanée et équivalente.

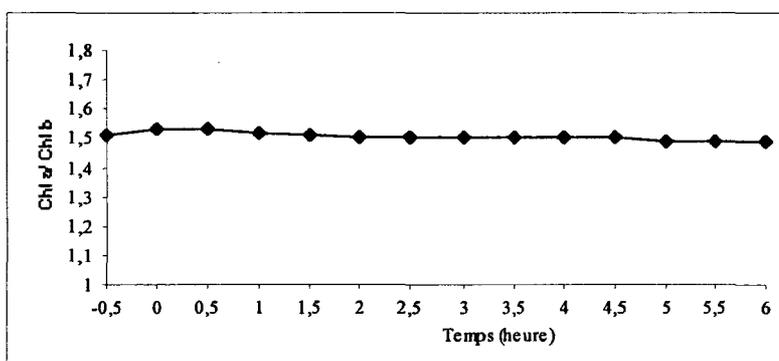


Figure 75 : Evolution du rapport Chl a/ Chl b au cours d'un stress lumineux (1100 μ moles photons.m⁻².s⁻¹) en présence de Norflurazon (n = 6).

- les caroténoïdes secondaires

La teneur en β -carotène montre une baisse rapide au cours des 4 premières heures de cette expérience (Fig. 76) et se stabilise durant la dernière heure à 4 moles/100moles Chl a. L'astaxanthine et ses esters apparaissent à des temps similaires à leur apparition en absence d'inhibiteurs. A l'issue de 6 h de stress les teneurs d'astaxanthine libre, de monoesters d'astaxanthine et de diesters d'astaxanthine s'élèvent respectivement à $3,91 \pm 0,38$, $5,19 \pm 0,71$ et $6,2 \pm 0,82$ moles/100 moles Chl a. Elles sont loin d'atteindre les teneurs de ces pigments en absence d'inhibiteur et après 6 heures de stress et qui étaient respectivement de: $8,2 \pm 0,57$; $19,65 \pm 0,95$ et $15,6 \pm 0,89$ moles/100 moles Chl a.

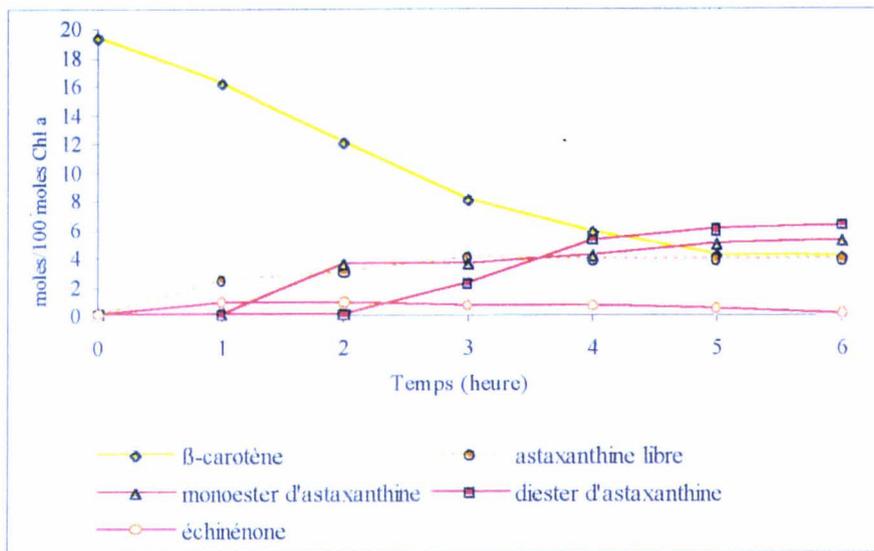


Figure 76 : Evolution du β-carotène et des cétocaroténoïdes au cours d'un stress lumineux (1100 μ moles photons.m⁻².s⁻¹) en présence de Norflurazon (n = 6).

En présence de Norflurazon nous avons détecté en CLHP l'accumulation de Phytoène indiquant un blocage de la synthèse de β-carotène suite à l'inhibition de la phytoène desaturase (Fig. 76 bis).

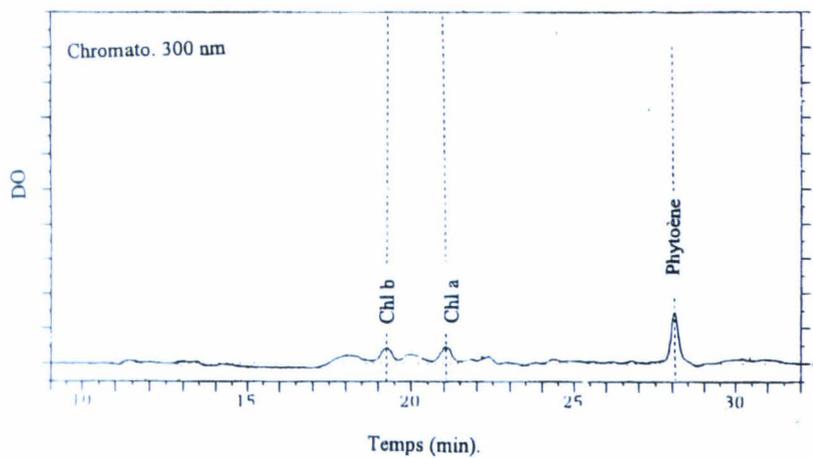


Figure 76 bis : Profil d'élution en CLHP à 300 nm de l'extrait pigmentaire d'une suspension cellulaire d'*H. pluvialis* ayant subi un stress lumineux (1100 μ moles photons.m⁻².s⁻¹) de 6 h en présence de Norflurazon.

X - Isolement des globules lipidiques extraplastidiaux

Les cellules soumises à un stress lumineux ont été prélevées toutes les 30 ou 60 min. La mesure de leur spectre d'absorption *in vivo* révèle une accumulation de caroténoïdes au cours du stress (Fig. 77 A et B). Un passage à la presse de French a permis de les casser dans le but de récupérer les globules lipidiques à la surface d'un tampon de saccharose à l'aide d'une centrifugation.

La couche lipidique récupérée est de l'ordre de 1 mm à la surface de chaque tube. Les fractions superficielles de tous les tubes sont prélevées à l'aide d'une seringue et elles sont regroupées dans un tube Ependorf. Une fraction est dosée au spectrophotomètre. Le spectre d'absorption de cette fraction est également enregistré de 350 à 700 nm. Ce spectre a toujours révélé par absorption dans le rouge, la présence d'une très faible fraction de chlorophylle associée à ces globules lipidiques (Fig. 77 C). A ce stade d'étude deux hypothèses ont été émises

- La chlorophylle détectée serait une contamination plastidiale
- Il existerait une association entre la chlorophylle et les constituants de ces globules extraplastidiaux.

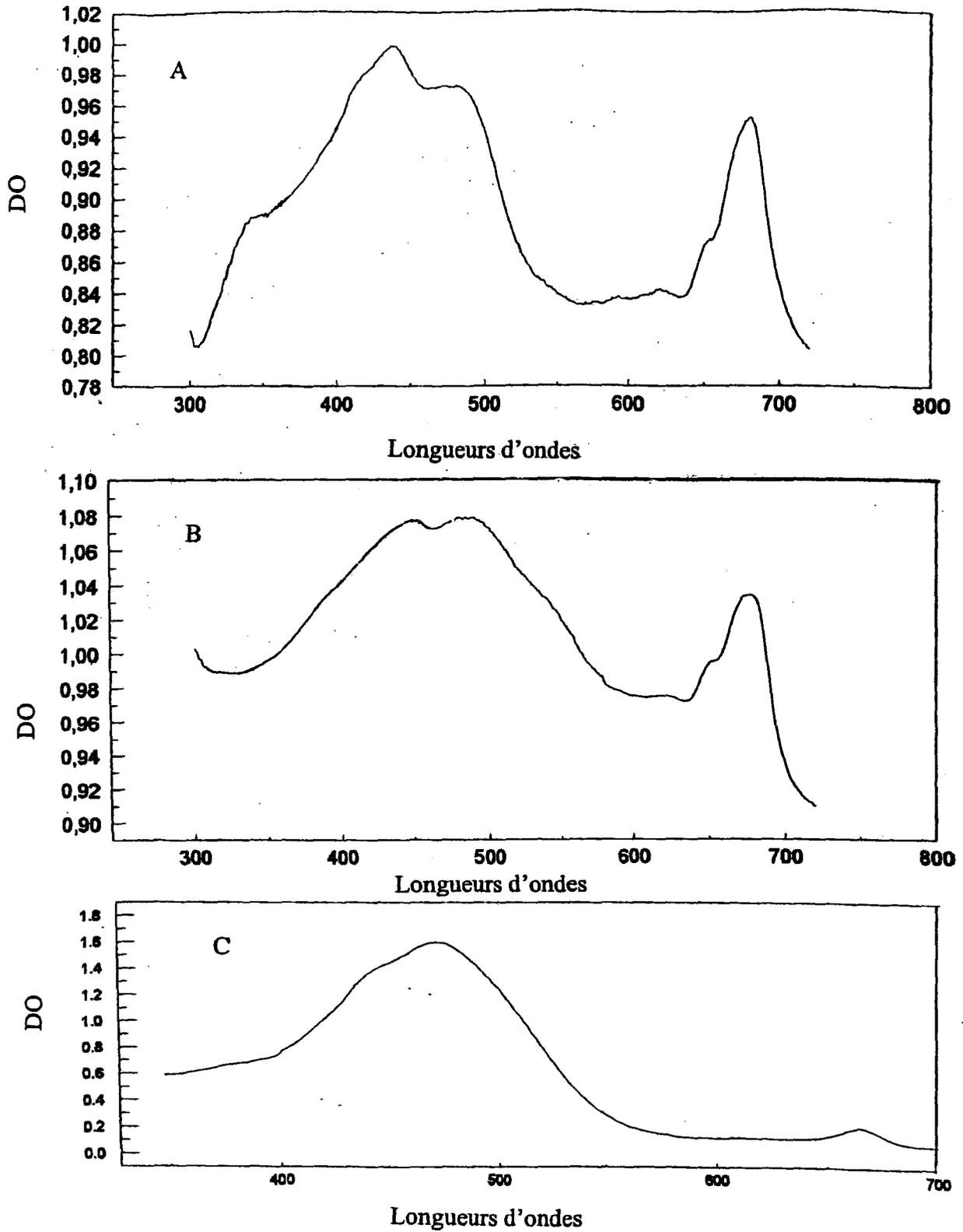


Figure 77 : Spectres d'absorption des cellules vertes flagellées (A), des cellules rouges ayant subit un stress lumineux (B) et celui de gouttelettes pigmentées (C)

XI - Etude électrophorétique

Après solubilisation par le SDS la fraction globulaire est déposée sur un gel d'acrylamide pour en faire une séparation électrophorétique en conditions non dénaturantes. Trois bandes colorées (rouges) ont ainsi pu être séparées laissant supposer l'existence de trois caroténoprotéines. Ces trois bandes migrent de manière très rapprochée (Fig. 78). Un second gel obtenu simultanément et destiné à la révélation des protéines confirme l'existence de polypeptides à l'endroit correspondant à chaque bande rouge. L'existence d'autres protéines est révélée dans ce gel. Les parties du gel contenant ces bandes colorées ont été découpées et broyées dans le méthanol. L'extrait pigmentaire correspondant à chacune des bandes est analysé par spectrophotométrie et en suite par CLHP. Les spectres d'absorption des pigments contenus dans ces trois bandes sont similaires et confirment leur nature supposée de céto-caroténoïdes (Fig. 79). Les analyses par CLHP ont permis l'identification de la nature des pigments contenus dans chacune de ces 3 bandes. En effet, en plus d'une faible teneur en Chl a retrouvée dans les trois bandes, la bande I correspond à un complexe caroténoprotéine contenant l'astaxanthine libre alors que les bandes II et III contiennent respectivement les formes estérifiées monoesters et diesters d'astaxanthine. Il est apparu également, que les trois bandes contiennent de la chlorophylle (Fig. 80).

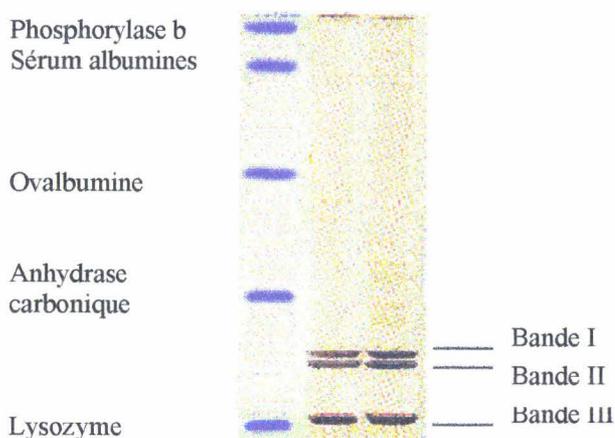


Figure 78 : séparation par électrophorèse des caroténoprotéines présentes dans les gouttelettes lipidiques d'*H. phuvialis*.

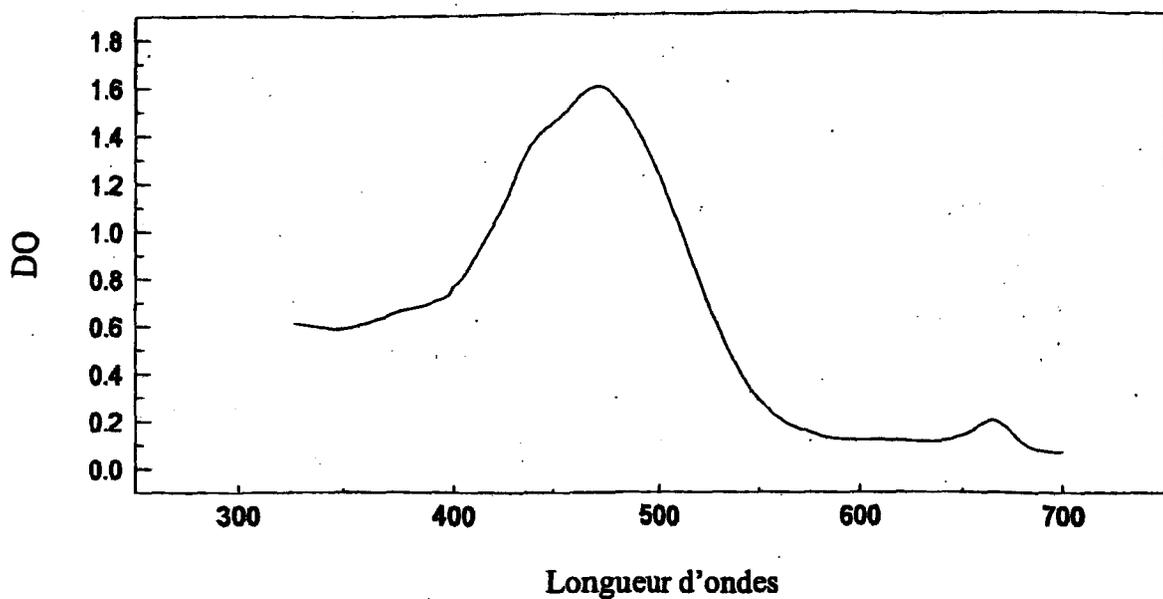


Figure 79 : Spectres d'absorption d'une bande colorée récoltée à partir d'un gel d'électrophorèse.

