

UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE  
ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE (ED 469)

Doctorat

Discipline : Biologie des organismes

**Noémie COULOMBIER**

**ÉVALUATION DES MICROALGUES SÉLECTIONNÉES EN NOUVELLE-CALÉDONIE  
COMME SOURCE POTENTIELLE D'ANTI-OXYDANTS NATURELS**

Identification des molécules anti-radicalaires et stimulation de leur biosynthèse par  
orientation métabolique

Thèse dirigée par Nicolas Lebouvier et Thierry Jauffrais

Soutenue le 13 octobre 2020, devant le jury ci-dessous

Présidente du jury	<b>Claude PAYRI</b> , Directrice de recherche, IRD Nouvelle-Calédonie
Rapporteurs	<b>Mireille CHINAIN</b> , Directrice de recherche, Institut Louis Malardé <b>Jean-Luc MOUGET</b> , Professeur, Le Mans Université
Examineur	<b>Laurent PICOT</b> , Maître de Conférences HDR, Université de La Rochelle
Membres invités	<b>Elodie NICOLAU</b> , Cadre de recherche, Ifremer Nantes <b>Pablo CHAVANCE</b> , Ingénieur, Adecal Technopole
Directeurs de thèse	<b>Nicolas LEBOUVIER</b> , Maître de Conférences HDR, Université de Nouvelle-Calédonie <b>Thierry JAUFFRAIS</b> , Cadre de Recherche, Ifremer Nouvelle-Calédonie









## Remerciements

*La réalisation de cette thèse a été possible grâce au concours de nombreuses personnes à qui je voudrais exprimer toute ma reconnaissance.*

*Cette thèse s'est déroulée dans le cadre du programme AMICAL et a bénéficié de ses financements aussi je souhaiterai remercier le Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, la Province Sud, la Province Nord, et le Comité interministériel des Outre-mer. Merci également à l'École Doctorale du Pacifique pour avoir financé ma participation au congrès AlgalBBB à Seattle et aux Doctoriales de Tahiti.*

*Je tiens à remercier Mireille Chinain et Jean-Luc Mouget pour avoir accepté d'être rapporteurs et de juger ce travail ainsi que Claude Payri, Laurent Picot, Nicolas Lebouvier, Thierry Jauffrais, Elodie Nicolau et Pablo Chavance pour votre participation à mon jury de thèse.*

*Un très grand merci à Nicolas Lebouvier mon directeur de thèse pour ton aide et ton soutien tout au long de cette thèse. J'ai réellement apprécié travailler avec toi ces quelques années, tu as toujours été à l'écoute et disponible pour me conseiller et m'aider avec calme, patience et gentillesse. Merci aussi d'avoir partagé ton savoir de chimiste avec la néophyte que j'étais, grâce à toi je le suis un peu moins !*

*Je tiens également à remercier chaleureusement Thierry Jauffrais, je te suis très reconnaissante d'avoir pris la codirection de ma thèse à mi-parcours. Tu m'as énormément apporté pendant ces derniers mois, merci infiniment pour ta disponibilité permanente, ton investissement, ton dynamisme et toute ton aide et tes conseils pour la rédaction des articles.*

*Cette thèse a démarré sous la direction de Raymond Kaas, aussi un grand merci à toi pour ta bienveillance, ta patience et tes encouragements. Je suis fière d'avoir été l'une de tes dernières doctorantes.*

*Je souhaite également remercier Liet Chim, qui aura aussi assuré la direction de ma thèse pendant quelques mois, et qui est l'origine de ce projet de thèse. Merci pour ton soutien tout au long de cette thèse et ton aide sur la correction des articles. J'ai beaucoup apprécié les bons moments passés ensemble au LEMA et pendant les bioprospections, il restera d'ailleurs quelques photos mémorables !*

*Je tiens aussi à remercier Loïc Le Déan, pour ta participation à l'encadrement de ma thèse, et pour tes encouragements et ton soutien sans faille. Il est difficile de trouver les bons mots pour t'exprimer ma reconnaissance, sans aucun doute je n'en serais pas là sans toi aujourd'hui. Alors merci infiniment pour tout ce que tu as pu m'apporter tant sur le plan professionnel que personnel.*

*Merci également à Elodie Nicolau pour ton encadrement tout au long de cette thèse, pour tes conseils et encouragements, ta disponibilité et ton aide précieuse pour les analyses pigmentaires. Merci aussi pour les relectures critiques des articles et du manuscrit et pour ton accueil lors de mes missions à PBA.*

*Merci au reste de la team AMICAL, Pierre, Florine, Kento, Margaux et ceux partis vers d'autres horizons Florent, Yoann, Vanille, ainsi que les stagiaires Paul, Vincent, Eva, Bérengère, Elodie. Vous avez tous participé à un moment ou à un autre au bon déroulement de cette thèse, que ce soit par vos coups de main sur les manips, par les discussions constructives, ou juste par votre contribution à la bonne ambiance générale qui fait que le programme AMICAL porte si bien son nom.*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement Pablo Chavance, merci pour ta confiance, ton soutien et ton enthousiasme. Merci aussi pour m'avoir fourni les conditions indispensables à l'accomplissement de cette thèse, particulièrement durant les derniers mois de rédaction.*

*Un grand merci également à Adrien Rivaton. C'est toi qui m'a proposé de faire cette thèse, et à l'heure où j'écris ces remerciements, je ne regrette pas (plus !) de m'être lancée, bien au contraire. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour réaliser ce projet.*

*Merci aussi à Doriane Sanchez-Lebris d'avoir posé le cadre juridique de cette thèse et de si bien veiller à la préservation des bioressources calédoniennes. Les FT et MTA n'ont plus de secrets pour moi grâce à toi !*

*Merci à Richard Farman et à toute l'équipe de l'Aquarium, pour votre très bon accueil dans vos locaux. Difficile de trouver un meilleur cadre de travail !*

*Je veux également remercier Emmanuel Tessier, pour ton investissement dans le règlement des complexités administratives et juridiques.*

*Je souhaite également remercier les membres ou ex-membres de l'ISEA qui ont participé à cette thèse : Mohammed Nour qui est à l'origine, avec Liet Chim, de ce beau projet de thèse, et Cyrille Antheaume pour son aide pour les analyses pigmentaires.*

*Merci également aux membres du laboratoire PBA pour votre accueil pendant mes missions, j'ai toujours un grand plaisir à vous retrouver. Merci en particulier à Nathalie Schreiber et Bruno Saint-Jean pour votre aide en réponse à nos appels au secours de dernière minute, et à Aurélie Charrier pour tes encouragements et ta gentillesse.*

*Merci à Nelly Wabete, Laurent Maggia et Cyrille Goarant pour votre participation à mes comités de suivi de thèse et pour vos conseils constructifs.*

*Merci aux équipes de St Vincent pour votre accueil toujours chaleureux lors de mes passages à la station. Merci en particulier à Nelly Wabete, Marie Pallud et Marie Madeleine Le Gall pour m'avoir aidé à maîtriser le synergie.*

*Je souhaiterai également remercier Laurent Picot pour ton accueil chaleureux lors de ma mission à La Rochelle, et pour tous nos échanges enrichissants.*

*Je voudrais également remercier ma famille pour votre soutien et vos encouragements, avec une mention spéciale pour Manon pour la correction des articles en anglais.*

*Merci aussi aux copains de Calédonie, Lucie et Flo, Laeti et Simon, Hélène et Fred, Dom et Fred, Katia, Marie-Cécile et ceux restés en métropole, Camille, Lou, et Marine pour tous les indispensables moments de décompression.*

*Enfin, merci infiniment Romain pour m'avoir soutenu, supporté et encouragé pendant toute la durée de ma thèse.*

# Sommaire

Liste des figures .....	v
Liste des tableaux et tables .....	xi
Liste des annexes.....	xiii
Liste des abréviations .....	xv
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 - ETAT DE L'ART.....</b>	<b>7</b>
<b>1.    Le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>9</b>
1.1. Les espèces réactives de l'oxygène .....	9
1.2. Le double rôle des espèces réactives de l'oxygène .....	14
<b>2.    Le système de régulation des espèces réactives de l'oxygène : les antioxydants</b>	<b>15</b>
2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	16
2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	18
<b>3.    Evaluation de l'activité antioxydante des microalgues : de la culture au</b>	
<b>criblage.....</b>	<b>31</b>
3.1. La culture de microalgues .....	31
3.2. Récolte et séchage des microalgues .....	35
3.3. Extraction .....	37
3.4. Evaluation de l'activité antioxydante des microalgues .....	38
3.5. Effets des conditions de culture sur l'activité antioxydante des microalgues .....	54
<b>4.    Applications des antioxydants naturels .....</b>	<b>58</b>
4.1. Cosmétiques .....	58
4.2. Agro-alimentaire .....	59
4.3. Santé.....	60
<b>CHAPITRE 2 - METHODE D'ISOLEMENT DES MICROALGUES .....</b>	<b>61</b>
<b>1.    Contexte .....</b>	<b>63</b>
<b>2.    A dilution-exclusion approach using continuous culture in stirred closed</b>	
<b>photobioreactors to isolate microalgae strains from tropical coastal water .....</b>	<b>65</b>

2.1.	Résumé .....	65
2.2.	Abstract .....	65
2.3.	Background .....	66
2.4.	Sample Collection .....	67
2.5.	Isolation .....	69
2.6.	Acknowledgments .....	71
<b>CHAPITRE 3 - CRIBLAGE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE .....</b>		<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>Contexte .....</b>	<b>75</b>
<b>2.</b>	<b>Impacts of light intensity on antioxidant capacity and carotenoid content of tropical algae .....</b>	<b>77</b>
2.1.	Résumé .....	77
2.2.	Abstract .....	78
2.3.	Introduction .....	78
2.4.	Material and methods .....	80
2.5.	Results and discussion.....	86
2.6.	Conclusions .....	97
2.7.	Acknowledgments .....	98
<b>CHAPITRE 4 - EFFETS DES CONDITIONS DE CULTURES SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....</b>		<b>99</b>
<b>1.</b>	<b>Contexte .....</b>	<b>101</b>
<b>2.</b>	<b>Effects of nitrogen availability on antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae <i>Nephroselmis</i> sp. ....</b>	<b>103</b>
2.1.	Résumé .....	103
2.2.	Abstract .....	104
2.3.	Introduction .....	104
2.4.	Materials and methods .....	106
2.5.	Results .....	111
2.6.	Discussion .....	121
2.7.	Conclusions .....	126
2.8.	Acknowledgments .....	127
<b>3.</b>	<b>The effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification on <i>Tetraselmis</i> biomass production, photophysiology and antioxidant activity: a comparison using batch and continuous culture .....</b>	<b>128</b>

3.1. Résumé .....	128
3.2. Abstract .....	129
3.3. Introduction .....	129
3.4. Materials and methods .....	131
3.5. Results .....	135
3.6. Discussion .....	146
3.7. Conclusions .....	152
3.8. Acknowledgments .....	152
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>153</b>
<b>1. Evaluation de l'activité antioxydante.....</b>	<b>155</b>
<b>2. Identification des métabolites antioxydants .....</b>	<b>156</b>
<b>3. Effets des conditions de culture .....</b>	<b>157</b>
<b>VALORISATION SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>161</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>165</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>197</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>208</b>