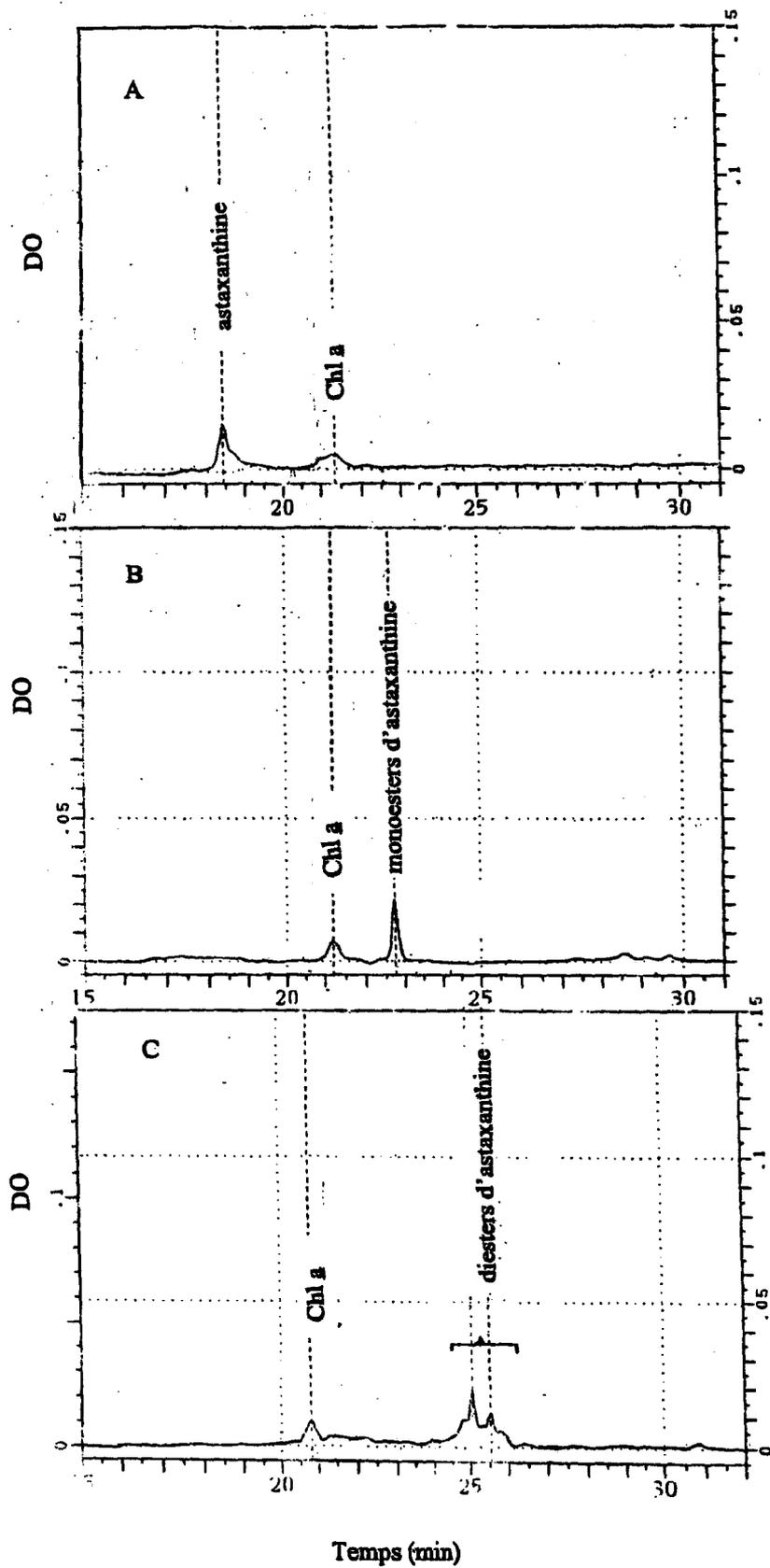


Figure 80 : Profils d'élution en CLHP à 437 nm. Analyse des 3 bandes récupérées sur le gel d'électrophorèse. A : bande I, B : bande II, C : bande III.

A l'aide du front de migration des protéines témoin dont la masse moléculaire est connue, nous avons pu déterminer les masses moléculaires apparentes de ces trois bandes. Ainsi la masse moléculaire apparente de la bande I est de 18 kDa, celle de la bande II est de 16 kDa et elle est de 9 kDa pour la bande III.

XII - Etudes des lipides contenus dans les gouttelettes extraplastidiales.

A - Nature des lipides totaux

Le tableau IV présente les teneurs en lipides des cellules vertes, des cellules enkystées et des globules extraplastidiaux extraits de kystes rouges. La teneur en lipides neutres augmente fortement au cours de l'enkystement alors que celle des lipides polaires d'origine membranaire baisse considérablement. Les globules pigmentés sont très majoritairement constitués de lipides neutres.

Tableau IV: variation relatives (%) des lipides de cellules vertes, des kystes et des globules lipidiques.

Matériel Nature Des lipides	cellules vertes	Kystes	globules pigmentés des kystes
lipides neutres (%)	24,21	65,36	81,29
lipides polaires (%)	75,79	54,64	18,71

B - Etude de la composition en acides gras

La teneur en AG totaux par rapport au poids frais de la cellule augmente au cours de l'enkystement et passe de 10,37 (% du poids frais) chez les cellules vertes à 27,18 chez les kystes (Tableau V).

Tableau V: Importance relative (%) des AG chez *H. pluvialis* dans les cellules vertes, les kystes et les globules lipidiques issues des kystes.

AG	cellules vertes	kystes	globules lipidiques des kystes
C _{16:0} (acide palmitique)	26,22	11,34	10,26
C _{16:1} (acide palmitoléique)	8,53	1,64	1,05
C _{16:2} (acide hexadécanoïque)	5,14	4,33	3,28
C _{16:3} (acide hexadécatriénoïque)	6,21	5,51	5,45
C _{16:4} (acide hexadécatétraénoïque)	6,36	5,13	3,51
C _{18:0} (acide stéarique)	4,06	3,00	3,03
C _{18:1} (acide oléique)	14,12	21,31	23,66
C _{18:2} (acide linoléique)	8,06	16,21	18,32
C _{18:3} (acide linoléique)	12,26	28,06	29,36
C _{20:0} (acide arachidique)	5,42	2,31	0,95
C _{20:1} (acide gadoléique)	3,62	1,16	1,13

L'analyse de la composition en AG détectés indique une forte augmentation de la quantité relative en AG à 18 carbones notamment l'acide linoléique (C_{18:3}) alors que les teneurs en AG en C₁₆ et en C₂₀ montrent une baisse de leur importance relative chez les kystes et dans les globules pigmentés.

Discussion

I - Cycle de vie de l'*Haematococcus pluvialis*

Le cycle de vie d'*H. pluvialis* présente les deux modes de reproduction habituellement rencontrés chez les végétaux et également chez les Chlorophycées (Lee, 1989) en l'occurrence la reproduction sexuée et asexuée. Nous n'avons observé la reproduction sexuée que trois fois. Des auteurs (Droop, 1956 ; Thompson, 1996) affirment que ce mode de reproduction peut être provoqué par des stress environnementaux (excès de lumière, stress hydrique ou appauvrissement du milieu en azote). Malgré l'application de la forte lumière nous n'avons pas pu provoquer ce mode de reproduction de façon contrôlée. Toutefois dans une observation microscopique nous avons pu observer l'accolement des gamètes identiques (reproduction isogame) La reproduction isogame est répandue chez les *Chlamydomonadaceae* tel le *Chlamydomonas* (Lee, 1989). Ces cellules sont ovales et de petite taille de l'ordre de 5 à 10 μm . L'accouplement est similaire à celui observé chez les deux autres algues vertes *Dunaliella* et *Chlamydomonas* (Lee, 1989). En effet, les deux gamètes s'accouplent par leur pôle flagellaire. D'après Droop (1956) ce phénomène est hétérothallique.

La reproduction asexuée commence par la perte des flagelles pour donner des cellules sphériques immobiles dont le volume augmente considérablement. Le cytoplasme de cette cellule se divise pour donner naissance à 8 cellules filles. Chez *Chlamydomonas* 16 cellules filles sont issues de cette division (Lee, 1989). Ces cellules filles sont libérées après rupture de la paroi de la cellules mères, se sont les individus haploïdes qui constituent les cellules végétatives.

Cette microalgue peut également se multiplier de façon végétative par scissiparité ou de manière asymétrique. Nous avons appelé ce dernier mode "bourgeonnement" parce que les cellules filles, souvent de petite taille par rapport à celle de la cellule "mère", se présentent à la manière de bourgeons. La cellule "mère" ne disparaît pas et reste pour la plupart du temps légèrement

liée aux cellules filles associées en chapelet (photo. 12). Ce mode de multiplication a été observé plus particulièrement dans les cultures en boîte de Petri.

L'*Haematococcus* adapte donc sa multiplication à l'environnement et lorsque les conditions deviennent extrêmes cette microalgues s'enkyste pour redonner des cellules végétatives au retour des conditions de culture optimales.

Dans cette étude nous avons montré l'influence d'un stress lumineux sur la morphologie et la physiologie d'*Haematococcus pluvialis*. Ce stress provoque chez ce microorganisme une modification du métabolisme des caroténoïdes se traduisant par l'accumulation d'anthéroxanthine, de zéaxanthine et d'astaxanthine et par une baisse de la capacité photosynthétique comme l'ont démontré Hagen *et al.*, (1993) chez *H. lacustris*. Dans la nature, les conditions qui engendrent un stress écophysiological sont multiples. Ce sont principalement les facteurs abiotiques de l'environnement tels que la température, l'intensité lumineuse, le stress hydrique et l'appauvrissement du milieu en éléments nutritifs notamment l'azote (Kobayashi *et al.*, 1992). Ces facteurs agissent le plus souvent de concert. Pour étudier la réponse des organismes photosynthétiques à tous ces paramètres, il est indispensable de disposer d'individus bien caractérisés se développant dans des conditions maîtrisées pouvant être modifiées à loisir, afin de simuler les variations naturelles environnementales. La culture en bioréacteur permet de satisfaire à cette condition. En effet, ce dispositif permet d'obtenir des cellules d'*H. pluvialis* vertes et biflagellées présentant des caractéristiques morphologiques et physiologiques constantes (Maillard *et al.*, 1994). L'utilisation d'un maturateur, qui permet le rougissement des cellules et qui permet de contrôler l'intensité de la lumière incidente ($1100 \mu \text{ moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et la température ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) nous offre la possibilité de provoquer un stress lumineux non photooxydatif.

II - Croissance cellulaire et production de caroténoïdes.

A- Culture non renouvelée

L'évolution de la suspension cellulaire en culture non renouvelée présente les mêmes caractéristiques que la croissance des bactéries, et on retrouve les mêmes phases régulées par

l'activation des enzymes et par la disponibilité des nutriments. La croissance est donc régulée par :

- L'intensité lumineuse (voir § suivant)
- La composition du milieu de culture et un appauvrissement de celui-ci induit un changement de morphologie et de métabolisme. En effet, lors de l'épuisement du milieu, les cellules perdent leur flagelles et leur forme devient ronde au lieu d'ovale. Cette transformation est suivie par une accumulation de caroténoïdes secondaires donnant un aspect rouge à la culture cellulaire au lieu de la couleur verte due à la chlorophylle. Cette évolution se termine par un enkystement.

Ce phénomène peut être retardé voire inhibé par l'ajout dans le milieu de nitrates et de phosphates. Toutefois une concentration importante en un élément peut accentuer cette transformation cellulaire en apportant un stress supplémentaire dû à cet excès. C'est le cas observé chez la suspension cellulaire verte lorsque la concentration du K_2HPO_4 est 2 fois supérieure à celle rapportée dans le milieu Bristol ou alors quand la concentration de KH_2PO_4 1,5 ou 2 fois plus importante que sa concentration habituellement utilisée dans le milieu Bristol. L'augmentation de la concentration en nitrates ou en phosphates à certaines concentrations favorise une meilleure croissance cellulaire et retarde l'enkystement. Nous n'avons toutefois pas apporté de modification au milieu Bristol car notre but était de préserver une production d'astaxanthine conséquente en conditions de stress lumineux. Ces résultats pourraient néanmoins être mis à profit dans le but d'améliorer la production d'astaxanthine en adoptant une culture en deux étapes comme le propose Gong & Chen, (1997) pour *H. pluvialis*. Cette culture en deux étapes a été réalisée, dans le cas de *Dunaliella*, au laboratoire par Ben-Amotz, (1995). Lors de la 1^{ère} phase la microalgue est cultivée dans un milieu riche en nitrates visant à favoriser la croissance cellulaire avec un faible rapport β -carotène / Chl dans le cas de *Dunaliella* ou astaxanthine / Chl dans le cas d'*Haematococcus*. La seconde phase consiste en une dilution de la culture par un milieu sans nitrate visant à produire plus de β -carotène ou de caroténoïdes secondaires. Dans le cas de *Dunaliella*, Ben-Amotz, (1995) obtient dans cette seconde phase une quantité de β -carotène/ml 4 fois plus importante que dans la première phase et un rapport β -carotène/Chl 3 fois supérieur.

La variation des éléments du milieu de culture dans le but de l'optimisation de la culture d'*H. pluvialis* doit tenir compte des interactions de ces éléments entre eux comme le montre les travaux de Gong & Chen, (1997).

B - Stress lumineux

La disponibilité des éléments nutritifs n'est pas le seul paramètre contrôlant la croissance cellulaire d'*H. pluvialis* et la synthèse des caroténoïdes. Il faut donc tenir compte également du flux lumineux indispensable au déroulement de la photosynthèse. Ce facteur peut intervenir de façon quantitative et aussi de manière qualitative.

1 - Intensité lumineuse

a - Polymorphisme cellulaire

Les cellules subissant le stress doivent réagir vis-à-vis des conditions environnementales qui deviennent défavorables. En effet, ces cellules changent de forme et épaississent leur paroi. Cet épaississement de la paroi permet à la cellule de réduire ses échanges avec le milieu extérieur et par conséquent de ralentir le métabolisme. Le cas extrême étant l'enkystement. Ceci est confirmé par l'étude d'optimisation du milieu que nous avons menée. En effet, lors de cette expérience nous avons remarqué un effet d'addition de l'élément chimique plus rapide chez les cellules vertes (à paroi fine) que chez les cellules en début d'enkystement (à paroi épaisse).

b - Cycle des xanthophylles

Le moyen de protection contre le stress lumineux le plus courant chez les végétaux comme chez les algues est le cycle des xanthophylles (Hager, 1980 ; Arsalane *et al.*, 1994 ; Gilmore, 1997). Comme nous l'avons vu précédemment c'est un mécanisme qui permet d'accroître la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur. Il consiste en la dé-époxydation de la violaxanthine surtout présente au niveau de l'antenne LHCII, en anthéroxanthine puis en zéaxanthine.

En effet, lors du stress lumineux la teneur en violaxanthine montre une chute importante notamment dans les quatre premières heures période pendant laquelle la teneur en anthéroxanthine et en zéaxanthine montre une élévation importante. Une partie de la teneur initiale en violaxanthine n'est pas transformée en zéaxanthine via l'anthéroxanthine (12,37 %) laquelle pourrait être une fraction intégrale de la membrane et aurait un rôle structural (Paulsen pour revue, 1995).

Le déroulement du cycle des xanthophylles chez *H. pluvialis* en présence des inhibiteurs étudiés, même si son ampleur est réduite, montre que les enzymes impliquées dans celui-ci existent avant le traitement lumineux. Ce résultat est conforté par les travaux réalisés sur des végétaux supérieurs. En effet, Pfündel & Strasser, (1988) ont montré que des feuilles étiolées sont capables de réaliser cette conversion.

Contrairement à Grung *et al.*, (1992) qui ont rapporté une absence totale des caroténoïdes membranaires associées à la photosynthèse (néoxanthine et violaxanthine) chez les kystes, nous avons toujours détecté une faible quantité de ces pigments chez les cellules enkystées. La faible teneur de ces caroténoïdes peut être corrélée à la faible teneur en chlorophylles (Kreimer *et al.*, 1991)

c - Caroténoïdes secondaires

Une des stratégies de certaines microalgues pour lutter contre le stress environnemental est l'accumulation des caroténoïdes secondaires (Kobayashi *et al.*, 1993 ; Thompson Jr., 1996). La teneur en β -carotène baisse fortement pendant les 4 premières heures de stress. Pendant cette période la teneur en astaxanthine libre et ses formes estérifiées augmente. Ceci permet de proposer qu'il existe une conversion indirecte du β -carotène en astaxanthine. Durant le reste du stress on assiste à une néosynthèse du β -carotène mais surtout à une augmentation spectaculaire des formes estérifiées d'astaxanthine. Ceci suggère que cette néosynthèse est continuellement accompagnée d'une conversion active du β -carotène en astaxanthine. L'accumulation de ce céto-caroténoïde chez *Haematococcus* dans les cellules rondes a été considérée comme un simple stockage de métabolites secondaires en vue d'une utilisation dans la première phase de croissance (Borowitzka *et al.*, 1991 ; Boussiba & Vonshak 1991). Ultérieurement des études ont suggéré que

cette accumulation sous une forte lumière joue d'abord un rôle photoprotecteur chez cette microalgue (Lee & Ding, 1992).

La canthaxanthine n'a été détectée que de façon sporadique et à faible concentration. Fraser *et al.*, (1998) ont rapporté que *In vitro* en présence des enzymes de biosynthèse d'astaxanthine, le fait d'ajouter aux substrats caroténoïdiques des lipides avant de rajouter un détergent favorise la transformation totale en astaxanthine sans accumulation de canthaxanthine. Par contre lorsque l'ordre d'ajout des éléments est inversé (détergent avant les lipides) le taux cette conversion devient plus faible et favoriserait plutôt la transformation de ces substrats en canthaxanthine. L'apparition de canthaxanthine dans nos analyses de façon rare et irrégulière pourrait être due à un détachement des substrats caroténoïdiques lors des extractions entraînant une conversion en dehors de ces globules lipidiques et menant par conséquent à la canthaxanthine.

L'accumulation des caroténoïdes secondaires se fait en dehors du plaste et cela nécessite l'exportation de ces produits finaux ou de leur précurseur qui est le β -carotène du chloroplaste vers le cytoplasme. Harker & Young, (1995) ont observé au microscope l'accumulation du β -carotène dans des globules lipidiques similaires en structures et en distribution à ceux contenant l'astaxanthine. Cette accumulation du β -carotène a été obtenue en provoquant un stress après avoir introduit la Diphenylamine dans une suspension cellulaire d'*H. pluvialis*. Par contre Vechtel *et al.*, (1992) ont rapporté l'accumulation, en plus du β -carotène, de caroténoïdes secondaires (canthaxanthine, astaxanthine et échinénone) dans les complexes chlorophylleprotéine LHCI du PSI. Le site de la transformation du β -carotène en astaxanthine pourrait en ce cas être intrachloroplastique.

2 - Qualité de la lumière

La lumière rouge permet d'avoir un rougissement plus important que celui de la lumière bleue alors que la lumière verte ne provoque que peu d'accumulation de cétopcaroténoïdes. Certains auteurs (Yong & Lee, 1991 ; Hagen *et al.*, 1994) supposent que les cétopcaroténoïdes accumulés suite à un stress protègent l'appareil photosynthétique en absorbant la zone bleue de la lumière incidente. Rappelons que la lumière bleue permet d'optimiser la photosynthèse avec par exemple une augmentation de 30% chez *Chlorella kessleri* (Grotjohann *et al.*, 1992). Elle active également les enzymes photosensibles telles que les isomérasés et les oxydoréductases qui sont

en partie responsables de la formation du géranyl-géranyl diphosphate et du β -carotène (De Fabo, 1980). Les radiations rouges provoquant une accumulation des cétocaroténoïdes permettent de supposer que la capture de la lumière par la chlorophylle est suffisante pour provoquer cette caroténogénèse, c'est le cas observé chez *D. bardawil* (Ben-Amotz & Avron, 1989). Notre résultat est partiellement en accord avec celui rapporté chez *H. lacustris* par Hagen *et al.*, (1994). Ces auteurs ont rapporté que la lumière bleue provoque la synthèse des caroténoïdes secondaires et que cette zone du spectre lumineux possède une action photoinhibitrice plus importante que celle des radiations rouges.

III - Utilisation d'inhibiteurs

A - Chloramphénicol et Cycloheximide

Aucun cétocaroténoïde n'est accumulé durant le stress lumineux en présence de Cycloheximide indiquant que la biosynthèse d'astaxanthine est affectée par l'inhibition de la synthèse des protéines cytoplasmiques. Des résultats analogues durant un stress environnemental en présence de la Cycloheximide ont été rapportés par plusieurs auteurs chez des microalgues vertes : *Haematococcus* (Kobayashi *et al.*, 1993), *Dunaliella* (Lers *et al.*, 1990 ; Shaish *et al.*, 1991) et *Chlamydomonas* (Trebst & Soll-Bracht, 1996). La quantité de β -carotène en présence de Cycloheximide reste stable ce qui traduit une incapacité de sa transformation en caroténoïdes secondaires. L'absence de néosynthèse de β -carotène dans ces conditions (stress lumineux en présence de Cycloheximide) laisse penser à l'existence d'un contrôle du type turn-over lorsque sa conversion en cétocaroténoïdes est inhibée. Cette néosynthèse a été observée durant l'expérience témoin.

L'absence d'accumulation de cétocaroténoïdes en présence de cet inhibiteur est due à l'impossibilité de la synthèse d'enzymes nécessaires à la conversion du β -carotène en cétocaroténoïdes. Ceci implique d'une part que la synthèse de ces enzymes est induite par le stress et d'autre part que le lieu de la transformation du β -carotène en astaxanthine est le cytoplasme puisque la Cycloheximide inhibe la synthèse de protéines cytoplasmiques (Kobayashi *et al.*, 1993). Cette inhibition par la Cycloheximide n'empêche pas l'enkystement des cellules d'*H. pluvialis* (Kobayashi *et al.*, 1993).

La présence du Chloramphénicol (50 µg/ml) n'empêche pas totalement la biosynthèse des caroténoïdes secondaires au cours du stress lumineux. Si la néosynthèse de caroténoïdes n'a plus lieu, la conversion du β-carotène préexistant en astaxanthine n'est pas inhibée. Ce résultat est en accord avec l'observation par Kobayashi *et al.*, (1993) d'une synthèse d'astaxanthine en présence de Chloramphénicol. Néanmoins ces auteurs ne donnent aucune précision sur l'ampleur de la synthèse obtenue dans ces conditions. On retrouve donc les mêmes caroténoïdes secondaires qu'au cours de l'expérience témoin (astaxanthine libre et ses esters et échinénone). Toutefois les teneurs de ces caroténoïdes en présence du Chloramphénicol sont différentes de celles observées en absence de cet inhibiteur. La baisse de la teneur en β-carotène est équivalente à celle de l'ensemble des cétocaroténoïdes qui apparaissent ce qui indique que le β-carotène préexistant est initialement le précurseur de l'astaxanthine confirmant ainsi les résultats de l'expérience témoin (matériel et méthode § VIII -B). Aucune néosynthèse de β-carotène n'est observée en présence de Chloramphénicol. Cette molécule inhibe la traduction des ARN messagers au niveau des ribosomes chloroplastiques (Margulies, 1962). Bien que les gènes codant pour la synthèse des caroténoïdes soient nucléaires (Fraser *et al.*, 1997), cette inhibition de la néosynthèse de β-carotène par le Chloramphénicol montre qu'un point de régulation de cette synthèse nécessite une traduction au niveau chloroplastique. L'ARN messager en cause peut néanmoins être éventuellement synthétisé par le noyau et importé dans le plaste pour y être traduit (Buetow, 1982). L'activation post-traductionnelle de la synthèse de caroténoïdes par un stress oxydatif en présence de Cycloheximide, mise en évidence par Kobayashi *et al.*, (1993) vient conforter de telles hypothèses. Par ailleurs ces observations sont en accord avec les résultats de Lers *et al.*, (1990) qui n'observent pas d'accumulation de β-carotène chez *Dunaliella* subissant un stress lumineux en présence de Chloramphénicol.

La présence du Chloramphénicol et de la Cycloheximide provoque la baisse du poids frais sans induire une baisse de la quantité de cellules. Cette baisse due à celle du contenu cellulaire est provoquée par l'inhibition de synthèse protéique notamment d'enzymes. Trebst & Soll-Bracht, (1996) ont rapporté chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une forte réduction, qui peut être totale, de l'activité photosynthétique du PSII. Malgré cela le cycle des xanthophylles continue à se dérouler mais le taux de dé-époxydation (DR%) est plus faible que celui observé en absence d'inhibiteur. Le déroulement du cycle des xanthophylles en présence de ces inhibiteurs montre que les enzymes nécessaires à son déroulement existent avant le stress. sous le fort éclaircissement et suite à

l'introduction de ces inhibiteurs dans le milieu de culture, on aurait pu s'attendre à une rapide photoinhibition et une photodégradation en conséquence à ce stress supplémentaire mais ce n'était pas le cas. Trebst & Soll-Bracht, (1996) ont constaté chez *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de ces deux inhibiteurs, un retard dans la dégradation de la protéine D1 impliquée dans la photoinhibition alors qu'en absence de ces inhibiteurs cette protéine du PSII est continuellement dégradée et resynthétisée. Ce résultat a été également décrit par Kim *et al.*, (1993) chez *Dunaliella salina*.

B - Ellipticine

L'activation d'activités enzymatiques par des radicaux oxygène a été démontrée dans le cas des glutathion-transférases de foie de rat (Murata *et al.*, 1990). De même Kobayashi *et al.*, (1993) ont provoqué chez *H. pluvialis* l'accumulation d'astaxanthine par les formes activées d'oxygène (H_2O_2 , HO^\bullet , 1O_2 , O_2^\bullet) ce qui laisse penser que la biosynthèse d'astaxanthine peut être régulée par les formes activées d'oxygène produites par un stress environnemental oxydatif ou par le cytochrome P450. La synthèse d'astaxanthine pourrait ainsi être considérée comme jouant un rôle antioxydant comme Lichtenthaler & Schindler, (1992) le proposent pour la zéaxanthine lors du fonctionnement du cycle des xanthophylles. Ainsi, l'inhibition de la biosynthèse d'astaxanthine que nous avons observée sous l'action de l'Ellipticine qui se lie entre Fe^{3+} -P450 et P450R (Lemaire et Livingstone, 1995) montre que cette biosynthèse doit nécessiter l'intervention de monooxygénases à cytochrome P450.

En présence de cet inhibiteur et durant les 4 premières heures, la chute de la teneur en violaxanthine est très rapide et se fait de façon linéaire alors qu'en absence d'Ellipticine l'appauvrissement en cette xanthophylle se fait moins rapidement et de façon sigmoïde. Contrairement à la grande activité du cycle des xanthophylles pendant le début du stress, en présence d'Ellipticine, la biosynthèse d'astaxanthine est bloquée au niveau de la canthaxanthine. La chute de la teneur en β -carotène est équivalente à l'augmentation de celle de l'ensemble de l'échinénone et de la canthaxanthine. Cela suppose que la cétonisation du β -carotène a pu se faire pour donner l'échinénone puis la canthaxanthine alors que l'hydroxylation de ces deux céto-caroténoïdes n'a pas pu se faire. Dans ce cas l'Ellipticine affecterait directement ou indirectement

l'activité de la 3,3'-hydroxylase sans affecter -ou seulement partiellement- celle de la 4,4'-oxygénase. L'utilisation de Tetcyclacis, inhibiteur spécifique de la monooxygénase, empêche cette conversion (Chumpolkulwong *et al.*, 1997). Ces auteurs n'ont pas précisé s'il y a accumulation ou non d'échinénone et de canthaxanthine. Grunewald *et al.*, (1997) ont décrit chez *H. lacustris*, en présence de diphénylamine (DPA) une accumulation d'échinénone et de canthaxanthine sans accumulation ni d'astaxanthine ni des autres intermédiaires de sa biosynthèse. Ces auteurs ont rapporté que le degré d'accumulation d'échinénone et de canthaxanthine en présence de DPA est fonction de la concentration de cet inhibiteur et qu'une faible concentration de DPA serait la plus favorable à cette accumulation notamment celle de la canthaxanthine. Selon ces auteurs, la DPA inhibe les deux enzymes de biosynthèse d'astaxanthine mais la 3,3'-hydroxylase serait plus sensible à cette inhibition que la 4,4'-oxygénase. Ces auteurs attribuent cette variation d'effet de la DPA suivant sa concentration à une variation de la spécificité de son site d'action. Harker & Young, (1995) ont rapporté qu'une forte concentration en cet inhibiteur provoque une inhibition totale de la biosynthèse d'astaxanthine avec une accumulation de phytoène. L'inhibition totale de la 3,3'-Hydroxylase par l'Ellipticine au moment où la 4,4'-oxygénase reste au moins partiellement active pourrait s'expliquer par un mécanisme similaire à celui proposé pour la DPA. Hagen *et al.*, (1993) ont rapporté l'inhibition de l'accumulation de caroténoïdes secondaires chez *H. lacustris* par l'addition de Tetcyclacis dans le milieu. Ceci suggère que le cytochrome P450 dépendant de la monooxygénase peut être impliqué dans cette catalyse. (Sandmann & Bramley ,1985; Fraser *et al.*, 1998). L'action de l'Ellipticine au niveau du P450 expliquerait cet arrêt de la biosynthèse d'astaxanthine au niveau de la canthaxanthine en inhibant donc la 3,3'-hydroxylase responsable de la transformation de ce caroténoïde en adonirubine puis en astaxanthine. Deux questions restent posées :

- pourquoi cet inhibiteur serait néfaste à cette enzyme sans affecter la 4,4'-oxygénase responsable de la conversion du β -carotène en échinénone puis en canthaxanthine ?
- pourquoi, en présence d'Ellipticine, la teneur en échinénone et en canthaxanthine s'arrête très rapidement d'augmenter et celle du β -carotène de baisser ? Cette transformation serait- elle sous un contrôle Feed-back ?