## Liste des figures

- Figure 1.** Arbre phylogénétique des eucaryotes (Keeling and Burki 2019); ★ lignées taxonomiques contenant des microalgues ..... 1
- Figure 2.** Génération des ERO dans la cellule microalgale (adapté de Goiris et al.(2015) et Waszczak et al. (2018)).  $^1\text{O}_2$  : oxygène singulet,  $^3\text{O}_2$  : oxygène triplet,  $^3\text{P680}^*$  : paire spéciale de la chlorophylle *a* à l'état triplet, ACOX, Acyl-coenzyme-A oxydase, Fd : ferredoxine GOX : glycolate oxydase,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène,  $\text{O}_2^-$  : radical superoxyde,  $\text{OH}^\bullet$  : radical hydroxyle, PSI et PSII : photosystèmes I et II, SOD : superoxyde dismutase..... 10
- Figure 3.** Génération des principales espèces réactives de l'oxygène.  $^3\text{Chl}^*$  : chlorophylle excitée à l'état triplet, SOD : superoxyde dismutase (adapté de Waszczak et al.(2018))...... 10
- Figure 4.** Conséquences du stress oxydant causé par un excès d'ERO sur les lipides, les protéines et l'ADN (Sharma et al. 2012). ..... 14
- Figure 5.** Le double rôle des espèces réactives de l'oxygène (Vanderauwera et al. 2009)..... 15
- Figure 6.** Cycle de la glutathion peroxydase. GPX : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GS-SG : glutathion oxydé,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène, ROH : alcool, ROOH : hydroperoxyde. .... 17
- Figure 7.** Cycle ascorbate-glutathion. APX : ascorbate peroxydase, AsA : ascorbate réduit, DHA : déhydroascorbate, DHAR : déhydroascorbate réductase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GS-SG : glutathion oxydé,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène, MDHA : monodéhydroascorbate, MDHAR : monodéhydroascorbate réductase. .... 18
- Figure 8.** Structures de l'acide ascorbique et du glutathion. .... 19
- Figure 9.** Structures des tocophérols et tocotriénols..... 20
- Figure 10.** Neutralisation du radical peroxyde lipidique par l' $\alpha$ -tocophérol (d'après Herrera and Barbas (2001)). AsA : ascorbate réduit, DHA : déhydroascorbate, GSH : glutathion réduit, GS-SG : glutathion oxydé,  $\text{LOO}^\bullet$  : radicaux peroxydes lipidiques, LOOH : hydroperoxyde, UQH : coenzyme Q..... 21
- Figure 11.** Classification des composés phénoliques naturels. Les classes identifiées chez les microalgues sont encadrées en rouges, et les molécules détectées chez les microalgues sont indiquées dessous (Klejduk et al. 2010; Rico et al. 2013; Goiris et al. 2014; López et al. 2015;

Shahidi and Ambigaipalan 2015; Safafar et al. 2015; Foo et al. 2017; Haoujar et al. 2019; Cardoso et al. 2020). .....	22
<b>Figure 12.</b> Structures du phloroglucinol et des acides phénoliques identifiés chez les microalgues .....	23
<b>Figure 13.</b> Structure de quelques caroténoïdes retrouvés chez les algues (Takaichi 2011) ....	25
<b>Figure 14.</b> Cycle des xanthophylles des chlorophytes. VDE : violaxanthine dé-époxydase, ZE : zéaxanthine époxydase, DHA : déhydroascorbate. ....	28
<b>Figure 15.</b> Représentation des conditions où la totalité <b>(a)</b> ou seulement une partie <b>(b)</b> de la lumière absorbée par la chlorophylle peut être utilisée pour la photosynthèse. Dans ce dernier cas, l'excès d'énergie qui ne peut pas être utilisé par la photosynthèse est dissipé sous forme de chaleur par la désactivation de la chlorophylle excitée à l'état singulet $^1\text{Chl}^*$ (Demmig-Adams and Adams 1996). .....	28
<b>Figure 16.</b> Représentation schématique d'une cinétique de croissance en batch. ....	33
<b>Figure 17.</b> Représentation schématique d'une cinétique de croissance en batch alimenté.....	33
<b>Figure 18.</b> Représentation schématique d'une culture en continu .....	34
<b>Figure 19.</b> Neutralisation du radical DPPH par un antioxydant AH. ....	42
<b>Figure 20.</b> Génération du radical cation ABTS ( $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ) et réaction avec un antioxydant....	43
<b>Figure 21.</b> Exemple de cinétique de fluorescence de la fluorescéine avec et sans antioxydant (blanc) au cours du test ORAC. AUC : Aire sous la courbe. ....	44
<b>Figure 22.</b> Etapes du test TBARS (Ghani et al. 2017). MDA : malondialdéhyde, TBA : acide thiobarbiturique, TBARS : Substances réactives de l'acide thiobarbiturique.....	45
<b>Figure 23.</b> Formation du complexe TBA-MDA.....	45
<b>Figure 24.</b> Map of New Caledonian Islands highlighting the sampling sites where the seawater containing the isolated strains were collected <b>(A)</b> . Phytoplankton sampler developed to filtrate and concentrate the algae <b>(B)</b> . ....	67
<b>Figure 25.</b> 10L stirred closed photobioreactor developed to carry out the “dilution-exclusion” approach to isolate the fast growing microalgae strains. Temperature, light, pH, rotor speed, dilution rate and medium content are controlled.....	70



<b>Figure 26.</b> Example of two cultures in PBR using the “dilution-exclusion” approach. Cell culture concentration (cell mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> ) of S04 over 20 days in photobioreactor operating in continuous culture mode at 0.1 (black arrow at day 6) and 0.2 day <sup>-1</sup> (black arrow at day 14) dilution rate allowing to isolate .....	71
<b>Figure 27.</b> Identification and characterization of siphonaxanthin: HPLC chromatogram at 450 nm of <i>Nephroselmis</i> sp. HL crude extract ( <b>A</b> ), UV-vis spectrum in HPLC system ( <b>B</b> ), and mass spectrum of siphonaxanthin ( <b>C</b> ). .....	85
<b>Figure 28.</b> Carotenoids structure .....	93
<b>Figure 29.</b> Cell concentration (cell mL <sup>-1</sup> ) and residual nitrate concentration (μM) over time of <i>Nephroselmis</i> sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity and carotenoids analysis. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). .....	112
<b>Figure 30.</b> Carbon cell quota (fmol cell <sup>-1</sup> ) QC ( <b>a</b> ), nitrogen cell quota QN (fmol cell <sup>-1</sup> ) ( <b>b</b> ), C:N (Carbon:Nitrogen) ratio ( <b>c</b> ) over time for <i>Nephroselmis</i> sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity measure and carotenoids analysis. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). .....	113
<b>Figure 31.</b> Dry weight (DW) of <i>Nephroselmis</i> sp. biomass (g L <sup>-1</sup> ) at different times of the culture. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05) .....	114
<b>Figure 32.</b> Antioxidant activity measured with ORAC assay (μmol trolox equivalent g <sup>-1</sup> DW) of <i>Nephroselmis</i> sp. at different times of the culture. Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05). Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2)..	115
<b>Figure 33.</b> Variation of pigment contents in <i>Nephroselmis</i> sp. at different times of the culture. Chlorophyll <i>a</i> and <i>b</i> content (mg g <sup>-1</sup> DW) ( <b>a</b> ), chlorophyll <i>a</i> content (g g <sup>-1</sup> carbon) ( <b>b</b> ), total carotenoids (TC) content (mg g <sup>-1</sup> DW) ( <b>c</b> ), total carotenoids / chlorophyll ( <b>d</b> ). Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05) .....	117
<b>Figure 34.</b> Variation of carotenoids (mg g <sup>-1</sup> DW) in <i>Nephroselmis</i> sp. at different times of the culture, β-carotene ( <b>a</b> ), lutein ( <b>b</b> ), lycopene ( <b>c</b> ), siphonaxanthin ( <b>d</b> ), neoxanthin ( <i>trans</i> and <i>cis</i> ) ( <b>e</b> ), xanthophyll cycle pigments (XCP: violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin) ( <b>f</b> ). Data	

are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05) ..... 118

**Figure 35.** Variation of carotenoids proportion against total carotenoids in *Nephroselmis* sp. at different times of the culture. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin (*trans* and *cis*); Lyco, lycopene; XCP, Xanthophyll Cycle Pigments: violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin; Lut, lutein;  $\beta$ -Car,  $\beta$ -carotene. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 2) ..... 119

**Figure 36.** Cell concentration in cell mL<sup>-1</sup> (**a**), (**b**), absorbance at 680 nm (**c**), (**d**) of *Tetraselmis* sp. cultured in batch (left panels) and continuous (right panels) cultures in PBRs at pH 8.5 and 6.5 over time (days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3) ..... 136

**Figure 37.** Carbon cell quota (fmol cell<sup>-1</sup>) QC (**a**), nitrogen cell quota QN (fmol cell<sup>-1</sup>) (**b**), C:N (Carbon:Nitrogen) ratio (**c**) of *Tetraselmis* sp. in batch culture at stationary phase and in continuous culture at steady state at pH 8.5 and 6.5. \* indicates significant differences between conditions (P-value<0.05). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 6 in batch and 12 in continuous culture)..... 138

**Figure 38.** Maximum quantum light utilization efficiency of photosystem II (PSII, Fv/Fm) of *Tetraselmis* sp. in batch (**a**) and continuous (**b**) cultures in PBRs at pH 8.5 and 6.5 over time (days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3)..... 139

**Figure 39.** Photosynthetic parameters obtained from rapid light curves carried out on *Tetraselmis* sp. in batch (**a**, **c**, **e**, **g**) and continuous (**b**, **d**, **f**, **h**) cultures in PBRs at pH 8.5 and 6.5. Maximum electron transport rate rETRmax in AU (**a**), (**b**), light saturation coefficient Ek in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (**c**), (**d**), maximum light utilization coefficient for photosystem II A (**e**), (**f**), Non-Photochemical Quenching induced during RLC NPQ induc. (**g**), (**h**). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3) ..... 141

**Figure 40.** Non-Photochemical Quenching (NPQ) over the induction (white background) and dark recovery (grey background) (**a**), (**b**), (**c**), Relative Quantum Efficiency (RQE) (**d**), (**e**), (**f**) of *Tetraselmis* sp. in batch (days 2, 4, 6, 11, 18) and continuous cultures (the two steady states) in PBRs at pH 6.5 and 8.5. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3)..... 143

**Figure 41.** Evolution of the antioxidant activities (IC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of *Tetraselmis* sp. extracts in batch culture at stationary phase and in continuous culture at steady state at pH 8.5 and 6.5. \* indicates significant differences between conditions (P-value<0.05). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 6 in batch and 12 in continuous culture). Reference compounds trolox (IC<sub>50</sub> = 0.24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and  $\alpha$ -tocopherol (IC<sub>50</sub> = 1.30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ..... 144

**Figure 42.** Results of the first and second component analysis influencing the antioxidant activity (IC<sub>50</sub>, black dot with their associated values) of *Tetraselmis* sp.. Fv/Fm (Maximum quantum light utilization efficiency of Photosystem II), rETRmax (relative maximum electron transport rate), Ek (light saturation coefficient in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), alpha (maximum light utilisation coefficient for photosystem II), NPQ induc (Non-Photochemical Quenching induced during RLC), NOX (nitrate + nitrite) at sampling time, N and C (nitrogen and carbon quotas), C:N (carbon:nitrogen ratio)..... 146