C - Norflurazon

En présence du Norflurazon le β -carotène baisse linéairement pendant les 4 premières heures. Une partie du β -carotène n'est pas transformée en cétocaroténoïdes, Cette fraction qui représente 20,82 % pourrait pour partie correspondre au β -carotène associé aux centres réactionnels du PSII. La quantité d'astaxanthine libre et ses formes estérifiées reste constante et faible du fait que le Norflurazon inhibe toute néosynthèse de caroténoïdes sans affecter ceux existant avant le traitement (Young & Britton, 1990). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Harker & Young, (1995) qui observent une faible accumulation des caroténoïdes secondaires chez *H. pluvialis* en présence de Norflurazon. Par contre, Grünewald *et al.*, (1997) ont rapporté l'absence de toute accumulation de caroténoïdes secondaires en présence du Norflurazon chez *H. lacustris*. Dans cette expérience nous n'avons pas mis en évidence une accumulation importante de phytoène simultanée à la baisse du β -carotène comme il a été démontré par Ben-Amotz *et al.*, (1987) chez *Dunaliella bardawil*. En présence du Norflurazon, nous avons détecté du phytoène dans une proportion de 10% des caroténoïdes totaux alors que Harker & Young, (1995) ont rapporté une proportion de 60%. La quantité relativement faible du phytoène que nous avons obtenue est dûe probablement à sa rapide dénaturation (Harker & Young, 1995). L'introduction du Norflurazon dans le milieu de culture semble affecter le cycle des xanthophylles. En effet, le taux de dé-époxydation reste faible (57 %) alors que cette valeur est 65% en absence de cet inhibiteur. Ben-Amotz *et al.*, (1988) ont rapporté que les suspensions cellulaires de *Dunaliella bardawil*, en présence du Norflurazon, sont rapidement photoinhibées et même photodégradées. Le β -carotène est le précurseur de la biosynthèse d'astaxanthine. Bien que cette synthèse se produise initialement à partir du β -carotène surtout dans le chloroplaste, l'action de la Cycloheximide semble prouver que cette transformation a lieu dans le cytoplasme. Harker & Young, (1995) ont rapporté chez *H. pluvialis* et en présence de DPA l'accumulation du β -carotène dans des gouttelettes lipidiques similaires dans la structure et la distribution à celles contenant habituellement l'astaxanthine. Cette conversion du β -carotène en cétocaroténoïdes passe par des intermédiaires potentiellement multiples (Fraser *et al.*, 1997). Parmi les voies proposés par les auteurs (Harker & Hirschberg, 1997, Fraser *et al.*, 1998) la présence fréquente d'échinénone et le blocage au niveau de l'échinénone et de la canthaxanthine par l'Ellipticine nous permettent de proposer que dans nos conditions expérimentales la biosynthèse

d'astaxanthine suivrait cette voie (Fig. 80). La canthaxanthine devrait être ensuite hydroxylée en adonirubine puis en astaxanthine.

Alors qu'auparavant on pensait à une voie de biosynthèse à une seule voie d'astaxanthine (Grung *et al.*, 1992), actuellement, et grâce à la biologie moléculaire, plusieurs auteurs semblent être d'accord sur l'existence de plusieurs voies interdépendantes ainsi que plusieurs intermédiaires de biosynthèse possibles (Harker & Young, 1995; Harker & Hirsch, 1997 ; Fraser *et al.*, 1997; 1998). Toutefois ses résultats obtenus *in vitro*, se font souvent avec des intermédiaires de synthèse et des manipulations génétiques ce qui nous éloigne des réactions *in vivo* chez *Haematococcus pluvialis*. Fraser *et al.*, (1998) ont remarqué, par exemple, que la transformation de zéaxanthine en 4-cétozéaxanthine est 10 fois plus importante lorsque ce substrat est d'origine biologique plutôt que de synthèse.

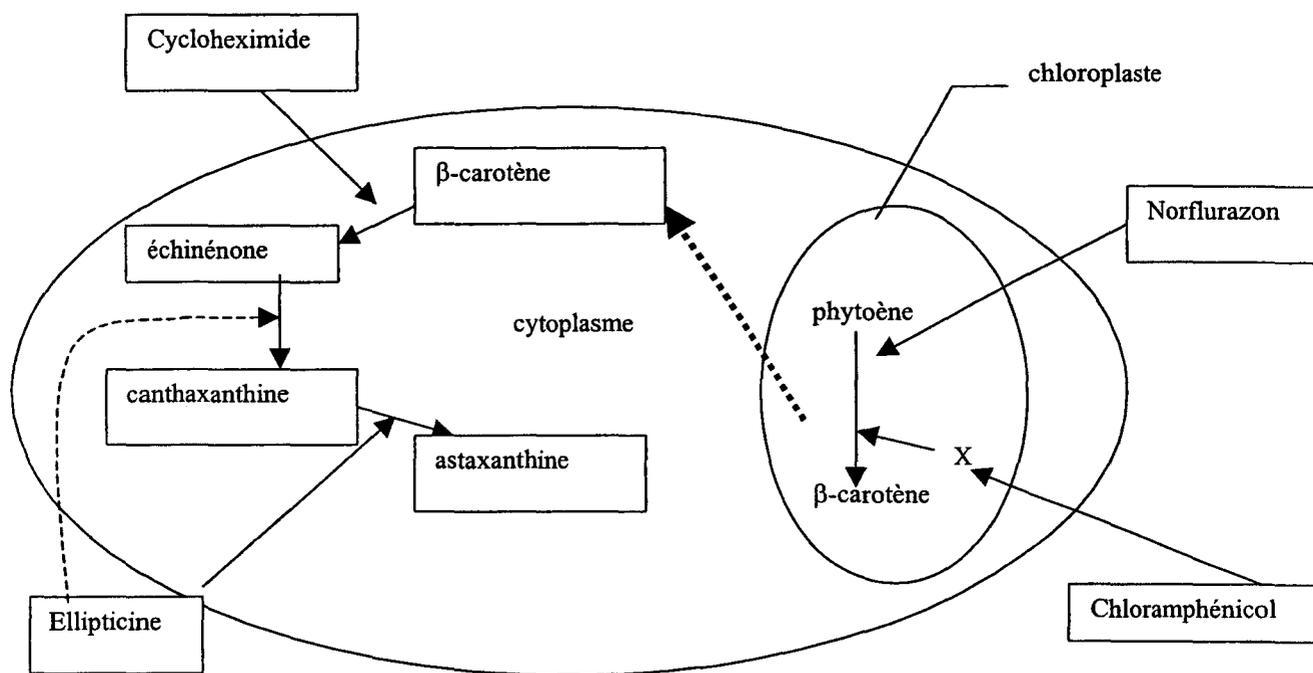


Figure 80 : Schéma récapitulatif de l'action des différents inhibiteurs utilisés. $\cdots\blacktriangleright$: export vers le cytoplasme. $---\blacktriangleright$: inhibition partielle. X : régulateur de la synthèse du β -carotène.

IV - Mesures de fluorescence de la chlorophylle au cours du stress lumineux

A - modifications de l'efficacité de la conversion énergétique.

Le rapport Fv/Fm décroît au cours des 8 premières heures de stress. Hagen *et al.*, (1994) attribuent la baisse de ce rapport chez *H. lacustris* à la photoinhibition or nous avons bien démontré par la mesure du dégagement d'oxygène, que dans nos conditions d'expériences le traitement lumineux choisit (1100 $\mu\text{moles photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) n'induit pas une photoinhibition. Toutefois, la baisse du rapport Fv/Fm traduit une baisse du fonctionnement du PSII (Demmig-Adams *et al.*, 1988). Cette baisse du rendement quantique serait compensée par l'augmentation de la lumière capturée. Dans ce cas le taux du transfert d'électrons ne change pas et par conséquent le dégagement d'oxygène reste constant malgré la baisse du rapport Fv/Fm.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii* un fort éclaircissement pendant 3 heures réduit la quantité de chlorophylle par cellule et inhibe de 50% de l'activité photosynthétique du PSII (Trebst & Soll-Bracht, 1996). Smith *et al.*, (1990) ont mis en évidence, chez les cellules de *Dunaliella salina* ayant subi un stress lumineux, l'accumulation d'unités PSII contenant à la fois les protéines des centres réactionnels et les complexes antennaires chlorophylles-protéines mais incapables de réaliser des séparations de charges photochimiques. Ce qui indique que même en absence de dégradation de la chlorophylle le déroulement du processus de photosynthèse peut être réduit en présence de stress lumineux. Cette hypothèse est confortée par l'élévation de la fluorescence initiale F_0 qui indique une altération des complexes pigments-protéines (Henley *et al.*, 1991). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Hagen *et al.*, (1994) qui décrivent une augmentation du F_0' chez *H. lacustris* durant un stress lumineux.

La chute du rapport Fv/Fm est accompagné au cours des huit premières heures du stress lumineux d'une augmentation du quenching non photochimique NPQ. Ce résultat est en accord avec celui de Hagen *et al.*, (1994) qui rapportent une élévation de ce paramètre chez les cellules rouges de *H. lacustris*.

L'élévation du NPQ est corrélée avec l'augmentation des teneurs en anthéroxanthine et zéaxanthine durant les premières heures de stress. Ce résultat est en accord avec ceux de plusieurs auteurs (Arsalane *et al.*, 1994 ; voir pour revue Gilmore, 1997).

B - altération des antennes pigmentaires

La position des 3 bandes d'émission de fluorescence à 77K est conforme à celle observée chez les algues vertes et proche de celle des végétaux supérieurs (Butler & Kitajima, 1975; Schoefs *et al.*, 1992). En effet l'émission à 681 nm est attribuée à la fluorescence du LHCI (antenne externe), celle à 697 nm est l'émission de fluorescence des antennes internes CP₄₃ et CP₄₇ alors que la bande à 715 nm est due à la fluorescence du PSI (Krause & Weis, 1991)

Les spectres d'émission de fluorescence enregistrés à 77K montrent qu'au cours du rougissement, c'est surtout l'émission de la chlorophylle *a* associée au PSI (bande d'émission à 715 nm) qui décroît fortement. Ceci traduit une altération de l'antenne de ce photosystème particulièrement riche en β -carotène (Lee & Thornber, 1995) dont nous avons constaté une forte conversion en astaxanthine (Harker & Hirschberg 1997, Fraser *et al.*, 1998). L'augmentation du rapport F_{681}/F_{715} traduit une forte altération du PSI au cours du stress lumineux. Un résultat similaire a été rapporté également chez *Dunaliella salina* par Smith *et al.*, (1990). En effet, ces auteurs ont constaté une augmentation du rapport PSII/PSI chez cette Chlorophycée au cours du stress lumineux passant de 1,4/1 chez le témoin à 3/1 chez la suspension cellulaire ayant subi un fort éclaircissement. La dégradation des photosystèmes notamment le PSI est accompagnée par la réduction de leur antennes majeures LHCI du PSI et LHCI du PSII suite à la dégradation de la Chl *b*. Rappelons que la Chl *a* et la Chl *b* se trouvent toutes les deux dans les LHC alors que dans le cœur de ces photosystèmes seule la Chl *a* est présente (Smith *et al.*, 1990). L'augmentation du rapport Chl *a*/ Chl *b* s'opérant donc lors du stress lumineux implique un changement de taille des LHC de chaque photosystème (Kim *et al.*, 1993). Ce rapport chez *H. pluvialis* soumis à un stress lumineux de 1100 $\mu\text{moles photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ passe de 1,57 à 2,9. Ce résultat est en accord avec les modalités dynamiques de l'ajustement de la taille des antennes traduites par les fluctuations du rapport Chl *a*/ Chl *b* en réaction à la variation de l'intensité de l'éclaircissement (Smith *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993; Webb & Melis, 1995; Grünwald *et al.*, 1997). En plus de l'altération du PSI, traduites par les propriétés de fluorescence, le fonctionnement du PSII est aussi réduit au cours du stress lumineux ainsi que le traduit la baisse du rapport Fv/Fm.

L'émission à 681 nm provient de l'antenne externe du PSII et son maintien confirme la protection de cette antenne par le cycle des xanthophylles. En effet, le cycle des xanthophylles est plus efficace au niveau des complexes LHCI qu'au niveau du PSI ce qui expliquerait en partie

l'importante dégradation de ce dernier. Elle est la conséquence probable d'une dégradation des complexes pigments-protéines associés à la mobilisation du β -carotène qui est utilisé comme substrat pour la biosynthèse d'astaxanthine comme le suggère les résultats de Vechtel *et al.*, (1992) chez *Eremosphaera viridis*. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, la multiplication cellulaire continue à se faire pendant les douze premières heures du stress ce qui prouve que des synthèses pigmentaires se poursuivent jusqu'à un certain degré d'altération du PSI puis s'arrêtent lorsque la dégradation de ce photosystème devient importante.

C - spectres d'excitation de fluorescence

Les spectres d'excitation de fluorescence normalisés à 440 nm montrent la présence de deux bandes dont les maxima respectifs sont voisins de 430 nm (Chl *a*) et 480 nm (Chl *b* et caroténoïdes). Ce résultat est en accord avec celui rapporté chez *Chlamydomonas* par Bidigare *et al.*, (1993). Ces auteurs ont obtenu deux bandes dont les maxima sont à 430 et 470 nm qu'ils attribuent respectivement à la Chl *a* et la Chl *b*. Les spectres d'action d'émission de fluorescence de la chlorophylle F_{681} ne montrent pas d'importantes variations au cours du rougissement ce qui traduit un transfert efficace d'énergie des antennes au PSII même après rougissement des cellules.

Par contre les spectres d'excitation de l'émission de fluorescence de la chlorophylle F_{715} confirme la dégradation du PSI. En effet, après 8h de stress la bande à 480 nm s'effondre totalement traduisant la forte réduction de transmission d'énergie vers le PSI. Cet effondrement serait dû à la dégradation de la Chl *b* comme l'ont rapporté Bidigare *et al.*, (1993) chez les cellules rouges de *Chlamydomonas*. L'effondrement de cette bande (480 nm) serait également dû à la suppression du β -carotène dont les antennes PSI sont riches (Vechtel *et al.*, 1992 ; Lee & Thornber 1995). La mesure de l'excitation de l'émission de fluorescence de la chlorophylle F_{697} montre une évolution identique à celle mesurée à 715 nm ce qui traduirait une altération du transfert d'énergie vers la chlorophylle au niveau des antennes internes du PSII (CP₄₇ et CP₄₃). L'altération du transfert entre les chlorophylles et les caroténoïdes au niveau des antennes internes du PSII pourrait s'expliquer par l'importante conversion dans ces antennes, de la violaxanthine par le cycle des xanthophylles (Ruban, 1994b). Cette réduction du transfert d'énergie vers les photosystèmes

minimise l'importance de la photoinhibition et de la photodégradation notamment par la région bleue de la lumière.

V - Etudes électrophorétiques

Nous avons toujours détecté trois bandes colorées en électrophorèse équivalentes à 3 caroténoprotéines contenant respectivement l'astaxanthine libre, les monoesters d'astaxanthine et les diesters d'astaxanthine. Ces complexes protéines-céto-caroténoïdes seraient également associés à la chlorophylle. Le fait de retrouver la chlorophylle qui migre avec le complexe caroténoprotéique écarte l'hypothèse de contamination des globules lipidique par la chlorophylle au cours des extractions. Ce résultat est en accord avec celui de Berkaloﬀ, (1977) qui a rapporté l'existence de chlorophylle dans des bandes pigmentées isolées par électrophorèse à partir de globules lipidiques de l'algue verte *Protosiphon botryoides*.

VI - Etude des lipides

La quantité de lipides totaux chez *Haematococcus pluvialis* augmente au cours de l'enkystement (Sprey, 1970) notamment les lipides neutres. C'est le cas également chez *Dunaliella* (Ben-Amotz *et al.*, 1982). Cette augmentation de la quantité de lipides est due surtout au développement des globules pigmentés ce qui leur confère d'abord un rôle de réserve de lipides susceptibles d'être utilisés dans les premiers stades de verdissement. En effet, en plus de l'amidon, les cellules algales stockent l'énergie sous forme de triglycérides ainsi *Chlorella ellipsoidea* cultivée sous une alternance lumière-obscurité accumule des triglycérides pendant la période d'éclairement pour les utiliser comme source d'énergie lors de la période d'obscurité. (Thompson Jr., 1996). Malgré la grande dominance des lipides neutres dans les globules il reste une fraction (18,71 %) constituée de lipides polaires contenant probablement des lipides membranaires. En effet, Berkaloﬀ, (1977) a rapporté l'existence de phospholipides et de galactolipides dans les gouttelettes pigmentées chez *Protosiphon botryoides*. L'enkystement s'accompagne donc d'une augmentation importante de la quantité des lipides totaux qui est multipliée par 2,7. En effet, de façon générale la quantité des lipides augmente de 2 à 3 fois chez les microalgues qui subissent un stress environnemental (Thompson Jr., 1996). Chez *Dunaliella*, Mendoza *et al.*, (1996)

rapportent une augmentation de 11 à 24,8 % de la quantité des AG totaux au cours d'un stress thermique. Ces mêmes auteurs ont observé, lorsque la température de culture baisse (18° C au lieu de 30° C) une élévation de la teneur en acide palmitique (C_{16:0}) et en acide oléique (C_{18:1}). Chez *H. pluvialis* on observe une baisse de la teneur en acide palmitique (C_{16:0}) et une légère diminution de la teneur en acide stéarique (C_{18:0}). Ces AG subissent probablement une élongation de la chaîne carbonée et/ou une désaturation pour être incorporés dans les lipides polaires riches en AG insaturés en C₁₈. C'est le cas également chez d'autres microalgues telles que *Chlorella* (Thompson Jr. 1996) et *Chlamydomonas* (Bidigare *et al.*, 1993). Lors de l'enkystement on constate une élévation de la teneur en acide oléique (C_{18:1}), en acide linoléique (C_{18:2}) et en acide linoléinique (C_{18:3}). Cette même constatation a été faite par Bidigare *et al.*, (1993) chez *Chlamydomonas*. L'augmentation de la teneur en AG insaturés notamment en acide linoléinique confirme l'élévation de la quantité des lipides neutres puisque cet AG est abondant dans cette catégorie de lipides. Les acides gras C_{20:0} (acide arachidique) et C_{20:1} (acide gadoléique) sont en faible quantité relative chez les cellules vertes et leur teneur baisse lors de l'enkystement ce résultat est en accord avec celui rapporté par Bidigare *et al.*, (1993). D'après Grung *et al.*, (1992) l'AG majoritaire chez les monoesters d'astaxanthine est le C_{18:1} ceci est en accord avec nos résultats montrant une élévation de la teneur relative de cet AG dans les globules pigmentés des kystes. Par contre ces auteurs démontrent aussi la présence (minoritaire) du C_{16:0}, C_{18:0} et C_{20:0} chez les monoesters d'astaxanthine alors que dans nos résultats les teneurs relatives (%) en ces AG baissent chez les kystes et dans les globules pigmentés, mais ceci n'exclut pas leur participation à l'estérification de l'astaxanthine. L'élévation de la teneur en AG insaturés suggère une augmentation de la fluidité membranaire. En effet, d'après Bidigare *et al.*, (1993) la grande fluidité membranaire explique la résistance des cellules rouges des algues "des neiges" aux basses températures. D'après ces auteurs les lipides occupent une importante partie du grand volume cellulaire et réduisent ainsi la quantité d'eau et par conséquent minimisent le risque de rupture par les cristaux de glace. L'augmentation de la quantité des lipides non membranaires suggère une lyse des membranes chloroplastiques associée à la dégradation fonctionnelle des plastes lors de l'enkystement. Cela est en accord avec l'observation de la fragmentation du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire chez *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque cette Chlorophycée subit un stress dû à la déficience du milieu en azote (Thompson Jr, 1996). Ce même résultat a été rapporté par Vechtel *et al.*, (1992) chez *Eremosphaera viridis*. Par ailleurs, il

a été démontré chez *Dunaliella salina* que les hydrolases responsables du catabolisme du MGDG deviennent plus actives sous ce même stress (Thompson Jr., 1996). En plus de leur rôle probable de réserve, la présence des lipides paraît indispensable à la conversion du β -carotène en astaxanthine. En effet, en absence de lipides et *In vivo*, l'activité des deux enzymes responsable de la biosynthèse de l'astaxanthine est très faible (Fraser *et al.*, 1998).

Conclusion

Cette étude démontre que les modifications physiologiques et structurales permettent à *Haematococcus pluvialis* de se développer dans des conditions d'éclairement extrêmes.

Il met en œuvre 3 systèmes de réponse à un stress lumineux :

- déclenchement du cycle des xanthophylles
- réduction des antennes des photosystèmes notamment celle du PSI.
- accumulation de caroténoïdes secondaires spécialement les esters d'astaxanthine

L'utilisation du Chloramphénicol montre bien que dans un premier temps le β -carotène contenu dans les thylacoïdes est le précurseur de la biosynthèse d'astaxanthine. Le β -carotène synthétisé dans le chloroplaste serait exporté vers le cytoplasme pour y être transformé en astaxanthine, cette conversion enzymatique étant totalement inhibée par l'utilisation de Cycloheximide. Au delà des premières heures l'accumulation d'astaxanthine nécessite une néosynthèse de caroténoïdes et des enzymes de leur biosynthèse. La biosynthèse d'astaxanthine à partir du β -carotène nécessite 2 hydroxylations et 2 cétonisations. L'utilisation d'Ellipticine et la présence fréquente d'échinénone démontre que la voie suivie dans nos conditions expérimentales passe par l'échinénone puis par la canthaxanthine.

L'accumulation d'astaxanthine se fait essentiellement sous formes estérifiées par des AG insaturés ou polyinsaturés majoritairement en C_{18} . Cette accumulation se fait dans des gouttelettes lipidiques jouant essentiellement un rôle de réserve d'énergie. Dans ces gouttelettes nous avons démontré l'existence de protéine(s) associée(s) aux pigments dont la nature reste à préciser. Il pourrait s'agir d'une association de l'astaxanthine avec des enzymes de sa biosynthèse ou responsables de l'estérification de ce caroténoïde.

L'accumulation de ces gouttelettes lipidiques se fait d'abord autour du noyau puis s'étend à la totalité du cytoplasme et jouer un rôle d'écran vis à vis de la lumière incidente et notamment de la région bleue du spectre lumineux. Ces lipides semblent jouer un rôle de réserve en vue du verdissement de la cellule accompagné de divisions cellulaires lors du retour aux conditions favorables.

Les caroténoïdes secondaires semblent être impliqués dans des complexes pigments-protéines au sein de ces fractions lipidiques.

Perspectives

Ce travail a permis de démontrer l'existence d'une association caroténoïdes-protéines au sein des fractions lipidiques ce résultat devrait être complété par l'étude et la caractérisation de ces protéines afin de trancher sur leur nature. En effet, ces protéines peuvent être simplement des protéines chloroplastiques liées aux fragments de lipides d'origine chloroplastiques ou alors des enzymes soit de conversion des caroténoïdes soit des estérases responsables de l'estérification de l'astaxanthine.

L'étude des AG qui estérifient l'astaxanthine peut être aussi approfondie en la réalisant sur des esters d'astaxanthine isolés par chromatographie liquide ou sur couche mince. Ces esters d'astaxanthine peuvent être saponifiés puis analyser séparément.

Dans le but de compléter l'étude du cycle de vie de cette microalgue on peut combiner plusieurs facteurs de stress (carence en azote, fort éclaircissement, salinité élevée ...) pour provoquer la gamétogenèse de façon contrôlée.

Par des techniques de focalisation électrique et d'électrophorèse, nous pourrions essayer d'isoler le PSI, le PSII et les LHCI et LHCII, dans le but d'analyser leur contenu en pigments par CLHP et de voir une hypothétique association de l'astaxanthine avec un des photosystèmes.

Références Bibliographiques

- Adams W.W. III. & Demmig-Adams B.** Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta* **186**: 390-398, 1992.
- Adamska I. & Kloppstech K.** Considerations on the role of ELIPs during light stress. *In*: Baker N.R. & Bowyer J.R. (eds). *Photoinhibition to photosynthesis. From molecular mechanism to the field.*, Bios. Scientific, Oxford, pp 209-224, 1994.
- Andersen R.A.** Algae. *In*: Hunter-Cevera J.C. & Belt A. (eds). *Maintaining cultures for biotechnology and industry.* Acad. Press, San Diego, 29-64, 1996.
- Andersen R.A.** Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers. Conserv.* **1**: 267-292, 1992.
- Arasalane W., Rousseau B. & Duval J.C.** Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: Competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* **60**: 237-243, 1994.
- Arvidsson P.O., Bratt C.E., Carlsson M. & Akerlund H.E.** Purification and identification of the violaxanthin deepoxidase as a 43 kDa protein. *Photosynth. Res.* **49**: 119-129, 1996.
- Bassi R., Pineau B., Dainese P. & Marquardt J.** Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* **212**: 297-303, 1993.
- Bassi R., Rigoni F. & Giacometti. G.M.** Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochem. Photobiol.* **52**: 1187-1206, 1990.
- Ben-Amotz A. & Avron M.** On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **72**: 593-597, 1983.
- Ben-Amotz A. & Avron M.** The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotechnol.* **8**: 121-126, 1990.
- Ben-Amotz A. & Avron M.** The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **25**: 175-178, 1989.
- Ben-Amotz A.** New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J. Appl. Phycol.* **7**: 65-68, 1995.
- Ben-Amotz A., Gressel J. & Avron M.** Massive accumulation of phytoene induced by Norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *J. Phycol.* **23**: 176-181, 1987.

- Ben-Amotz A., Katz A. & Avron M.** Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **18**: 529-537, 1982.
- Ben-Amotz A., Lers A. & Avron M.** Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **86**: 1286-1291, 1988.
- Ben-Amotz A., Shaish A. & Avron M.** Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.* **91**: 1040-1043, 1989.
- Berkaloff C.** Carotenoproteins in extrachloroplastic structures of the green alga *Protosiphon botryoides*. *Plant Sci. Lett.* **10**: 45-48, 1977.
- Berkaloff C.** Essai d'isolement des globules pigmentés extraplastidiaux de l'algue *Protosiphon botryoides*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **271**: 1518-1521, 1970.
- Berland B., Le champion T. & Campos Baeta Neves. M.H.** Interaction de la salinité et de la température sur la morphologie, la croissance et la composition cellulaire d'une cyanobactérie halotolérante (*Aphanothece sp.*). *Bot. Mar.* **32**: 317-328, 1989.
- Beyer P. & Kleinig H.** On the desaturation and cyclisation reactions of carotenes in chromoplast membranes. *In: Krinsky N.I., Mathews-Roth M.M. & Taylor R.F. (eds). Carotenoids: Chemistry and Biology*, Plenum, New York, pp 195-206, 1990.
- Bidigare R.R., Ondrusek M.E., Kennicutt II M.C., Iturriaga R., Harvey H.R., Hoham H.R. & Macko S. A.** Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* **29**: 427-434, 1993.
- Bilger W. & O. Björkman.** 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, 1990.
- Bilger W., & Björkman O.** Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* **184**: 226-234, 1991.
- Bjerkeng B.,** Chromatographic analysis of synthesized asthaxanthin- A handy tool for the ecologist and forensic chemist?. *Prog. Fish. Cult.* **59**: 129-140, 1997.
- Bligh E.G. & Dyer W.C.** A rapid method to total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.* **37**: 911-917, 1959.
- Bold H.C.** The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. *Bull. Torrey Bot. Club.* **76**: 101-108, 1949.
- Borowitzka L.J., Moulton T.P. & Borowitzka M.A.** Salinity and the commercial production of β -carotene from *Dunaliella salina*. *Beihefte zur Nova Hedwigia* **83**: 224-229, 1986.