## Liste des tableaux et tables

<b>Tableau 1.</b> Distribution des caroténoïdes chez les microalgues (d'après Takaichi (2011))....	26
<b>Tableau 2.</b> Principales méthodes chimiques utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des microalgues. HAT : hydrogen atom transfer, SET : single electron transfer.....	40
<b>Tableau 3.</b> Principales études évaluant l'activité antioxydante des microalgues <i>in vitro</i> par tests chimiques. ....	48
<b>Table 4.</b> Sampling date, site and culture codes, and field data registered at the different sampling sites in New Caledonia .....	68
<b>Table 5.</b> Culture codes, initial number of phytoplankton genus observed in the collected seawater and experimental conditions applied, dilution rate ( $\mu$ ), temperature, salinity, pH, and PAR to isolate different microalgae strains. PAR: photosynthetically active radiation. ....	69
<b>Table 6.</b> Antioxidant activities of reference compounds and microalgae extracts cultivated at two light intensities, $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light (LL)) and $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light (HL)). Different letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ )..	88
<b>Table 7.</b> Quantification of carotenoids ( $\mu\text{g.mg}^{-1}$ of extract) in MeOH/DCM dried extracts of microalgae cultivated at two light intensities, $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL) and $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL). Lut, lutein; t-Neo, t-neoxanthin; Siph, siphonaxanthin; Zea, zeaxanthin; $\beta$ -Car, $\beta$ -carotene; Fuco, fucoxanthin; cis-Fuco, cis-fucoxanthin; and Dt, diatoxanthine.....	92
<b>Table 8.</b> Quantification of carotenoids ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ of biomass) in fresh acetone extracts of microalgae cultivated at two light intensities, $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL) and $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL). Lut, lutein; t-Neo, t-neoxanthin; Siph, siphonaxanthin; Zea, zeaxanthin; $\beta$ -Car, $\beta$ -carotene; Viola, violaxanthin; Anthe, antheraxanthin; Fuco, fucoxanthin; cis-Fuco, cis-fucoxanthin; Dt, diatoxanthin; and Dd, diadinoxanthin. ....	94
<b>Table 9.</b> Pearson correlation test between major carotenoid content and antioxidant activities measured with oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and thiobabituric acid reactive substances (TBARS) assays. ....	96
<b>Table 10.</b> Pearson correlation test between carotenoid content ( $\text{mg g}^{-1}$ DW) and antioxidant activity measured with ORAC assay ( $\mu\text{g trolox equivalent mg}^{-1}$ DW) in <i>Nephroselmis</i> sp. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin ( <i>trans</i> and <i>cis</i> ); XCP, Xanthophyll Cycle Pigments:	

violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin; Lut, lutein; Lyco, lycopene; $\beta$ -Car, $\beta$ -carotene. .....	120
<b>Table 11.</b> Biomass and carotenoids productivity ( $\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) of <i>Nephroselmis</i> sp. during first batch culture and at steady state of continuous culture. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin ( <i>trans</i> and <i>cis</i> ); XCP, Xanthophyll Cycle Pigments (violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin); Lut, lutein; Lyco, lycopene; $\beta$ -Car, $\beta$ -carotene; TC, total carotenoid. Data are expressed as mean $\pm$ standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). .....	120
<b>Table 12.</b> Cell growth parameters, maximum growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ), latency time ( $\lambda$ ) and maximum cell concentration ( $C_{\text{max}}$ ) of <i>Tetraselmis</i> sp. cultured in PBRs in batch culture at pH 8.5 and 6.5. Data are calculated using a Gompertz model and expressed as mean $\pm$ standard error (SE, n = 3). Differences were considered significant at $p < 0.05$ .....	136
<b>Table 13.</b> Results of the statistical analysis on photosynthetic parameters obtained from rapid light curves carried out on <i>Tetraselmis</i> sp. in batch (General linear model) and continuous cultures (Kruskal Wallis test) in PBRs at pH 8.5 and 6.5. $F_v/F_m$ , Maximum quantum light utilization efficiency of Photosystem II (PSII); $r\text{ETR}_{\text{max}}$ , maximum electron transport rate in AU; $E_k$ , light saturation coefficient in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Alpha, maximum light utilisation coefficient for photosystem II; NPQ induc, Non-Photochemical Quenching induced during RLC. Values are significantly different when $P < 0.05$ . .....	142
<b>Table 14.</b> Results of the general linear model analysis on Non-Photochemical Quenching (NPQ) and Relative Quantum Efficiency (RQE) of <i>Tetraselmis</i> sp. in batch (sampling day 2, 4, 6, 11 and 18) and continuous cultures (steady states) in PBRs at pH 6.5 and 8.5 over the induction and dark recovery (Time). Values are significantly different when $P < 0.05$ .....	144
<b>Table 15.</b> Results of the multifactorial and single ANOVAs to assess the effect of pH, sampling day (early and late stationary phase), and culture systems (batch vs continuous cultures) on antioxidant activities ( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of <i>Tetraselmis</i> sp.. Values are significantly different when $P < 0.05$ .....	145

## Liste des annexes

<b>Annexe 1.</b> Microphotographie des 12 espèces de microalgues étudiées .....	199
<b>Annexe 2.</b> Carotenoids distribution among the twelve microalgae species studied.....	200
<b>Annexe 3.</b> Microphotography of <i>Nephroselmis</i> sp.....	201
<b>Annexe 4.</b> Absorbance at 680 nm and residual nitrate concentration ( $\mu\text{M}$ ) over time of <i>Nephroselmis</i> sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity and carotenoids analysis. Data are expressed as mean $\pm$ standard error (SE, n = 2).....	202
<b>Annexe 5.</b> Pearson's correlation analysis between cell concentration in cell $\text{mL}^{-1}$ and light absorbance at 680 nm.....	203
<b>Annexe 6.</b> Phylogenetic tree of <i>Nephroselmis</i> sp. N3C46 based on 18S rRNA sequences. .	204
<b>Annexe 7.</b> Residual phosphate concentration ( $\mu\text{M}$ ) in the medium over time of <i>Nephroselmis</i> sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity measure and carotenoids analysis. Data are expressed as mean $\pm$ standard error (SE, n = 2).....	205
<b>Annexe 8.</b> HPLC chromatogram at 450 nm of ethanol extract of <i>Nephroselmis</i> sp.. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin; Viola, violaxanthin; Anthe, antheraxanthin; Zea, zeaxanthin; Lut, lutein; Chl, chlorophyll; Lyco, lycopene; $\beta$ -car, $\beta$ -carotene; Car 54, unidentified carotenoid (see Serive et al. (2017) for UV-vis spectrum of Car 54 in HPLC system).....	206
<b>Annexe 9.</b> Pigment composition of <i>Nephroselmis</i> sp. ( $\text{mg g}^{-1}$ DW) at different time of the culture. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin ( <i>trans</i> and <i>cis</i> ); XCP, Xanthophyll Cycle Pigments (violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin); Lut, lutein; Lyco, lycopene; $\beta$ -Car, $\beta$ -carotene; TC, total carotenoids; Chl <i>a</i> , chlorophyll <i>a</i> ; Chl <i>b</i> , chlorophyll <i>b</i> . Data are expressed as mean $\pm$ standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). .....	207





## Liste des abréviations

$\mu_{\max}$	Taux de croissance maximal
$^1\text{Chl}^*$	Chlorophylle excitée à l'état singulet
$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
$^3\text{CAR}^*$	Caroténoïde triplet
$^3\text{Chl}^*$	Chlorophylle excitée à l'état triplet
$^3\text{O}_2$	Oxygène triplet
$^3\text{P680}^*$	Paire spéciale de chlorophylle a à l'état triplet
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidino-propane)
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
$\text{ABTS}^{+\cdot}$	Radical cation ABTS
ACOX	Acyl-coenzyme A oxydase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
APX	Ascorbate peroxydase
AsA	Ascorbate réduit
AUC	Aire sous la courbe
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
C:N	Ratio carbone : azote
CAT	Catalase
CCA	Copper Chelating Activity
CCM	CO <sub>2</sub> concentrating mechanism
Chl	Chlorophylle
C <sub>max</sub>	Concentration maximale
DHA	Déhydroascorbate
DHAR	Déhydroascorbate réductase
DIC	Dissolved inorganic carbon
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
DW	Dry weight
Ek	Coefficient de saturation lumineuse
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FCA	Ferrous Chelating Activity
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power

FTC	Ferric Thiocyanate assay
Fv/Fm	Rendement quantique maximal du photosystème II
GOX	Glycolate oxydase
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion reductase
GSH	Glutathion oxydé
GS-SG	Glutathion réduit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HAT	Hydrogen atom transfer
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical perhydroxyle
IC <sub>50</sub>	Concentration d'inhibition 50
L <sup>•</sup>	Radical alkyle
LHC	Light harvesting complex
LOO <sup>•</sup>	Radical peroxyde
LOOH / ROOH	Hydroperoxyde
MAA	Mycosporine like-amino acid
MDA	Malondialdéhyde
MDHA	Monodéhydroascorbate
MDHAR	Monodéhydroascorbate réductase
MeOH/DCM	Méthanol/Dichlorométhane
NO <sup>•</sup>	Oxyde nitrique
NO <sub>x</sub>	Nitrate + nitrite
NPQ	Non-photochemical quenching
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superoxyde
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAM	Pulse Amplitude Modulated
PAR	Rayonnement photosynthétiquement actif
PBR	Photobioréacteur
PS	Photosystème
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
QC	Contenu en carbone élémentaire
QN	Contenu en azote élémentaire

rETRmax	Maximum relative electron transport rate
RLC	Rapid light curve
ROS	Reactive oxygen species
RQE	Relative quantum efficiency
SET	Single electron transfer
SOD	Superoxyde dismutase
TAC	Total Antioxidant Capacity
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TC	Total carotenoid
TE	Trolox équivalent
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPC	Composés phénoliques totaux
UQH <sub>2</sub>	Coenzyme Q
US	Ultrasons
VDE	Violaxanthine dé-époxydase
XCP	Xanthophyll cycle pigments
ZE	Zéaxanthine époxydase
λ ou lambda	Temps de latence







---

# Introduction

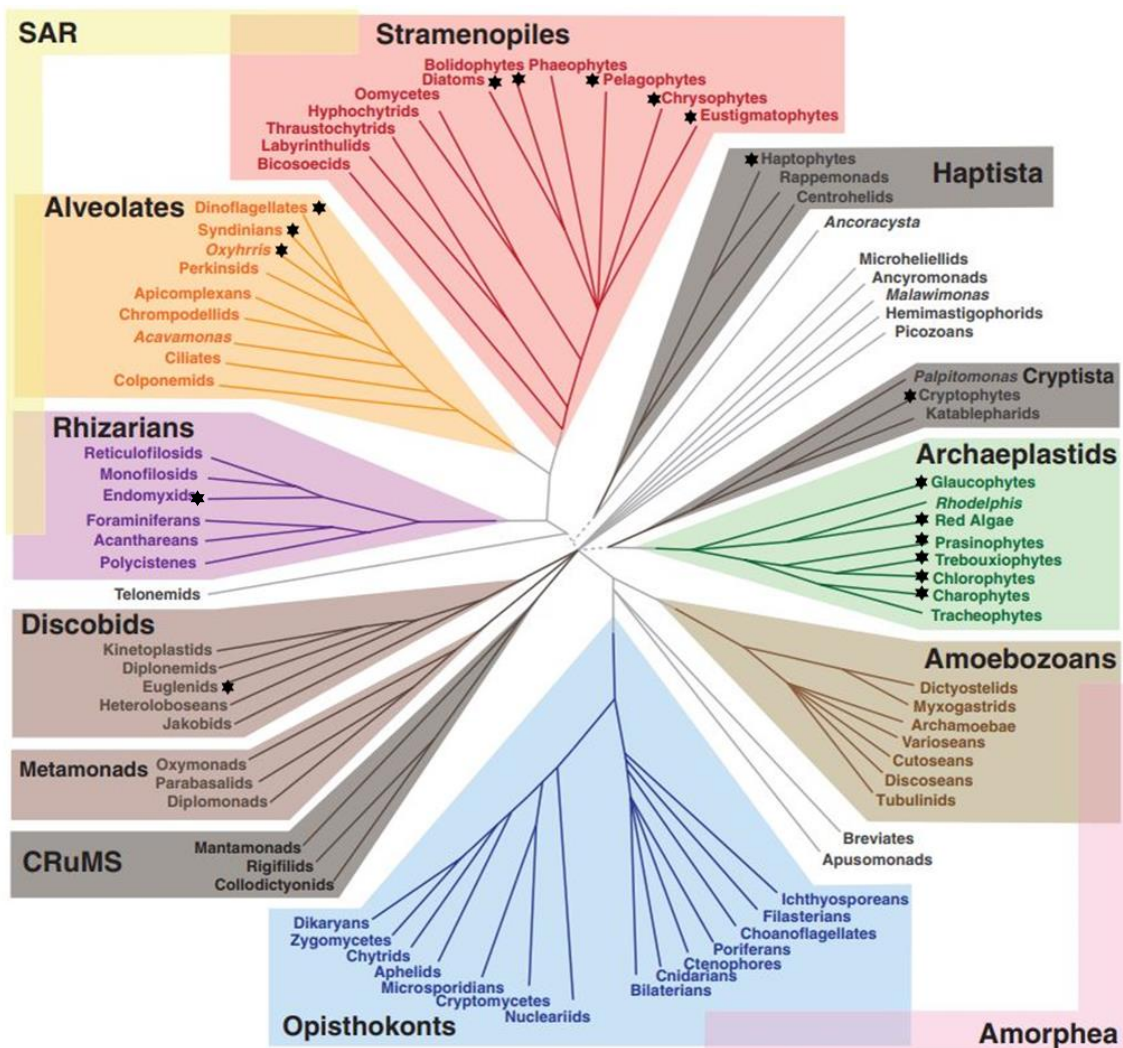
Contexte et objectifs de l'étude

---





Les microalgues regroupent un large assemblage polyphylétique de microorganismes unicellulaires photosynthétiques. Le terme microalgue est généralement réservé aux organismes eucaryotes mais les cyanobactéries sont parfois associées aux microalgues bien qu'elles possèdent, du fait de leur structure procaryotique, des caractéristiques très différentes (Baroukh et al. 2015; De Farias Silva et al. 2019). La diversité des microalgues est encore peu explorée aussi le nombre d'espèces est-il difficile à évaluer, et les estimations varient de 30 000 à 1 million d'espèces (Guiry 2012). Les microalgues seraient issues d'après les dernières études phylogénétiques d'au moins dix-huit lignées phylogénétiques distinctes dans sept groupes différents (Figure 1) (Keeling and Burki 2019). En comparaison, les végétaux supérieurs n'occupent que le groupe des Archaeplastides, mettant en évidence l'extraordinaire diversité des microalgues.



**Figure 1.** Arbre phylogénétique des eucaryotes (Keeling and Burki 2019); ★ lignées taxonomiques contenant des microalgues

Cette grande diversité phylogénétique associée à des diversités morphologique, métabolique et biochimique ont permis aux microalgues de coloniser tous les environnements aquatiques marins, saumâtres et dulcicoles mais également les environnements plus extrêmes tels que les glaciers, la neige, les sources acides ou chaudes. En effet, les microalgues présentent une grande diversité de par leurs formes (ronde, cylindrique, ovoïde, fusiforme, ou en colonie), leurs tailles (de quelques microns à plusieurs centaines de microns) et leurs structures externes très diversifiées (frustules siliceux des diatomées comportant parfois des soies, thèques cellulodiques des dinoflagellés, tests en carbonate de calcium des coccolithophores). Elles peuvent former des chaînes ou des colonies, être benthiques, dériver dans la colonne d'eau ou se déplacer grâce à la présence de flagelles. Les métabolismes sont également variés. Par exemple, la majorité des microalgues sont photoautotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent la lumière comme source d'énergie et les éléments minéraux présents dans l'eau pour synthétiser leur matière organique, cependant certaines espèces sont hétérotrophes (assimilation de carbone organique comme source d'énergie) ou mixotrophes (assimilation de l'énergie lumineuse et du carbone organique) (Perez-Garcia et al. 2011). Les microalgues sont aussi capables de synthétiser une large variété de molécules qui présentent un intérêt biotechnologique pour des applications en nutraceutique, cosmétique, santé, alimentation humaine et animale, telles que des lipides (par exemple oméga 3 et oméga 6), des protéines, des vitamines, des pigments, des stérols, des polysaccharides, des toxines (Mimouni et al. 2012; Koller et al. 2014; Singh et al. 2017). Cette chimiodiversité est encore peu explorée et constitue un potentiel réservoir de nouvelles molécules avec des propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, anti-tumorales, antifongiques, antivirales, photo-protectrices, antioxydantes... (Mimouni et al. 2012; De Morais et al. 2015; Levasseur et al. 2020).

Au-delà de cette importante diversité, les microalgues présentent plusieurs avantages pour le développement d'applications biotechnologiques : elles ont un rendement photosynthétique légèrement plus élevé que les végétaux supérieurs et ont un accès direct à leur milieu nutritif ce qui permet d'obtenir de fortes croissances et productivités (Cadoret et al. 2014). De plus, la culture est réalisée en eau de mer pour les espèces marines et dans des structures situées sur des terres non arables, réduisant la compétition avec l'agriculture pour l'accès au foncier. En outre, les microalgues font preuve d'une grande plasticité c'est-à-dire que des modifications importantes de leur contenu biochimique peuvent se produire en réponse à des changements de leurs paramètres environnementaux. Cette capacité peut être exploitée en appliquant des conditions de culture spécifiques afin de favoriser la production de molécules d'intérêt (Paliwal et al. 2017; Chen, Wan, et al. 2017). L'ensemble de ces atouts font des microalgues une

ressource prometteuse et attractive. En effet, le marché des produits issus de microalgues était évalué à 32,60 milliards de dollars en 2017, et devrait atteindre selon les estimations 53,43 milliards d'ici 2026 (Alam et al. 2020).

C'est dans ce contexte que le programme AMICAL (Aquaculture de Microalgues en Nouvelle-Calédonie) a débuté en 2011 dans le cadre d'un partenariat entre l'Adecal Technopole et l'Ifremer. Ce programme a pour objectif d'étudier la faisabilité de la mise en place d'une filière innovante de production de microalgues en Nouvelle-Calédonie à partir d'espèces isolées localement, afin de participer à la diversification économique de l'île et valoriser la biodiversité locale.

La Nouvelle-Calédonie présente un contexte favorable pour le développement de cette activité : une grande biodiversité terrestre et marine (Myers et al. 2000; Payri et al. 2019) pouvant laisser espérer la présence d'une grande diversité d'espèces de microalgues, un climat tropical océanique tempéré favorable à une forte productivité, de larges surfaces inoccupées pour lesquelles il n'y pas de concurrence d'usage, une importante capacité de recherche et développement localisée et une filière aquacole très présente. De plus, l'exposition à l'environnement singulier de la Nouvelle-Calédonie (exposition importante aux UV et aux éléments traces métalliques d'origine terrestre) ont probablement permis aux microalgues de mettre en place des stratégies d'adaptations *via* la synthèse de métabolites spécifiques potentielleent bioactifs

La première étape du programme a consisté à bio-prospecter les eaux côtières calédoniennes afin d'isoler des microalgues et constituer une souchothèque. Ces espèces ont été sélectionnées pour leur taux de croissance élevé, car elles sont destinées à une filière de production de biomasse.

Des études de caractérisations biochimiques et physiologiques des microalgues sont à présent menées afin de déterminer les voies de valorisation les plus prometteuses. En parallèle, des essais de production pilote en conditions extérieures et l'évaluation de la rentabilité économique sont réalisés.

Les travaux menés se concentrent autour de deux volets :

- La valorisation des microalgues en nutrition et santé aquacole. Dans ce volet, les microalgues sont étudiées comme source potentielle de nutriments fonctionnels pouvant avoir un rôle sur la physiologie et la santé des animaux (crevette, holothurie, poisson, mollusque) qui les consomment.

- L'identification et la caractérisation de substances naturelles innovantes avec diverses propriétés biologiques : antibactériennes, antioxydantes, anti-UV, anti-inflammatoires, qui trouveront des applications en cosmétique et en nutrition-santé animale et humaine.

C'est dans le cadre de ce deuxième volet que ces travaux de thèse ont été menés en collaboration avec l'UNC (Université de la Nouvelle-Calédonie) afin d'étudier les propriétés antioxydantes d'une partie de la souchothèque AMICAL. Les antioxydants sont actuellement utilisés dans l'industrie cosmétique comme actifs ou conservateurs, agro-alimentaire comme conservateurs ou ingrédients fonctionnels et nutraceutique comme ingrédients entrant dans la composition de compléments alimentaires. Des molécules synthétiques sont souvent utilisées, cependant face à la demande croissante des consommateurs pour des produits plus « naturels », des alternatives aux antioxydants synthétiques sont recherchées. Des antioxydants naturels sont déjà disponibles sur le marché ; pour la majorité ils sont issus de végétaux terrestres, par exemple l'extrait de romarin autorisé comme conservateur en alimentation humaine ou le resvératrol extrait du raisin utilisé dans les produits cosmétiques. Les microalgues cependant offrent un grand potentiel par leur chimiodiversité, leur productivité et les possibilités de culture contrôlée et d'orientation métabolique.

Ainsi les deux grands objectifs de cette thèse sont (i) le criblage de l'activité antioxydante de microalgues isolées en Nouvelle-Calédonie et l'identification des métabolites responsables de l'activité ; (ii) l'étude de l'influence des facteurs environnementaux sur l'activité antioxydante des espèces de microalgues montrant le plus de potentiel à l'issue du criblage afin d'optimiser la production d'antioxydant.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

- Le **chapitre 1** est consacré à un état de l'art des connaissances sur l'activité antioxydante des microalgues, les méthodes d'évaluation de l'activité, les molécules impliquées et l'effet des paramètres de culture sur l'activité antioxydante.

- Le **chapitre 2** décrit la méthode d'isolement par « dilution-exclusion » en photobioréacteur qui a permis l'isolement de microalgues à partir de prélèvements réalisés sur plusieurs sites de la zone côtière calédonienne. Ces travaux ont abouti à la constitution de la souchothèque AMICAL.

- Le **chapitre 3** présente l'évaluation de l'activité antioxydante de plusieurs espèces de microalgues issues de la souchothèque AMICAL. Un criblage a été réalisé à l'aide de quatre tests antioxydants, sur douze espèces de microalgues cultivées à deux intensités lumineuses

différentes. De plus, ce criblage a été couplé à une analyse pigmentaire afin de relier l'activité antioxydante mesurée et la composition pigmentaire.

- Le **chapitre 4** s'intéresse aux effets des conditions de culture sur l'activité antioxydante de deux espèces identifiées comme les plus intéressantes en terme d'activité à l'issue de l'étape de criblage, *Nephroselmis* sp. et *Tetraselmis* sp.. Ce chapitre comporte deux parties : la première est consacrée à l'étude de la disponibilité en azote inorganique dissous sur l'activité antioxydante et le contenu en caroténoïdes de *Nephroselmis* sp., et la seconde partie s'intéresse aux effets de l'acidification du milieu de culture par injection de CO<sub>2</sub> et du mode de culture (batch vs continu) sur la croissance, l'activité antioxydante et la photophysologie de *Tetraselmis* sp..