- Borowitzka M.A. & Borowitzka L.J.** (eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 477, 1988.
- Borowitzka M.A.** Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* **9**: 393-401, 1997.
- Borowitzka M.A., Huisman J.M. & Osborn A.** Culture to the astaxanthin producing green algae *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* **3**: 295-304, 1991.
- Boussiba S. & Vonshak A.** Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell. Physiol.* **32**: 1077-1082, 1991.
- Braun A.** Betrachtung Über die Erscheinung in der Natur (Leipzig). Abstracted in Cooke's *Brit. Fresh Water Algae*: 51-54, 1851.
- Braune W. & Ekelund N.G.A.** Phototactic response in *Haematococcus lacustris* and its modification by light intensity and the carotenoid biosynthesis inhibitor Norflurazon. *Arch. Microbiol.* **154**: 448-452, 1990.
- Britton G, Liaaen-Jensen S. & Pfander H.** (eds). Synthesis in perspective. *In: Carotenoids. Synthesis*. Birkhäuser, Switzerland; Vol 2, pp pp 1-6, 1996.
- Britton G.** Biosynthesis of carotenoids. *In: Young A. & Britton G. (eds). Carotenoids in photosynthesis*. Chapman & Hall, London, pp 96-126, 1993.
- Britton G., Weesie R.J., Askin D., Warburton J.D., Gallardo-Guerrero L., Jansen F.J., De Groot H.J.M., Lugtenburg J., Cornad J.P., & Merlin J.C.** Carotenoid blues: Structural studies on carotenoproteins. *Pure Appl. Chem.* **69**: 2075-2084, 1997.
- Büch K., Stransky H. & Hager A.** FAD is a further essential cofactor of the NAD(P)H and O₂-dependent zeaxanthin-epoxidase. *FEBS Lett.* **376**: 45-48, 1995.
- Buetow D.E.,** Molecular biology of chloroplasts. *In: Govindjee (ed). Photosynthesis: development, carbon metabolism and plant productivity*. Acad. Press. Inc., New York, Vol II, pp 43-88, 1982.
- Butler W.L. & Kitajima M.** A tripartite model for chloroplast fluorescence. *In: Avron M. (ed). Proceedings of the 3rd International congress on photosynthesis*. Elsevier. Sci. Publ. Co., tome 1: 13-24, 1975.
- Camara B. & Monéger R.** Biosynthetic capabilities and localization of enzymatic activities in carotenoid metabolism of *Capsicum annum* isolated chloroplasts. *Physiol. Végétale*, **20**: 757-773, 1982.
- Caron L., Remy R. & Berkaloff C.** Polypeptide composition of light-harvesting complexes from some brown algae and diatoms. *FEBS Lett.* **229**: 11-15, 1988.

- Chumpolkulwong N., Kakizono T., Ishii H. & Nishio N.** Enzymatic conversion of β -carotene to astaxanthin by cell-extracts of a green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* **19(5)**: 443-446, 1997.
- Cox E.R.** (ed). *Phytophlagellates. Developments in marine biology 2.* North Holland-New York Elsevier, pp 387, 1980.
- Czegzuga B.** Characteristic carotenoids in some phyto-benthos species in the costal area of the Adreatic sea. *Acta Soc. Bot.* **55(4)**: 601-610, 1986.
- Czygan F.C. & Kalb K.** Untersuchungen zur biogenese der carotenoide in *Trentepohlia aurea*. *Z. Pflanzenphysiol.* **55**: 59-64, 1966.
- Darley W.M.** *Algal Biology: a physiological approach.* Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1982.
- Daub M.A. & Payne G.A.** The role of carotenoids in resistance of fungi to cercosporin. *Physiol. Biochem.* **79(2)**: 181-185, 1989.
- De Fabo E.** On the Nature of the Blue Light Photoreceptor: still an open question. *In*: Senger H. & Springer-Verlag A. (eds). *The blue light syndrome*, New York-Berlin, Heidelberg, pp 187-197, 1980.
- De Martino A., Douady D., Rousseau B., Duval J. C. & Caron L.** Characterization of Two Light-Harvesting Isolated from the Brown Alga *Pelvetia canaliculata*: Heterogeneity of Xanthophyll Distribution. *Photochem. Photobiol.* **66 (2)**: 190-197, 1997.
- Demmig-Adams & Adams III WW.** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plan. Physiol. Mol. Biol.* **43**: 599-626, 1992.
- Demmig-Adams B.** Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**: 1-24, 1990.
- Demmig-Adams B. Krüger K.W., & Czygan F.G.** Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.* **87**: 17-24, 1988.
- Demmig-Adams B., Winter K. Krüger A. & Czygan F.C.** Zeaxanthin and the induction and relaxation kinetics of the dissipation of excess excitation energy in leaves in 2 % O₂, 0 % CO₂. *Plant Physiol.* **90**: 887-893, 1989.
- Demmig-Adams B., Winter K., Krüger A. & Czygan F.C.** Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* **84**: 218-224, 1987.
- Droop M.R.** *Haematococcus pluvialis* and its allies. I. The Sphaerellaceae. *Rev. Algol.*,**2**: 53-71. 1956.
- Droop M.R.** *Haematococcus pluvialis* and its allies: III. Organic nutrition. *Rev. Algol.* **4**: 247-259, 1961.

- Flotow J.** Über *Haematococcus pluvialis* Nov. Act. Acad. Bd. 20: 413-606, 1844.
- Foster K.W., Saranak J., Patel N., Zarilli G., Okabe M., Kline T. & Nakanishi K.** A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* 311: 756-759, 1984.
- Foster, K.W & Smyth, R.D.** Light antennas in phototactic algae. *Microbiol. Rev.* 44: 572-630, 1980
- Foyer C. H., Dujardin M. & Lemoine Y.** Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate-glutathione cycles to changes in irradiance, photoinhibition and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 751-760, 1989.
- Frank H.A. & Cogdell R.J.** The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In A. Young & G. Britton (eds). *Carotenoids in photosynthesis*. Chapman & Hall, London, pp 252-326, 1993.
- Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A.J., Gosztola D. & Wasielewski M.R.** Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 41: 389-395, 1994.
- Fraser P.D., Miura Y. & Misawa N.** *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *The J. Biol. Chem.* Vol 272, No 10, 7: 6128-6135, 1997.
- Fraser P.D., Shimada H. & Misawa N.** Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate *in vitro* assay. *Eur. J. Biochem.* 252: 229-236, 1998.
- Fraser P.D., Trvesdale M.R., Bird C.R., Schuch W. & Bramley P.M.** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development : evidence for tissue-specific gene expression. *Plant Physiol.* 105: 405-413, 1994.
- Genty B. Briantais J.M. & Baker N.R.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92, 1989.
- Gilmore A.M.** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* 99: 197-209, 1997.
- Gilmore, A.M. & Yamamoto H.Y.** Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.* 35: 67-68, 1993.
- Golbeck J.H.** Structure and function of photosystem I. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43: 293-324, 1992.
- Gong X. & Chen F.** Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 9: 437-444, 1997.

- Goodwin T.W.** The Biochemistry of Carotenoids. Plants, Chapman and Hall, London, 1980.
- Grotjohann R., Rho, M.S. & Al A.** Influences of blue and red light on the photosynthetic apparatus of *Chlorella kessleri* alteration in pigment-protein complexes. Bot. Acta **105**: 168-173, 1992.
- Grünewald K., Hagen C. & Braune W.** Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. Eur. J. Phycol. **32**: 387-392, 1997.
- Grung M., D'Souza F.M.L., Borowitzka M. & Liaaen-Jensen S.** Algal Carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. J. Appl. Phycol. **4**: 165-171, 1992.
- Grung M., Kreimer G., Calenberg M., Melkonian M. & Liaaen-Jensen S.** Carotenoids in the eyespot apparatus of the flagellate green alga *Spermatozopsis similis*: Adaptation to retinal-based photoreceptor. Planta **193**: 38-43, 1994.
- Gruszecki W.I.** Different aspects of protective activity of the xanthophyll cycle under stress conditions. Acta Physiol. Plant **17**: 145-152, 1995.
- Gudin C. & Chaumont D.** Cell fragility : the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. Bioresource Technol. **38**: 145-151, 1991.
- Hagen C. & Braune W.** Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). V. Influences on photomovement. Plant Cell. Env. **16**: 991-995, 1993.
- Hagen C., Braune. W. & Björn L.O.** Functional aspect of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a "sunshade". J. Phycol. **30**: 241-248, 1994.
- Hagen C., Braune. W. & Nüske J.** Functional aspect of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales) II. Modulation of the pigment content by growth conditions and carotenogenic inhibitors. Crypt. Bot. **4**: 91-96, 1993.
- Hager A. & Holoher K.** Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by light dependent pH decrease. Planta **192**: 581-589, 1994.
- Hager A. & Perz H.** Veränderung der Lichtabsorption eines carotinoids im enzym (de-epoxidase)-substrat(violaxanthin)-komplex. Planta **93**: 314-322, 1970.
- Hager A.** Lichtbedingte pH-erniedrigung in einem chloroplasten-kompartiment als ursache der enzymatischen violaxanthin-zeaxanthin-umwandlung; Beziehungen zur photophosphorylierung. Planta **89**: 224-243, 1969.
- Hager A.** The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. In: Czygan F.C. (ed). *Pigments in plants*. Fischer, Stuttgart-New-York, pp 57-79, 1980.

- Hager A.** Untersuchungen über die rückreaktionen im xanthophyll-cyclus bei *Chlorella*, *Spinacia* und *Taxus*. *Planta* **74**: 148-172, 1967.
- Halldal P. & French S.C.** Algal growth in crossed gradients of light intensity and temperature. *Plant. Physiol.* **33**: 249-252, 1980.
- Harker M. & Hirschberg J.** Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for B-C-4-oxygenase, *cr1O*. *FEBS Lett.* **404**: 129-134, 1997.
- Harker M. & Young A.J.** Inhibition of astaxanthin synthesis in the green alga, *Haematococcus phuvialis*. *Eur. J. Phycol.* **30**: 179-187, 1995.
- Harker M., Berkaloff C., Lemoine Y., Britton G., Young A.J. Duval J.-C., Rmiki N-E. & Rousseau B.** Effects of high light and dessication on the operation of the xanthophyll cycle in two marine brown algae. *Eur. J. Phycol.*, 1999 (sous presse).
- Havaux M. & Tardy F.** Short-term adaptative responses of photosynthesis to elevated temperatures and strong light. Possible role and mode of action of the xanthophyll-cycle pigments. In: Mathis P. (ed). *Photosynthesis: from Light to biosphere*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol IV, pp 777-782, 1995.
- Havaux M., & Gruszecki W.I.** Heat and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low level of the carotenoid zeaxanthin: indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochem. Photobiol.* **58**: 607-614, 1993
- Havir E.A., Tausta S. & Peterson R.B.** Purification and properties of violaxanthin de-epoxidase from spinach. *Plant Sci.* **123**: 57-66, 1997.
- Henley W.J., Levavasseur G., Franklin L.G., Osmond B.D. & Ramus J.** Photoacclimatation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influence by nitrogen availability. *Planta* **184**: 235-243, 1991.
- Hill H.M., Calderwood S.K. & Roger L.J.** Conversion of lycopene to β -carotene by plastids isolated from higher plants. *Photochem.* **10**: 2051-2058, 1971.
- Horton P., Ruban A.V. & Walters R.G.** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 655-684, 1996.
- Horton P., Ruban A.V., Rees D., Pascal A.A., Noctor G. & Young A.J.** Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex *FEBS Lett.* **292**: 1-4, 1991.
- Jahns P. & Krause G.H.** Xanthophyll cycle and energy-dependent fluorescence quenching in leaves from pea plants grown under intermittent light. *Planta* **192**: 176-182, 1994.

- Jennings R.C., Zucchelli G., Bassi R., Vianelli A. & Garlarschi, F.M.** The relation between the minor chlorophyll spectral forms and fluorescence quenching in aggregated light harvesting chlorophyll a/b complex II. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**: 279-283, 1994.
- Jiménez C. & Pick U.** Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physiol.* **101**: 385-390, 1993.
- Johnson E.A. & Lewis M.J.** Astaxanthin formation by Yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **115**: 173-183, 1979.
- Johnson E.A., Villat G. & Lewis M.J.** *Phaffia rhodozyma* as an Astaxanthin source in Salmonid diets. *Aquaculture* **20**: 123-134, 1980.
- Jupin H. & Lamant A.** La photosynthèse. Masson, Paris. pp 268, 1997.
- Kakizono T., Kobayashi M. & Nagai S.** Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **74(6)**: 403-405, 1992.
- Kim J.H., Nemson J.A. & Melis A.** Photosystem II reaction center damage and repair in *Dunaliella salina* (green alga). *Plant Physiol.* **103**: 181-189, 1993.
- Kirk J.T.O. & Tilney-Bassett R.A.E.** The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance, 2nd Ed. Elsevier, Amsterdam, 1978.
- Kobayashi M., Kakizono T., Yamaguchi Y., Nagai S.** Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Fermentation Bioengineer.* **84**: 94-97, 1997.
- Kobayashi M., Kakizono T., Yamaguchi Y., Nishio N. & Nagai S.** Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **74(1)**: 17-20, 1992.
- Kobayashi M., Kakizono T. & Nagai S.** Astaxanthin production by green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J. Ferment. Bioeng.* **71(5)**: 335-339, 1991.
- Kobayashi M., Kakizono T. & Nagai S.** Enhanced carotenoids biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(3)**: 867-873, 1993.
- Kok B.** Partial purification and determination of the oxidation reduction potential of the photosynthetic chlorophyll complex absorbing at 700 nm. *Biochim. Biophys. Acta* **48**: 527-533, 1961.
- Krause G.H., & Weis E.** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 313-349, 1991.
- Kreimer G., Brohsonn U. & Melkonian M.** Isolation and partial characterization of the

photoreceptive organelle for phototaxis of a flagellate green alga. *Eur. J. Cell. Biol.* **55**: 318-327, 1991.

Krøl M., Spangfort M.D., Huner A., Oquist G., Gustafsson P. & Jansson S. Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll b-less barley mutants. *Plant Physiol.* **107**: 873-883, 1995.

Lee A.L.C. & Thornber J.P. Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from Barley (*Hordeum vulgare*). The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant Physiol.* **107**: 565-574, 1995.

Lee R.E. Phycology, Cambridge University Press New York. pp 645, 1989.

Lee Y.K & Soh C.W. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **27**: 575-577, 1991.

Lee Y.K. & Ding S.Y. Can *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) recovered from photoinhibition of photosynthesis?. *Plant Cell. Physiol.* **33(6)**: 815-818, 1992.

Lee Y.K. & Ding S.Y. Cell cycle accumulation of astaxanthine in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **30**: 445-449, 1994

Lee Y.K. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.* **9**: 403-411, 1997.

Lemaire P. & Livingstone D.R. Effects of inhibitors Ellipticine on cytochrome P450-reductase and cytochrome (1A) function in hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*). *Mar. Environ. Res.* **39**: 73-77, 1995

Lemoine Y., Dubacq J.P. & Zabulon J.P. Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and -susceptible biotypes of several plant species. *Can. J. Bot.*, **64**: 2999-3007, 1985.

Lemoine Y., Harker M., Rmiki N.E, Rousseau B., Berkaloff C., Duval J.C., Young A.J. & Britton G. Xanthophyll cycle operation and photoprotection in brown algae: effects of high light and dessication . *In*: Mathis P. (ed). *Photosynthesis: from light to biosphere.* : Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol. IV. 119-122, 1995.

Lers A., Biener Y. & Zamir A. Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Kinetic and dependence on gene activation. *Plant Physiol.* **93**: 389-395, 1990.

Lichtenthaler H.K. & Schindler C. Studies on the photoprotective function of zeaxanthin at high-light conditions. *In* : N. Murata (ed). *Research in photosynthesis*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol IV. 577-520, 1992.

Lichtenthaler H.K., Schwender J., Seeman M. & Rohmer M. Carotenoid biosynthesis in

green alga proceeds via a novel biosynthetic pathway *In* : P. Mathis (ed). *Photosynthesis: from Light to biosphere*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol IV, 115-118, 1995.

Lichtlé C., Duval J.-C. & Lemoine Y. Comparative biochemical, functional and ultrastructural studies of photosystem particles from a Cryptophyceae: *Cryptomonas rufescens*; isolation of an active phycoerythrin particle. *Biochim. Biophys. Acta* **894**: 76-90, 1987.

Lotan T. & Hirschberg J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*, *FEBS Lett.* **364**: 125-128, 1995.

Maillard P. Influence de l'éthylène sur la croissance, la physiologie et le métabolisme d'*Haematococcus pluvialis*. Thèse Univ. de Technologie de Compiègne, pp 156, 1993.

Maillard P., Triki A., Salazar-Gonzalez M. & Gudin C. Carotenogenesis and ethylene production in *Haematococcus pluvialis* during the photoperiod in a closed tubular photobioreactor. *Russian J. Plant Physiol.* **41**: 184-188, 1994.

Marano F. Flagellar apparatus, cell mobility, and phototaxis. *In*: Avron M. & Ben Amotz A. (eds). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, pp 17-44, 1992.

Margulies M. Effect of chloramphenicol on light dependant development of seedlings of *Phaseolus vulgaris* var. Black Valentine, with particular reference to development activity. *Plant Physiol.* 473-480, 1962.

Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M. & Chapman D.J. (eds). *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett, Boston. 1990

Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B. Hugueney P., A. Frey, & Marion-Poll A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **15**: 2331-2342, 1996.

Maxwell D.P., Laudénbach D.E. & Huner N.P.A. Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and *Cab* mRNA Abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **109**: 787-795, 1995.

Mendoza H., Jiménez D.R.M., Reina G. & Ramazanov Z. Low-temperature-induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* **31**: 329-331, 1996.

Milborow B.V., Swift I.E. & Netting A.G. Stereochemistry of hydroxylation of the carotenoid lutein in *Calendula officinalis*. *Photochem.* **21**: 2853-2857, 1982.

Murata T., Hatayama I., Satoh K., Tsuchida S. & Sato K. Activation of rat glutathione transferase in class mu by active oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**: 845-851, 1990.

Nelis H.J. & De Leenheer A.P. Biotechnology of vitamins pigments and growth factors.

London-New York, Elsevier Appl. Sci. 1989.

Noctor G., Rees D., Young A.J. & Horton P. The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, and trans-thylacoid pH gradient in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1057**: 320-330, 1991.

Oelmüller R. & Mohr H. Carotenoid composition in milo (*Sorghum vulgare*). Shoots as affected by phytochrome and chlorophyll. *Planta*. **164**: 390-395, 1985.

Papastephanou C., Barnes F.J., Briedis A.V. & Porter J.W. Enzymatic synthesis of carotenes by cell-free preparations of fruit of several genetic selections of tomatoes. *Arch. Biochem. Biophys.* **157**: 415-425, 1973.

Parajó J.C., Santos V. & Vásquez M. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* **19**: 139-141, 1997.

Pascher A. *Die süßwasser-flora. Volvocales-Phytomonadinae.* Fischer V.V.G., Jena, Vol IV pp 506, 1927.

Paulsen H. Chlorophyll *alb*-binding proteins. *Photochem. Photobiol.* **62(3)**: 367-382, 1995.

Pfündel E.E. & Dilley R.A. The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **101**: 65-71, 1993.

Pfündel E.E. & Strasser R.J. Violaxanthin de-epoxydase in etiolated leaves. *Photosynth. Res.* **15**: 67-59, 1988.

Radmer R.J. Algal diversity and commercial algal products. *Bio. Sci.* **46**: 263-270, 1996.

Rees D., Young A.J., Noctor G., Britton G. & Horton P. Enhancement of the pH-dependent dissipation of excitation energy in spinach chloroplasts by light-activation: correlation with the synthesis of zeaxanthin. *FEBS Lett.* **256**: 85-90, 1989.

Renstrøm B. & Liaaen-Jensen S. Fatty acid composition of esterified carotenoids. *Comp. Biochem. Physiol.* **69B**: 625-627, 1981.

Ristori T. & Rosati G. The eyespot membranes of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae); their ultrastructure and possible significance in phototaxis. *Monit. Zool. Ital.* **17**: 401-408, 1983.

Rmiki N.E., Brunet C., Cabioch J. & Lemoine Y. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiol.* **326/327**: 407-413, 1996.

Rockholm D.C. & Yamamoto H.Y. Purification of a 43-kilodalton luminal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride. *Plant Physiol.* **110**: 697-703, 1996.

Rogers L.J. & Gallon J.R. (eds). *Biochemistry of algae and Cyanobacteria*. Oxford Sci. Publ., Clarendon Press, Oxford, 1988.

Ruban A.V., Philipp D., Young A.J. & Horton P. Carotenoid-dependent oligomerization of the major chlorophyll a/b light harvesting complex of photosystem II of plants. *Biochemistry* **36**: 7855-7859, 1997.

Ruban A.V., Young A.J. & Horton P. Induction of non-photochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. Evidence for changes in the state of the light-harvesting system of PSII *in vivo*. *Plant Physiol.* **102**: 741-750, 1993.

Ruban A.V., Young A.J., Pascal A.A., Horton, P. The effects of illumination on the xanthophyll composition of PSII LHCs of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.* **104**: 227-234, 1994a.

Ruban, A. V., Young A. & Horton P. Modulation of chlorophyll fluorescence quenching in isolated LHC of PSII. *Biochim. Biophys. Acta* **1186**: 123-127, 1994b.

Ruban, A.V. & P. Horton. Spectroscopy of non-photochemical and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves; evidence for a role of the light harvesting complex of photosystem II in the regulation of energy dissipation. *Photosynth. Res.* **40**: 181-190, 1994c.

Ruban, A.V., Young, A. & Horton, P. Dynamic properties of the minor chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II, an *in vitro* model for photoprotective energy dissipation in the photosynthetic membrane of green plants. *Biochemistry* **35**: 674-678, 1996.

Salazar-Gonzalez M. Ecochimie et photoproduction de l'astaxanthine chez *Haematococcus pluvialis* (Flotow). Thèse Univ. de Droit d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille, pp 146, 1995.

Sandmann G. & Bramley P.M. The *in vitro* biosynthesis of β -cryptoxanthin and related xanthophylls with *Aphanocapsa* membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **843**: 73-77, 1985.

Sapozhnikov D.I. Kyzsovskaya T.A. & Maevskaya A.N. Change in the interrelationship of the basic carotenoids of the plastids of the green leaves under the action of light. *Doklady Akad. Nauk SSSR, Botanical Sciences Sections*, **113**: 74-76, 1957.

Sarry J.E, Montillet J. L., Sauvaire Y. & Havaux M. The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. *FEBS Lett.* **353**: 147-150, 1994.

Schäfer C., Schmidt V. & Ross M. Characterization of high-light-induced increases in xanthophyll cycle pigment and lutein contents in photoautotrophic cell cultures. *J. Photochem. Photobiol.* **22**: 67-75, 1994.

Schindler C. & Lichtenthaler H.K. Is there a correlation between light-induced zeaxanthin accumulation and quenching of variable chlorophyll a fluorescence ?. *Plant Physiol. Biochem.*

32: 813-823, 1994.

Schoefs B. Etude spectroscopique des complexes protochlorophyllide-protéine et de leurs transformations à la lumière dans des feuilles à divers stades de leur développement. Thèse Univ. Liège, pp 259, 1994.

Schoefs B., Bertrand M. & Franck F. Plant greening: biogenesis of photosynthetic apparatus in bean leaves irradiated shortly after the germination. *Photosynthetica* 27: 497-504, 1992.

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

Schubert H., Kroon B. M. A. & Matthijs H.C.P. *In vivo* manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Biol. Chem.* 269: 7267-7272, 1994.

Schwartz J. Regression of experimental Hamster cancer by beta-carotene and algae extracts. *J. Oral. Maxillo. Surg.* 45: 510-515, 1987.

Schwartz J., Shklar G., Reid S. & Tricker D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr. Cancer*, 11: 127-134, 1988.

Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H.K. & Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316: 73-80, 1996.

Shaish A., Ben-Amotz A. & Avron M. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 27: 652-656, 1991.

Siefermann D. & Yamamoto H.Y. Light-induced de-epoxidation in lettuce chloroplasts VI-DE-epoxidation in grana and stroma lamellae. *Plant Physiol.* 57: 939-940, 1976.

Siefermann-Harms D. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69: 561-568, 1985.

Simpson K.L., Katayama T. & Chichester C.O. Carotenoids from microorganisms. *In:* Bauernfeld J.C. (ed). *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. London, Acad. Press, 1981.

Sineshchekov O.A. Litvin F.F. Keszthlyi L. Two components of photoreceptor potential in phototaxis of the flagellated green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biophys. J.* 57: 33-39, 1990.

Smith B.M., Morrissey P.J., Guenther J.E., Nemson J.A, Harrison M.A., Allen J.F. & Melis A. Response of the Photosynthetic Apparatus in *Dunaliella salina* (Green Algae) to Irradiance Stress. *Plant Physiol.* 93: 1433-1440, 1990.

- Sprey B.** Die Lokalisierung von Sekundär-carotinoide von *Haematococcus pluvialis* Flotow em Wille. *Protoplasma* **71**: 235-250, 1970.
- Spurgeon S.L. & Porter J.W.** Biosynthesis of carotenoids. *In*: Porter J.W. & Spurgeon S.L. (eds). *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds.*, Wiley, New York, Vol. 2 pp 122. 1983.
- Thayer S.S. & Björkman O.** Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynth. Res.* **33**: 213-225, 1992.
- Thompson Jr. G.A.** Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**: 17-45, 1996.
- Tjahjono A., Hamaya Y., Kakizono T., Terada Y., Nishio N. & Nagai S.** Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* **16(2)**: 133-138, 1994.
- Travieso L. Benitez F. & Dupeiron R.** Sewage treatment using immobilized microalgae. *Bioresource Technol.* **40**: 183-187, 1992.
- Trebst A. & Soll-Bracht E.** Cycloheximide retards light driven D1 protein degradation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **115**: 191-197, 1996.
- Tsavalos A.J. Harker M. & Young A.J.** Analysis of carotenoids using HPLC with diode-array detection. *Eur. Chromato. Anal.* **6**: 9-11, 1993.
- Tsavalos A.T., Harker M., Daniels M. & Young A.J.** Secondary carotenoids synthesis in microalgae. *In*: Murata N. (ed). *Research in photosynthesis*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol III pp 47-50, 1992.
- Tsushima M., Kawakami T., Mine M & Mtsuno T.** The role of carotenoids in the development of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Invertebrate Reproduction and development*, **32(2)**: 149-153, 1997.
- Turujman S.A., Wamer W.G., Wei R.R. & Albert R.H.** Rapid Liquid Chromatographic Method to Distinguish Wild Salmon from Aquacultured Salmon Fed Synthetic Astaxanthin. *J. AOAC Int.* **80(3)**: 622-632, 1997.
- Van Breemen R.B., Huang C.R., Tan Y., Sander L.C. & Schilling A.B.** Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Carotenoids Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization. *J. Mass. Spectrom.* **31**: 975-981, 1996.
- Van Den HoeK C., Mann D. & Jahns H.M.** An introduction to phycology. Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- Vechtel B., Pistorius E. K. & Ruppel H.G.** Occurrence of secondary carotenoids in PS I complexes isolated from *Eremosphaera viridis* De Bary (Chlorophyceae). *Z. Natur.* **47c**: 51-56, 1992.

Walton T.J., Britton G. & Goodwin T.W Biosynthesis of xanthophylls in higher plants. Stereochemistry of hydroxylation at C-3. *Biochem. J.* **112**: 383-385, 1969.

Webb M.R. & Melis A. Chloroplast response in *Dunaliella salina* to irradiance stress. Effect on thylakoid membrane protein assembly and function. *Plant Physiol.* **107**: 885-893, 1995.

Yamamoto H.Y. & Bassi R. Carotenoids: localization and function. In: Ort D.R. & Yocum C.F. (eds). *Oxygenic Photosynthesis: the light reactions*. Kluwer Acad. Publ., Netherlands, pp 539-563, 1996.

Yamamoto H.Y. & Higashi R.M. Violaxanthin de-epoxidase. Lipid composition and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 514-522, 1978.

Yamamoto H.Y. & Kamite L. The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation and absorbance changes in the 500 nm region. *Biochim. Biophys. Acta* **267**: 538-543, 1972.

Yamamoto H.Y. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure & Appl. Chem.* **51**: 639-648, 1979.

Yamamoto H.Y., Chang J.L. & Aihara M.S. Light-induced interconversions of violaxanthin and zeaxanthin in New Zealand spinach-leaf segments. *Biochim. Biophys. Acta* **141**: 342-347, 1967.

Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M. & Chichester C.O. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem.* **97**: 168-173, 1962.

Yong Y.Y.R. & Lee Y.K. A possible role of photoprotection for secondary carotenoids in the cytoplasm of the green alga *Haematococcus lacustris* (Haematococcaeae, Chlorophyta). *Phycologia* **30**: 257-261, 1991.

Young A.J. & Britton G. Carotenoids and stress. In : Alscher R.G. & Cumming J.R. (eds). *Stress responses in plants : Adaptation and Acclimation Mechanisms*. New York : Wiley Liss. pp 87-112, 1990.

Young A.J. & Britton G. (eds). *Carotenoids in photosynthesis*, London, Chapman & Hall, pp 498, 1993.

Young A.J. & Frank H.A. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **36**: 3-15, 1996.