---

# **Chapitre 1 - Etat de l'art**

---



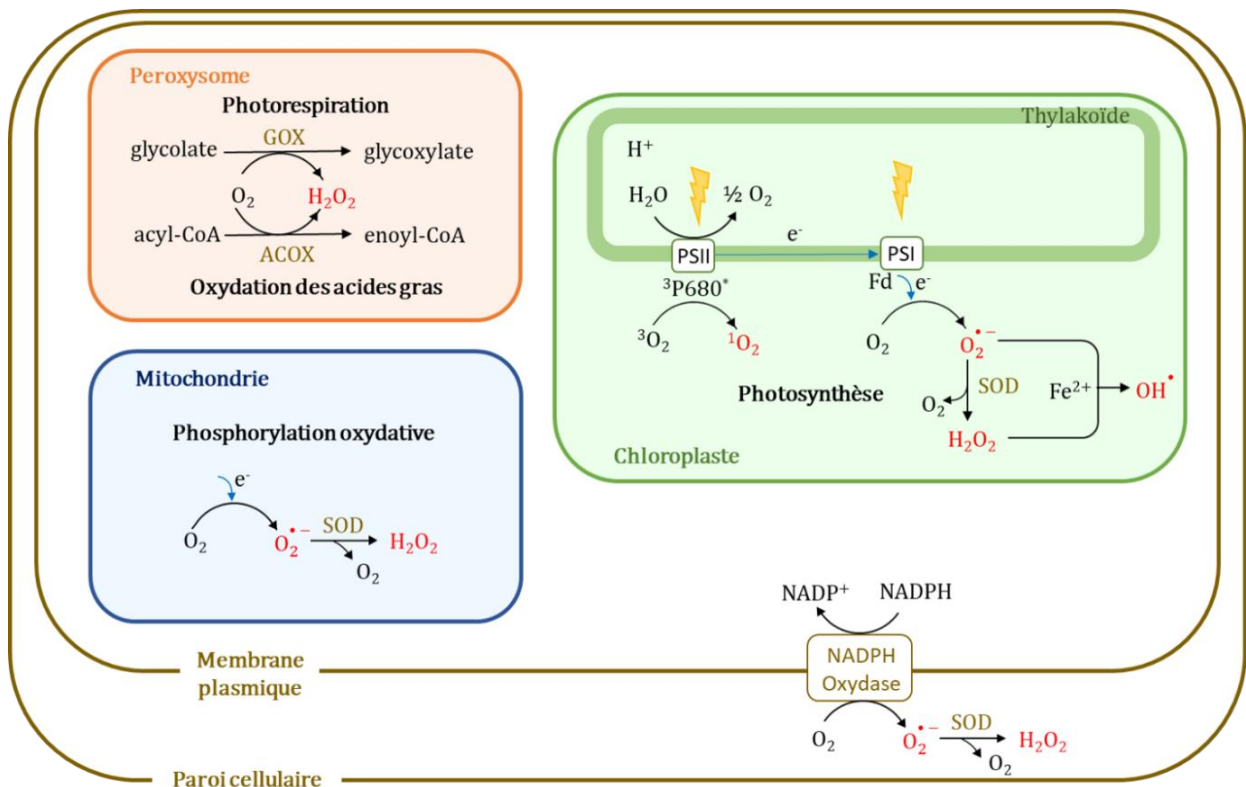


## 1. Le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène

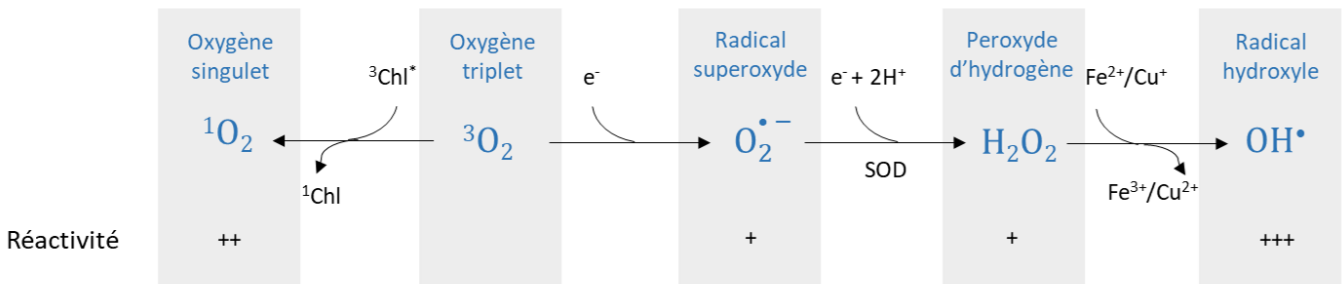
Le métabolisme aérobie engendre inévitablement la production de produits toxiques pour les organismes vivants, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Halliwell and Gutteridge 2015). Les ERO sont produites en permanence par le métabolisme normal, cependant certains changements des conditions environnementales sont à l'origine d'une augmentation de la production d'ERO dans la cellule telles que l'exposition à une forte intensité lumineuse, à des températures extrêmes, aux UV, à une forte concentration en métaux, à des fortes salinités ou à une carence en nutriments (Sharma et al. 2012). Cette surproduction peut provoquer un déséquilibre entre la quantité d'ERO produites et leur neutralisation, conduisant au stress oxydant. Si la production d'ERO dépasse la capacité de neutralisation de la cellule, des dommages oxydatifs importants peuvent avoir lieu au niveau des protéines, des lipides, et de l'ADN, pouvant entraîner la mort cellulaire (Halliwell and Gutteridge 2015). Les organismes photosynthétiques sont particulièrement exposés au stress oxydant du fait de la photosynthèse et de l'abondance de photosensibilisateurs (chlorophylle notamment) et d'acide gras polyinsaturés (AGPI) dans les membranes (Halliwell and Gutteridge 2015). Chez les microalgues, les principales sources d'ERO sont les chaînes de transport d'électrons dans les chloroplastes et mitochondries, l'activité de certaines peroxydases et oxydases, et les photosensibilisateurs tels que la chlorophylle (Saed-Moucheshi et al. 2014). Les ERO sont donc générées essentiellement au niveau des chloroplastes, des peroxysomes, et des mitochondries (Figure 2) (Cirulis et al. 2013).

### 1.1. Les espèces réactives de l'oxygène

« Les espèces réactives de l'oxygène » est une appellation qui désigne des dérivés de l' $O_2$  plus réactifs que l' $O_2$  lui-même. Cela regroupe des radicaux libres qui contiennent au moins un électron non apparié, ainsi que des molécules non radicalaires (Halliwell and Gutteridge 2015; Demidchik 2015). L' $O_2$  sous forme triplet ( $^3O_2$ ) est dans son état stable et possède deux électrons non appariés de spin parallèle sur ses orbitales moléculaires. L'activation de l' $O_2$  a lieu (i) soit par un transfert d'énergie suffisamment important pour inverser le spin de l'un des électrons, ce qui conduit à la formation de l'oxygène singulet  $^1O_2$ , (ii) soit par un transfert d'électron qui conduit à la réduction séquentielle de l' $^3O_2$  pour former le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) (Figure 3) (Apel and Hirt 2004).



**Figure 2.** Génération des ERO dans la cellule microalgale (adapté de Goiris et al.(2015) et Waszczak et al. (2018)).  $^1O_2$  : oxygène singulet,  $^3O_2$  : oxygène triplet,  $^3P680^*$  : paire spéciale de la chlorophylle a à l'état triplet, ACOX, Acyl-coenzyme-A oxydase, Fd : ferredoxine GOX : glycolate oxydase,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène,  $O_2^{\bullet -}$  : radical superoxyde,  $OH^{\bullet}$  : radical hydroxyle, PSI et PSII : photosystèmes I et II, SOD : superoxyde dismutase.



**Figure 3.** Génération des principales espèces réactives de l'oxygène.  $^3Chl^*$  : chlorophylle excitée à l'état triplet, SOD : superoxyde dismutase (adapté de Waszczak et al.(2018)).

### 1.1.1. L'oxygène singulet

Chez les végétaux, l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  est produit lors d'une exposition à une forte intensité lumineuse dans les chloroplastes au niveau du centre réactionnel du photosystème II (PSII) et dans une moindre mesure au niveau des complexes antennaires (Krieger-Liszkay et al. 2008; Triantaphylidès and Havaux 2009). Dans les complexes antennaires, la chlorophylle excitée à l'état triplet ( $^3\text{Chl}^*$ ) est formée à partir de la chlorophylle excitée à l'état singulet ( $^1\text{Chl}^*$ ) par une conversion intersystème (Telfer et al. 2008). Dans le centre réactionnel du PSII, une réaction de recombinaison de charge peut avoir lieu, entraînant la formation de la paire spéciale de chlorophylle *a* à l'état triplet ( $^3\text{P680}^*$ ) (Krieger-Liszkay et al. 2008). La chlorophylle à l'état triplet a une durée de vie plus longue qu'à l'état singulet, et peut ainsi réagir avec l' $^3\text{O}_2$  pour former le très réactif  $^1\text{O}_2$  (Gill and Tuteja 2010).

L' $^1\text{O}_2$  est responsable de dommages cellulaires importants car il peut oxyder les protéines, les lipides et les acides nucléiques autour de sa zone de production (Ledford and Niyogi 2005). Le centre réactionnel du PSII est ainsi particulièrement menacé, et l' $^1\text{O}_2$  est considéré comme le principal responsable de la photoinhibition notamment par sa contribution à la perte d'activité du PSII en inhibant sa réparation (Krieger-Liszkay et al. 2008; Nishiyama and Murata 2014). Les membranes des chloroplastes et des thylakoïdes, riches en AGPI sont également la cible de l' $^1\text{O}_2$ . En effet, l' $^1\text{O}_2$  peut directement se fixer sur les doubles liaisons des AGPI, formant ainsi des hydroperoxydes (LOOH) qui en se décomposant forment des radicaux libres propagateurs de la réaction en chaîne de peroxydation des lipides (Pospíšil and Yamamoto 2017).

### 1.1.2. Le radical superoxyde

La réduction de l'oxygène conduit à la formation du radical superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . La génération de ce radical a lieu dans le chloroplaste au niveau du photosystème I (PSI) au cours des réactions photochimiques de la photosynthèse et dans la mitochondrie au cours des réactions de phosphorylation oxydative pendant lesquelles des électrons s'échappent à différents niveaux de leur chaîne de transport. Le radical superoxyde est également produit au niveau des membranes plasmiques par l'activité de la NADPH oxydase (Demidchik 2015). Le radical superoxyde est considéré comme peu réactif car il n'a pas la capacité de modifier des macromolécules et est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (Ledford and Niyogi 2005). En revanche, sa forme protonée, le radical perhydroxyle  $\text{HO}_2^{\cdot}$  (pKa = 4.8), qui est retrouvée dans certains compartiments cellulaires où le pH est acide (lumen des thylakoïdes par exemple), est beaucoup plus réactive. Elle peut notamment initier la peroxydation des lipides (Asada 2004). De plus, la toxicité du radical superoxyde s'exerce de manière indirecte car il constitue le précurseur à la

formation de radicaux beaucoup plus réactifs, tel que le radical hydroxyle ou l'ion peroxydinitrite (Demidchik 2015).

### 1.1.3. Le peroxyde d'hydrogène

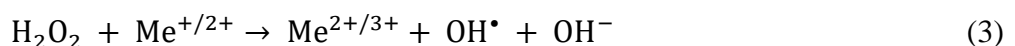
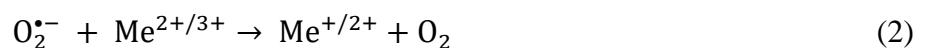
Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est formé par la réaction de dismutation du radical superoxyde (1). Cette réaction peut être spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



Les sites de production de peroxyde d'hydrogène sont donc identiques à ceux du radical superoxyde, mais celui-ci est également produit dans le peroxysome au cours de réactions d'oxydation des acides gras par l'acyl-coenzyme A oxydase (ACOX) et d'oxydation du glycolate par la glycolate oxydase (GOX) (Apel and Hirt 2004; Gill and Tuteja 2010). Le peroxyde d'hydrogène est considéré comme peu réactif cependant il reste particulièrement toxique. En effet, il peut traverser les membranes et diffuser dans toute la cellule et oxyder les groupes sulfhydryles ( $-SH$ ), provoquant la désactivation de certaines enzymes essentielles. Il peut également réagir avec l'ADN, et surtout réagir avec certains métaux de transition (fer et cuivre) permettant ainsi la formation du très réactif radical hydroxyle (Halliwell and Gutteridge 2015).

### 1.1.4. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du radical superoxyde par la réaction d'Haber-Weiss qui met en jeu deux réactions. Tout d'abord, un métal de transition, le fer ou le cuivre, est réduit par le radical superoxyde selon la réaction (2). Le métal de transition sous forme réduite est ensuite oxydé par le peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton (3), ce qui aboutit à la réaction nette (4) (Sharma et al. 2012).



Le radical hydroxyle est produit dans les mêmes compartiments cellulaires que le peroxyde d'hydrogène à condition que les métaux de transition soient présents sous forme réduite. Ainsi la réaction de Fenton a lieu dans le stroma des chloroplastes à partir du peroxyde d'hydrogène généré par les PS (Demidchik 2015). Ce radical a une durée de vie très courte mais il est

extrêmement réactif et peut oxyder tout type de molécules dans son entourage. Ainsi il peut initier la réaction en chaîne de peroxydation des lipides, et provoquer la dénaturation des protéines et des acides nucléiques. Il n'existe pas d'enzyme pour éliminer ce radical, aussi sa production en excès peut-elle entraîner la mort de la cellule (Richards et al. 2015).

### 1.1.5. La peroxydation des lipides

La réaction en chaîne de la peroxydation des lipides est une conséquence de l'action des ERO décrites ci-dessus, mais ce phénomène est aussi générateur d'autres radicaux libres très réactifs. Les radicaux hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$  et perhydroxyle  $\text{HO}_2^\bullet$  peuvent initier la réaction en chaîne de peroxydation des lipides par capture d'un atome d'hydrogène sur un carbone situé entre deux doubles liaisons d'un acide gras (Halliwell and Chirico 1993; Cillard and Cillard 2006). Cette réaction conduit à la formation d'un radical alkyle  $\text{L}^\bullet$  (5).



Le radical alkyle  $\text{L}^\bullet$  qui est instable réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde  $\text{LOO}^\bullet$  (6). Un hydrogène d'une molécule d'acide gras voisine peut être transféré au radical peroxyde  $\text{LOO}^\bullet$  pour former un hydroperoxyde  $\text{LOOH}$  et un nouveau radical alkyle  $\text{L}^\bullet$  (7) qui pourra à nouveau réagir avec l'oxygène moléculaire créant ainsi une réaction en chaîne (Halliwell and Chirico 1993; Gill and Tuteja 2010).



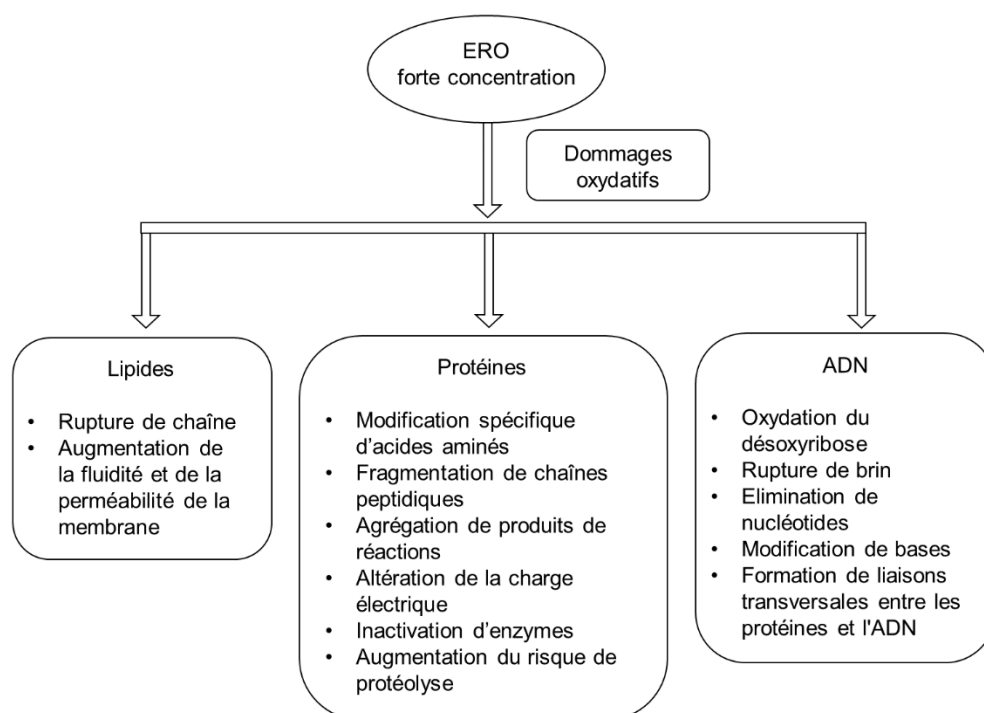
Des hydroperoxydes  $\text{LOOH}$  peuvent aussi être formés par l'addition d' $^1\text{O}_2$  sur les doubles liaisons des AGPI, et par l'action de lyxoygénases (Cillard and Cillard 2006). Les hydroperoxydes instables peuvent donner de nouveaux radicaux libres : en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  ils peuvent être réduits en radical alcoyle  $\text{LO}^\bullet$ , et en présence de  $\text{Fe}^{3+}$ , ils peuvent être oxydés en radical peroxyde  $\text{LOO}^\bullet$ . Ils peuvent aussi former des aldéhydes réactifs tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Pospíšil and Yamamoto 2017). Les membranes sont particulièrement touchées par la peroxydation des lipides du fait de l'abondance d'acide gras. Ainsi le fonctionnement membranaire peut être altéré par une diminution de la fluidité des membranes, une augmentation de leur perméabilité ainsi que l'inactivation d'enzymes, de protéines, de canaux ioniques et de récepteurs membranaires qui peuvent conduire à des dommages cellulaires (Cillard and Cillard 2006; Gill and Tuteja 2010).

### 1.1.6. Les espèces réactives de l'azote

Il existe d'autres substances appelées espèces réactives de l'azote qui pourraient être impliquées dans le stress oxydatif (Demidchik 2015). Il a été montré que les microalgues pouvaient produire de l'oxyde nitrique  $\text{NO}^*$ , un radical gazeux, cependant les mécanismes de production sont encore mal connus (Zhang et al. 2006; Li et al. 2013; Bidle 2016). L'oxyde nitrique est indirectement toxique pour la cellule car lorsqu'il est produit en forte concentration, il peut réagir avec le radical superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  conduisant à la formation de peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Le peroxynitrite pourra directement s'attaquer aux lipides, aux protéines et à l'ADN, ou former de nouveaux radicaux tout aussi réactifs (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2011).

## 1.2. Le double rôle des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO, lorsqu'elles sont produites en concentration qui dépasse les capacités de neutralisation de la cellule, peuvent provoquer des dommages oxydatifs importants parfois irréversibles au niveau des protéines, des lipides, et de l'ADN (Figure 4), aussi ont-elles longtemps été considérées uniquement comme des sous-produits toxiques du métabolisme (Sharma et al. 2012).



**Figure 4.** Conséquences du stress oxydant causé par un excès d'ERO sur les lipides, les protéines et l'ADN (Sharma et al. 2012).

Cependant, les ERO ont un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes de régulation et de signalisation cellulaire et le maintien d'une concentration basale d'ERO est indispensable (Foyer and Noctor 2005a; Mittler 2017). Ces mécanismes ont été mis en évidence chez les végétaux supérieurs mais sont encore relativement peu étudiés chez les microalgues. Ainsi, quelques travaux montrent que les ERO ont un rôle dans la réponse et l'acclimatation à un stress environnemental (Janknegt et al. 2009; Fischer et al. 2009; Tammam et al. 2011; Smerilli et al. 2017; Zhang et al. 2017) et dans les phénomènes de mort cellulaire programmée (Bidle 2016). Chez les végétaux supérieurs, il a été montré que les ERO sont également impliquées, entre autres, dans les réponses hormonales, la défense contre les pathogènes, la croissance et le développement (Figure 5) (Vanderauwera et al. 2009; Mittler 2017).



**Figure 5.** Le double rôle des espèces réactives de l'oxygène (Vanderauwera et al. 2009)

Ainsi l'équilibre entre la production et l'élimination des ERO est finement régulé grâce à un système diversifié d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Foyer and Noctor 2005a).

## **2. Le système de régulation des espèces réactives de l'oxygène : les antioxydants**

Un antioxydant est défini comme une substance, présente à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, qui retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat (Halliwell 1995). Les antioxydants peuvent intervenir en empêchant la formation d'ERO (par exemple des chélateurs de métaux ou des inhibiteurs d'enzymes pro-oxydantes) ou en neutralisant les ERO avant qu'elles ne causent des dommages sur les molécules cibles (Sies 1993). L'action des enzymes antioxydantes constitue le premier mécanisme de neutralisation des ERO, ces enzymes catalysant leur transformation en molécules moins réactives. La deuxième ligne de défense est

constituée des antioxydants non enzymatiques qui regroupent des petites molécules présentant différents mécanismes d'action contre les ERO (Sies 1993). Les principales molécules intervenant dans la défense antioxydante des microalgues sont présentées ci dessous.

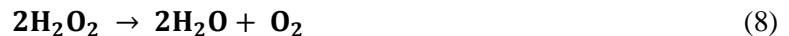
## **2.1. Les antioxydants enzymatiques**

### **2.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)**

Les SOD sont des métallo-enzymes présentes chez tous les organismes aérobies qui catalysent la dismutation de deux radicaux superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et en oxygène (voir paragraphe 1.1.3) (Sharma et al. 2012). Il existe plusieurs types de SOD qui se différencient par l'atome de métal situé sur leur site actif. Chez les microalgues trois types de SOD, également présentes chez les végétaux supérieurs, ont été décrites : la Mn-SOD, la Fe-SOD et la CuZn-SOD (Zbigniew and Wojciech 2006; Janknecht et al. 2009). Les SOD sont présentes dans tous les compartiments cellulaires, cependant la localisation subcellulaire des différents types de SOD varie en fonction du groupe taxonomique auquel les microalgues appartiennent (Wolfe-Simon et al. 2006).

### **2.1.2. Catalase (CAT)**

La CAT est une enzyme héminique ubiquiste qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène selon la réaction (8) (Mallick and Mohn 2000).



Cette enzyme a la particularité d'avoir une vitesse de réaction très élevée, elle peut donc convertir un grand nombre de molécules de peroxyde d'hydrogène en peu de temps (Sharma et al. 2012). Elle est cependant plus efficace lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène est élevée (Lesser 2006). La CAT est essentiellement localisée dans le peroxysome (Sharma et al. 2012).

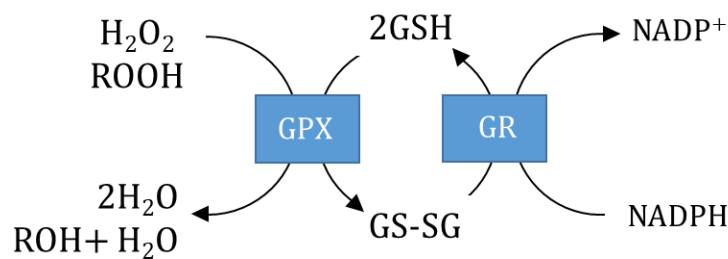
### **2.1.3. Peroxydases et réductases**

D'autres enzymes catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, il s'agit des peroxydases. A l'inverse de la catalase, ces enzymes ont besoin d'un substrat donneur d'électron qui sera oxydé selon la réaction générale (9) (Mallick and Mohn 2000; Sharma et al. 2012). Le donneur d'électron oxydé sera réduit par des réductases. Les deux peroxydases les plus importantes dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène sont la glutathion peroxydase (GPX) et l'ascorbate peroxydase (APX) qui utilisent respectivement le glutathion et l'ascorbate comme donneur d'électron (Cirulis et al. 2013).