Annexe 1

Protocole d'extraction des pigments en vue d'analyse par chromatographie

centrifugation de la suspension (2500 G , 10 min)



culot récupéré dans méthanol/dichlorométhane [(4/1) , (v/v)]



Vibrogène (3 cycles de 15 sec espacés de 15 sec)
ou Presse de FRENCH (1100 bar)



centrifugation (2500 G, 10 min)



→ culot (débris cellulaire) éliminé

surageant filtré 0,45 µm



élimination des solvants à l'évaporateur rotatif



récupération dans le dichlorométhane (2 à 3 fois 1 ml)



séchage sous azote



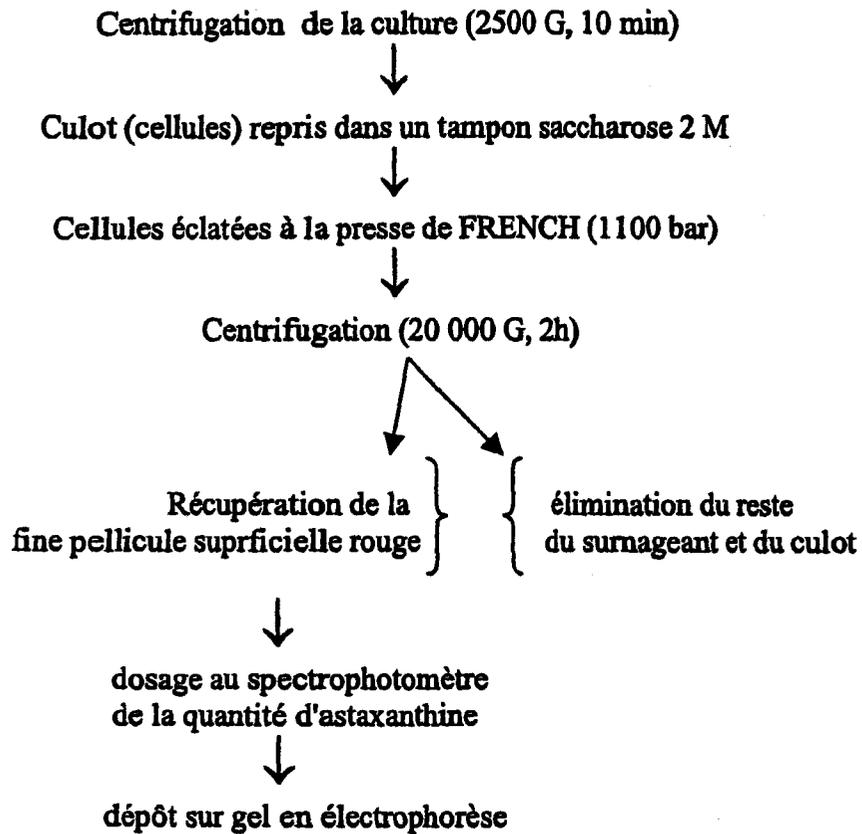
reprise de l'extrait sec dans un volume précis de méthanol (100 à 300 µl)



analyse pigmentaire immédiate (CLHP et/ou CCM)
ou coservation à - 20 °C sous atmosphère saturée en azote

Annexe 2

Isolement des complexes pigment-protéine (globules lipidiques rouge)



Annexe 3

Tableau VI: Gels et tampon d'électrophorèses

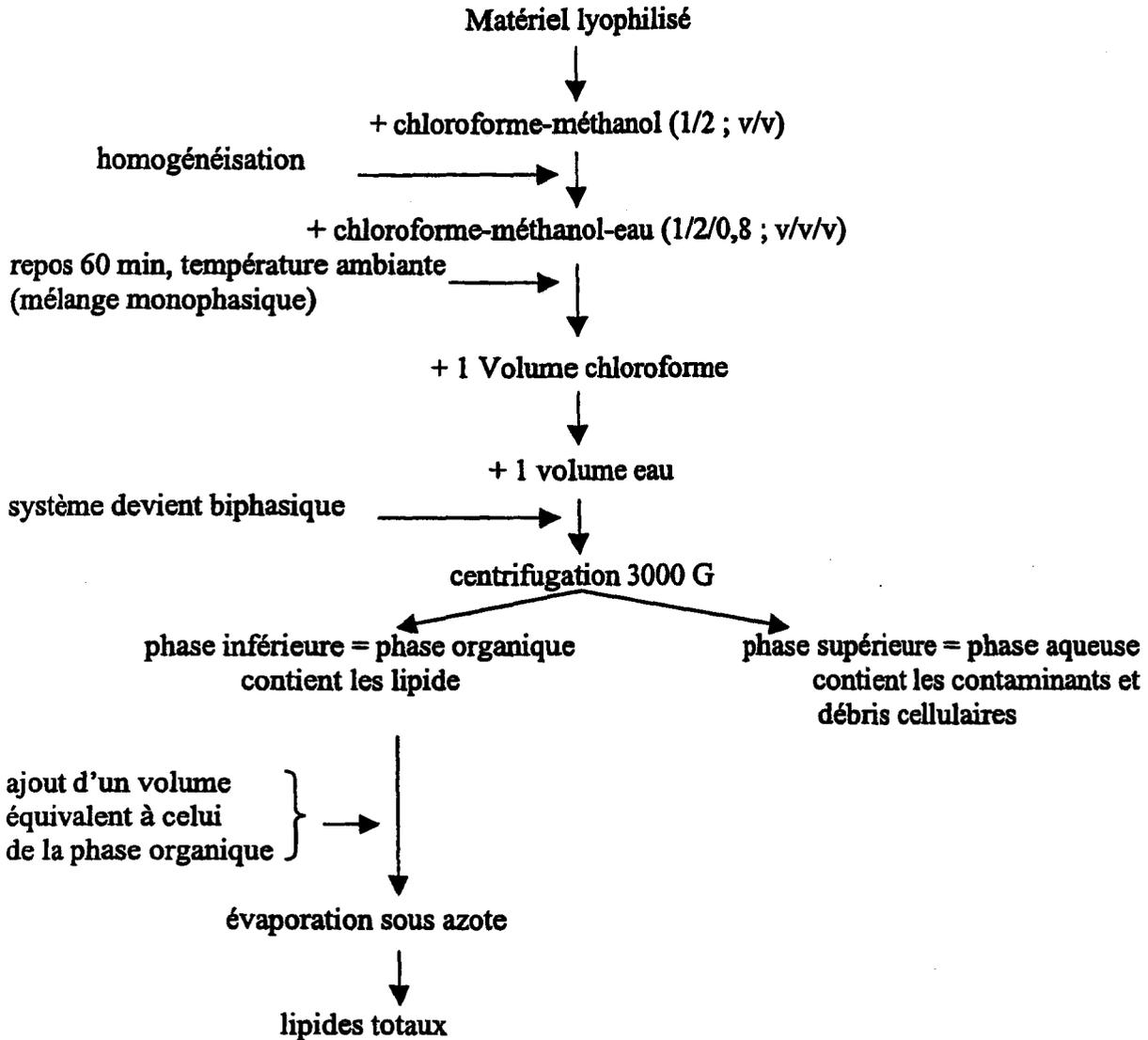
	Gel de séparation	Stacking gel	Tampon d'électrophorèse
Acrylamide	12,5%	4%	
Bisacrylamide	0,675%	2%	
Tris-HCl	0,375%	0,125%	
Tris-Glycine			0,02M Tris Base 0,192M glycine
pH	8,8	6,8	8,3
SDS	0,1%	0,1%	0,1%
Ammonium persulfate	0,1% (p/v)	0,05% (p/v)	
Temed	0,07 % (v/v)	0,05% (v/v)	

Tableau VII : Préparation du tampon Laemmli

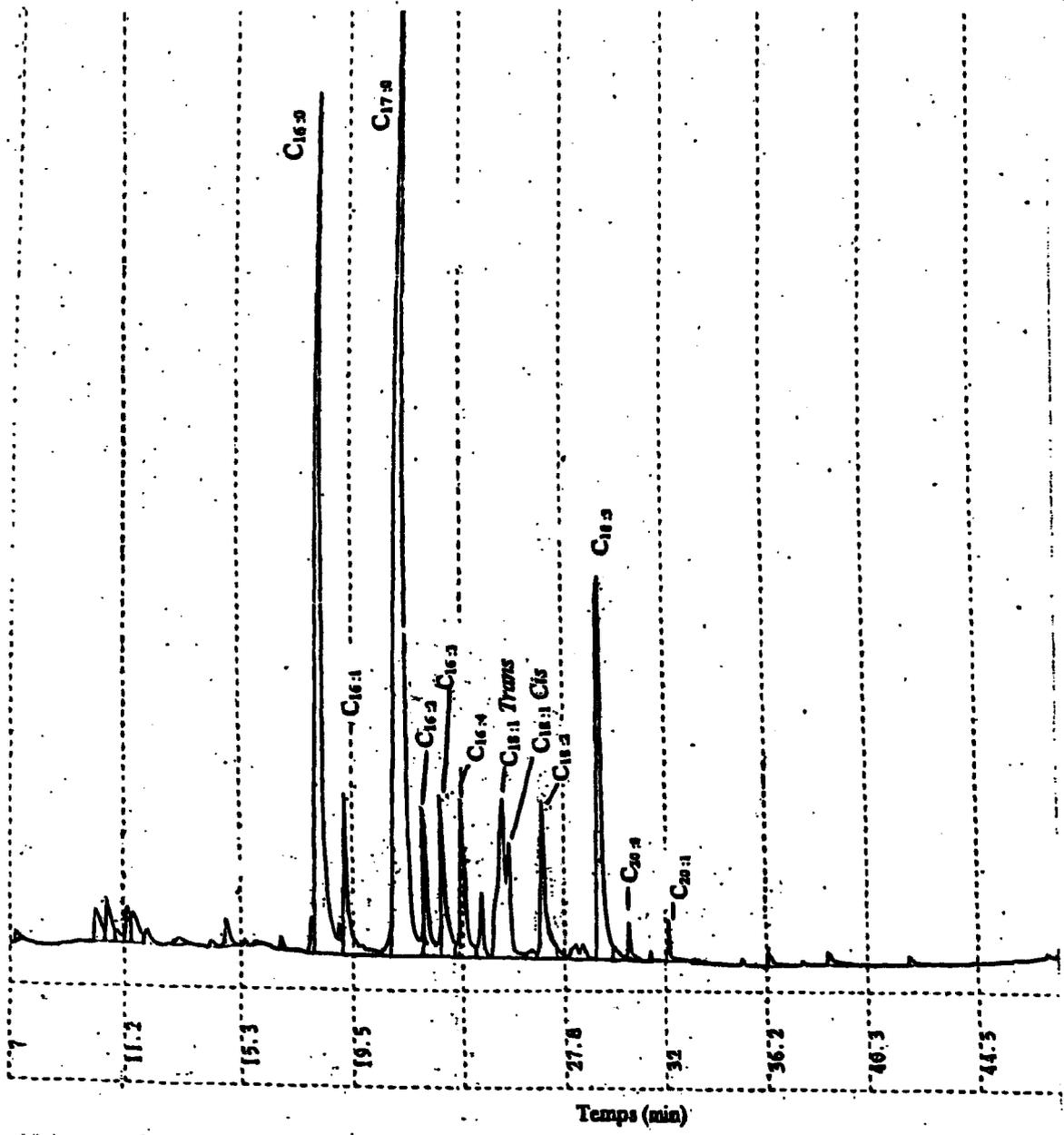
Tris	380 mg
SDS	500 mg
EDTA	145 mg
Bleu Bromophénol	0,1 ml
β -Mercaptoéthanol	0,5 ml

Annexe 4

Extraction des lipides totaux



COLONNE BPX 70
PROGRAMME DE TEMPERATURE 90(2)10/minute(0)20MIN 210(5)



Annexe 5 : Exemple de profil chromatographique obtenu par analyse CPG

Publications internationales

Lemoine Y., Harker M., Rmiki N.E, Rousseau B., Berkaloff C., Duval J.C., Young A.J. & Britton G. Xanthophyll cycle operation and photoprotection in brown algae: effects of high light and dessication . *In*. P. Mathis (ed.). *Photosynthesis: from light to biosphere.* : Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol. IV. 119-122, 1995.

Rmiki N.E., Brunet C., Cabioch J. & Lemoine Y. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiol.* **326/327**: 407-13, 1996.

Rmiki N.E., Schoefs B. & Lemoine Y. Carotenoids and stress in higher plants and algae. *In*: Pessaraki M (ed.) *Handbook of Plant and Crop Stress : Second Edition.* pp 465-476 (sous presse)

Harker M. Berkaloff C. Lemoine Y. Britton G. Young A.J. Duval J.-C. Rmiki N-E. & Rousseau B. Effects of high light and dessication on the operation of the xanthophyll cycle in two marine brown algae. *Eur. J. Phycol.* 1999 (sous presse).

Dewaele E., Rmiki N.E., Lemoine Y. & Rambour S. Effects of chlorsulfuron on the photosynthetic capability and the expression of AHAS gene in Chicory. *Soumis à J. Exp. Bot.*

POSTERS DANS DES CONGRES INTERNATIONAUX

Y. LEMOINE, N.E. RMIKI, G. ZABULON & J. CABIOCH. Carotenoid composition and photoinhibition in several related red algae. 10th International Symposium on Carotenoid, (1993) Trondheim, Norvège.

Y. LEMOINE, M. HARKER, N.E. RMIKI, B. ROUSSEAU, C. BERKALOFF, J.C, DUVAL, A.J. YOUNG & G. BRITTON. Xanthophyll cycle operation and photoprotection in brown algae: effects of high light and dessication. 10th International Congress on Photosynthesis 1995, Montpellier, France.

N.E. RMIKI, C. BRUNET, J. CABIOCH & Y. LEMOINE. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. 15th International Seaweeds Symposium, (1995) Valdivia, Chili

N.E. RMIKI, C. BRUNET & Y. LEMOINE. Intervention du cycle des xanthophylles dans l'adaptation de l'appareil photosynthétique à l'environnement lumineux chez les micro- et les macroalgues. Colloque Lille-ULB (Comité Stratégique Régional de Recherche en Biologie et en Santé (Lille) et Université Libre de Bruxelles) (1995). Lille, France.

N.E RMIKI, B. JURICIK, B. SCHOEFS & Y. LEMOINE. Enhanced astaxanthin biosynthesis and encystment induced by a ligh stress in a green unicellular alga. 1st European Phycological Congress (1996) Cologne, Allemagne.

N.E RMIKI, B. SCHOEFS, B. JURICIK, & Y. LEMOINE. High light stress and astaxanthin biosynthesis in the green alga: *Haematococcus pluvialis*. Summer-school : Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology of Photosynthesis. Université de Liège, Belgique. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège(1996) Vol. **65 (4-5)** : 367-368.

COMMUNICATIONS ORALES:

Photoinhibition et zonation des Gracilaires de Roscoff : *Gracilariopsis confervoides*, *Gracilaria verrucosa* et *Gracilaria multipartita*. (1992). 2^{èmes} journées doctorales Phycologie. Banyuls, France.

Distribution verticale des Gracilaires sur le littoral et relation avec la photoinhibition. (1993). Colloque "Algues et biotechnologie" organisé par la société Phycologique de France et la société Botanique de France. Caen, France.

Caroténogénèse et conditions environnementales chez *Haematococcus pluvialis* (Volvocales). (1994). 3^{èmes} journées doctorales de Phycologie. Roscoff, France.