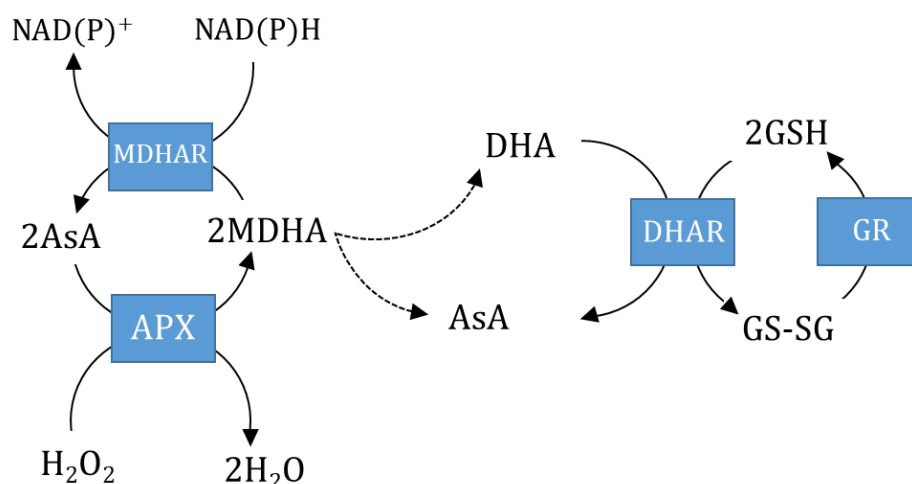


La **glutathion peroxydase** (Figure 6) catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et des hydroperoxydes organiques ( $\text{ROOH}$ ) à l'aide de deux molécules de glutathion réduit ( $\text{GSH}$ ) qui forment un pont disulfure aboutissant au glutathion oxydé ( $\text{GS-SG}$ ). Le  $\text{GSH}$  peut ensuite être régénéré par l'action de la **glutathion réductase** ( $\text{GR}$ ) qui oxyde le  $\text{NADPH}$  en  $\text{NADP}^+$  (Foyer and Noctor 2011). Le ratio forme réduite/forme oxydée ( $\text{GSH}/\text{GS-SG}$ ) est souvent utilisé comme un indicateur du stress oxydatif de la cellule (Sharma et al. 2012).



**Figure 6.** Cycle de la glutathion peroxydase. GPX : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GS-SG : glutathion oxydé,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène, ROH : alcool, ROOH : hydroperoxyde.

L'**ascorbate peroxydase** (Figure 7) utilise l'ascorbate réduit ( $\text{AsA}$ ) comme donneur d'électron pour détoxiquer le peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation d'eau et de monodéhydroascorbate ( $\text{MDHA}$ , forme partiellement oxydée). Le  $\text{MDHA}$ , qui est un radical, se dissocie spontanément en ascorbate et en déhydroascorbate ( $\text{DHA}$ , forme oxydée) qui est une molécule présentant peu de danger pour la cellule. L'ascorbate est régénéré par l'action de la **déhydroascorbate réductase** ( $\text{DHAR}$ ) à partir du  $\text{DHA}$  avec l'oxydation concomitante de  $\text{GSH}$  en  $\text{GSSG}$ . L'ascorbate peut également être régénéré par l'action de la **monodéhydroascorbate réductase** ( $\text{MDHAR}$ ) à partir du  $\text{MDHA}$  qui nécessite le  $\text{NADPH}$  comme co-facteur (Foyer and Noctor 2011).



**Figure 7.** Cycle ascorbate-glutathion. APX : ascorbate peroxydase, AsA : ascorbate réduit, DHA : déhydroascorbate, DHAR : déhydroascorbate réductase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GS-SG : glutathion oxydé,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène, MDHA : monodéhydroascorbate, MDHAR : monodéhydroascorbate réductase.

## 2.2. Les antioxydants non enzymatiques

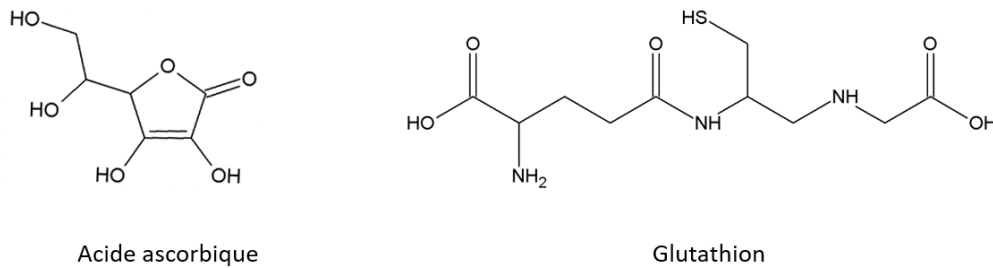
### 2.2.1. Ascorbate

L'ascorbate (ou sous forme acide : acide ascorbique, vitamine C, Figure 8) est un antioxydant hydrosoluble parmi les plus abondants synthétisés par les végétaux. Il est essentiellement présent dans le cytosol et les chloroplastes où il peut directement neutraliser les radicaux superoxyde et hydroxyle et l'oxygène singulet par transfert d'électron, en plus de son rôle dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène au cours du cycle ascorbate-glutathion (décrit ci-dessus, Figure 7) (Mallick and Mohn 2000; Gulcin 2020). L'ascorbate intervient également dans la protection de l'appareil photosynthétique par sa participation à la régénération des caroténoïdes du cycle des xanthophylles (cofacteur de la violaxanthine de-époxydase, voir paragraphe 2.2.5 sur le mode d'action des caroténoïdes) et de l' $\alpha$ -tocophérol liés aux membranes (Mallick and Mohn 2000; Gulcin 2020). Il a été montré que l'ascorbate peut aussi avoir une action pro-oxydante par la réduction de métaux de transition ( $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  en  $Cu^+$ ) qui peuvent à leur tour réduire le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle par la réaction de Fenton (voir paragraphe 1.1.4 sur le radical hydroxyle) (Duarte and Lunec 2005).

### 2.2.2. Glutathion

Le glutathion (Figure 8) est un tripeptide (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine) hydrosoluble présent dans tous les compartiments cellulaires qui joue un rôle crucial dans la réponse

antioxydante (Jaleel et al. 2009). Outre son rôle de co-facteur dans la neutralisation du peroxyde d'hydrogène par la glutathion peroxydase (Figure 6) et la régénération de l'ascorbate sous forme réduite via le cycle ascorbate-glutathion (Figure 7), le glutathion peut directement désactiver les radicaux superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et hydroxyle  $OH^{\cdot}$  et l'oxygène singulet  $^1O_2$ . De plus, tout comme l'ascorbate, le glutathion participe à la régénération de l' $\alpha$ -tocophérol sous sa forme réduite (Sharma et al. 2012).

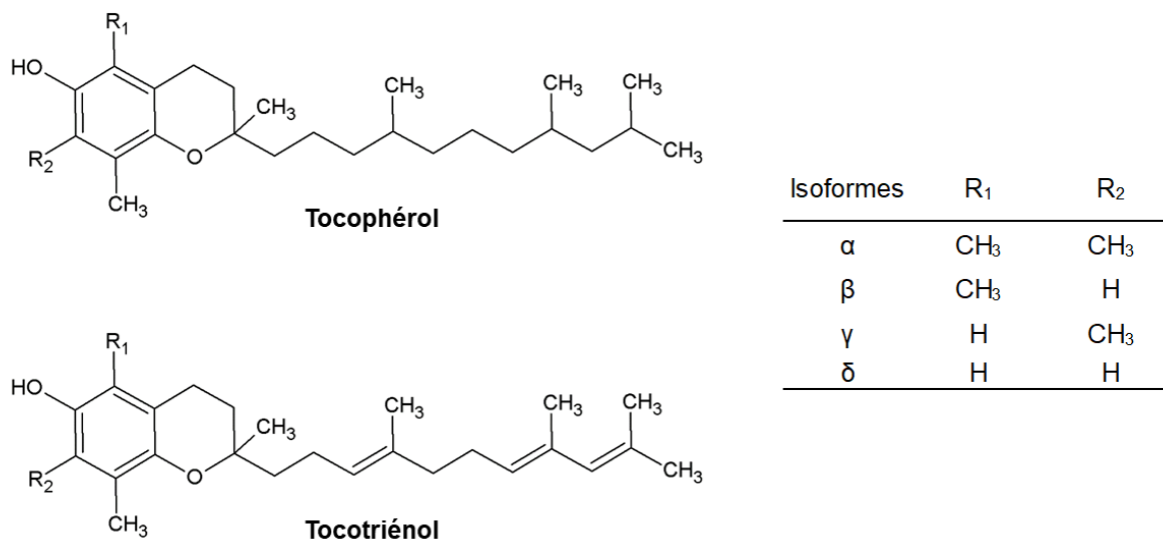


**Figure 8.** Structures de l'acide ascorbique et du glutathion.

### 2.2.3. Tocophérols

#### ➤ Structure

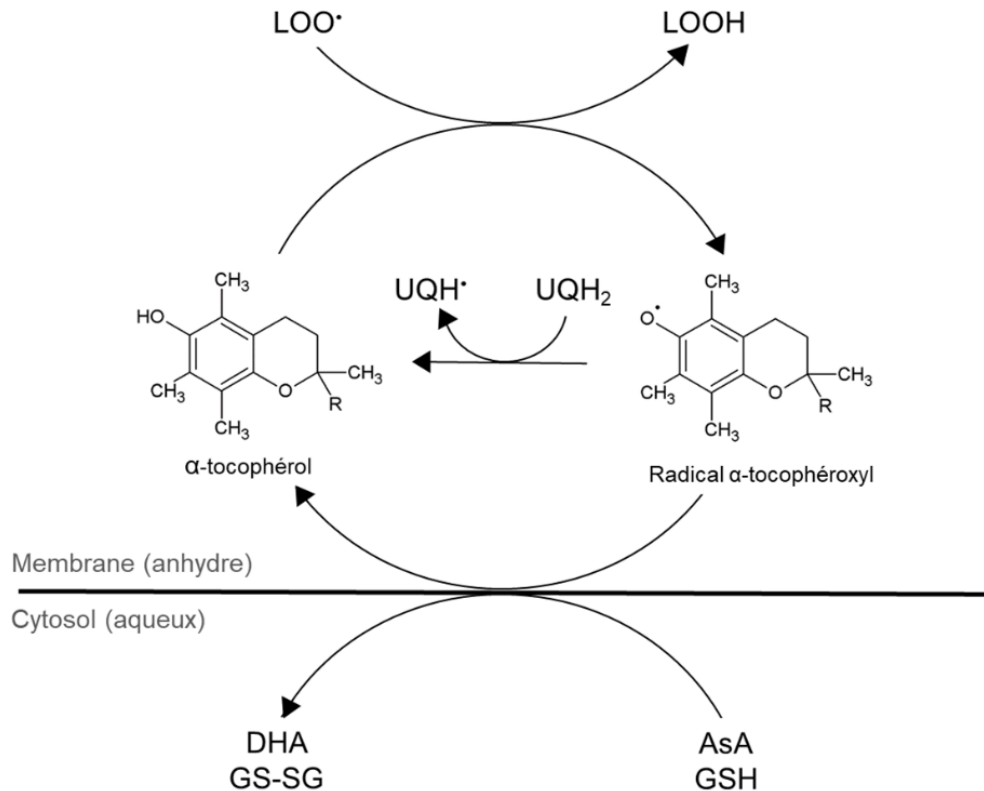
Les tocophérols (ou vitamine E) sont des molécules liposolubles uniquement synthétisées par les organismes photosynthétiques et localisées dans les bicouches lipidiques des membranes, essentiellement dans celles des chloroplastes (Herrera and Barbas 2001; Jaleel et al. 2009). La dénomination « vitamine E » regroupe en fait quatre formes naturelles de tocophérols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -) auxquelles on ajoute les quatre formes de tocotriénols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -). Les tocophérols et tocotriénols sont constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne phytyle latérale hydrophobe (Figure 9), les tocotriénols se différenciant des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale (Herrera and Barbas 2001).



**Figure 9.** Structures des tocophérols et tocotriénols

### ➤ Mécanismes d'action

Les tocophérols et tocotriénols ont la capacité de neutraliser les radicaux peroxydes lipidiques (LOO<sup>•</sup>) en cédant un atome d'hydrogène du groupe –OH du noyau chromanol, permettant ainsi de stopper la réaction en chaîne de peroxydation des lipides (Figure 10) (Herrera and Barbas 2001). La réaction aboutit à la formation d'un hydroperoxyde (LOOH) qui pourra être neutralisé par l'action de la glutathion peroxydase, et d'un radical tocophéroxyde (pour les tocophérols) ou tocotriénoxyde (pour les tocotriénols) qui sont peu réactifs. Les tocophérols et tocotriénols peuvent ensuite être régénérés par l'action de l'ascorbate et du glutathion à l'interface de la membrane et du cytosol, ou par la coenzyme Q (UQH<sub>2</sub>) dans la membrane (Herrera and Barbas 2001). Les tocophérols peuvent également désactiver l'oxygène singulet par deux mécanismes : un quenching physique par transfert de charge et une réaction chimique aboutissant à la formation de tocophérol quinone par une ouverture irréversible du noyau chromanol (Munné-Bosch and Alegre 2002).



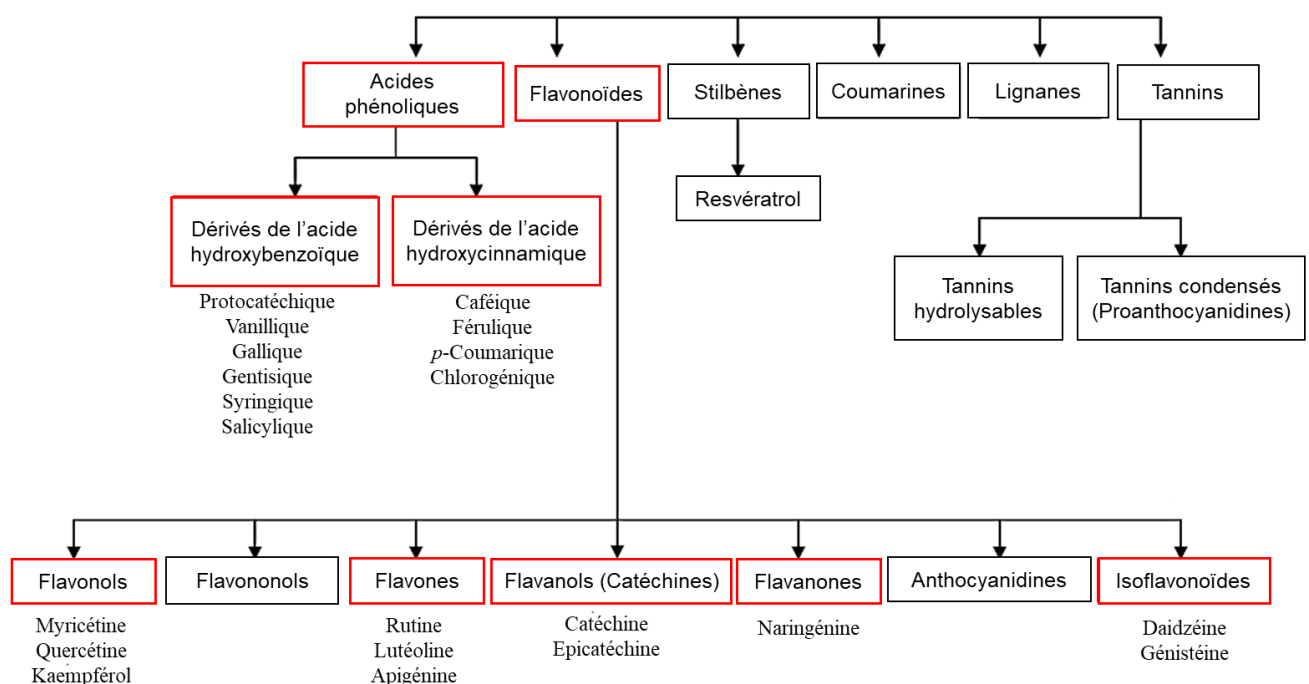
**Figure 10.** Neutralisation du radical peroxyde lipidique par l'α-tocophérol (d'après Herrera and Barbas (2001)). AsA : ascorbate réduct, DHA : déhydroascorbate, GSH : glutathion réduct, GS-SG : glutathion oxydé, LOO• : radicaux peroxydes lipidiques, LOOH : hydroperoxyde, UQH : coenzyme Q.

#### 2.2.4. Composés phénoliques

##### ➤ Structure, classification et distribution

Les composés phénoliques sont une vaste famille de molécules : plus de 8000 structures phénoliques ont été décrites à ce jour dans le règne végétal (Dai and Mumper 2010). Ces molécules contiennent au moins un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Les principales familles de composés sont les acides phénoliques, les tocophérols décrits plus haut, les flavonoïdes et les tannins ainsi que les moins communs tels que les stilbènes et lignanes (Figure 11) (Dai and Mumper 2010). Les composés phénoliques sont une classe importante d'antioxydants chez les végétaux supérieurs et les macroalgues, mais n'ont fait l'objet d'études que très récemment chez les microalgues. Il a cependant été montré que le contenu total en composés phénoliques contribuait à l'activité antioxydante d'extraits de microalgues (Hajimahmoodi et al. 2010; Custódio et al. 2012; Goiris et al. 2012; Aremu et al. 2015; Jayshree et al. 2016). Les principales molécules identifiées à ce jour chez les microalgues

sont le phloroglucinol (phénol simple) et des acides phénoliques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique dont les structures sont décrites Figure 12. Plusieurs études ont également montré la présence de faibles concentrations de flavonoïdes (Duval et al. 1999; Klejdus et al. 2010; Rico et al. 2013; Goiris et al. 2014; Chaudhuri et al. 2014; López et al. 2015; Safafar et al. 2015; Aremu et al. 2016; Jayshree et al. 2016; Yu et al. 2017; Haoujar et al. 2019; Smerilli et al. 2019; Cardoso et al. 2020). L'ensemble de ces molécules sont également retrouvées chez les végétaux supérieurs où leur concentration est globalement supérieure à celle des microalgues (Shahidi and Ambigaipalan 2015).

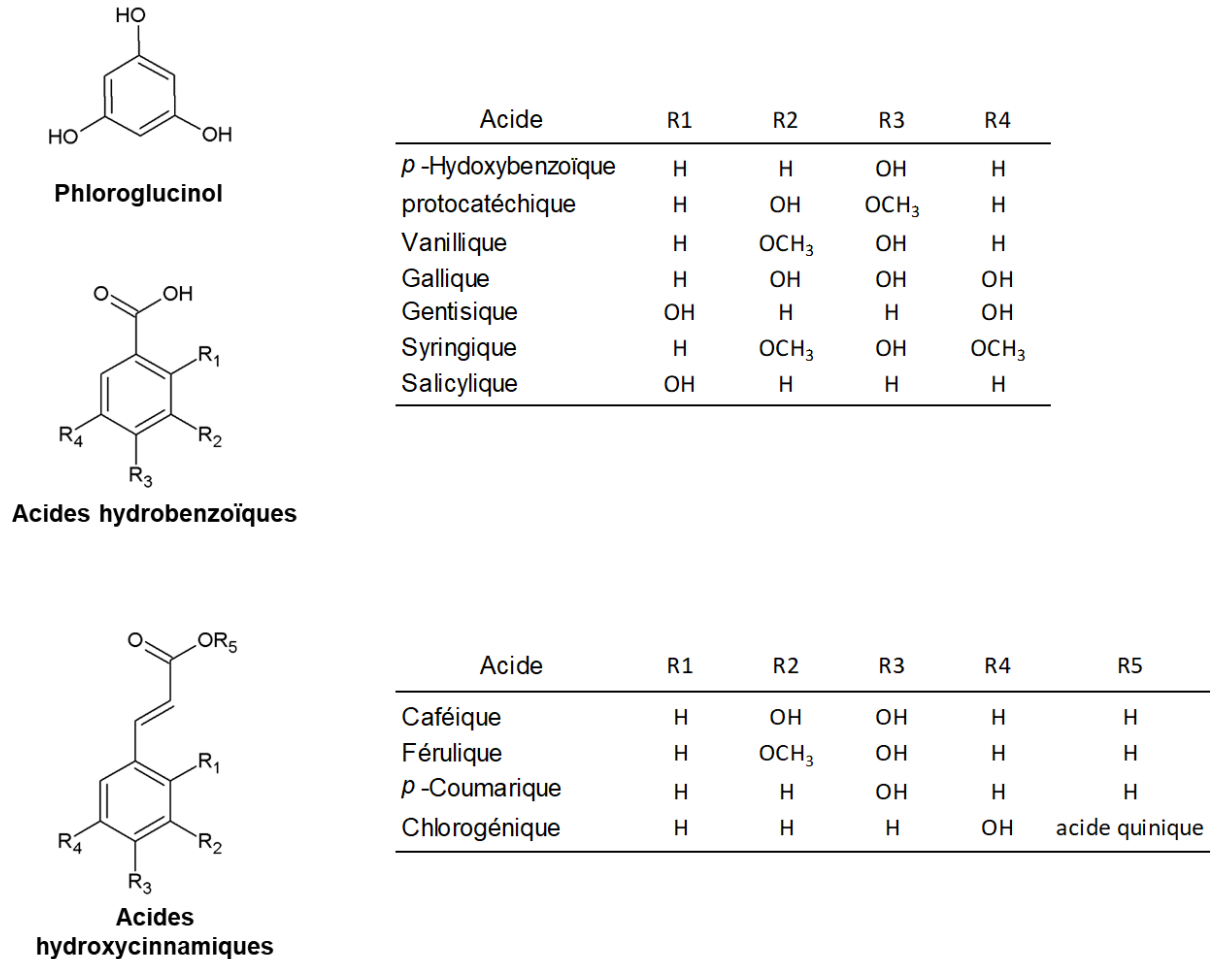


**Figure 11.** Classification des composés phénoliques naturels. Les classes identifiées chez les microalgues sont encadrées en rouges, et les molécules détectées chez les microalgues sont indiquées dessous (Klejdus et al. 2010; Rico et al. 2013; Goiris et al. 2014; López et al. 2015; Shahidi and Ambigaipalan 2015; Safafar et al. 2015; Foo et al. 2017; Haoujar et al. 2019; Cardoso et al. 2020).

### ➤ Mécanismes d'action

Les acides phénoliques peuvent neutraliser les ERO essentiellement par transfert d'atome d'hydrogène. L'activité antioxydante des différentes molécules sera directement liée à leur structure chimique telle que le nombre de groupe OH ou leur position sur le cycle aromatique (Shahidi and Ambigaipalan 2015). La réaction aboutit à la formation d'un radical phénoxy qui est stabilisé par la délocalisation de l'électron célibataire autour du cycle aromatique (stabilisation par résonance) (Shahidi et al. 1992). Les acides phénoliques ont aussi la capacité

d'inactiver les radicaux par transfert monoélectronique, et certains peuvent chélater les métaux de transition qui interviennent dans la réaction de Fenton empêchant ainsi la formation du très réactif radical hydroxyle (Leopoldini et al. 2011; Shahidi and Ambigaipalan 2015).



**Figure 12.** Structures du phloroglucinol et des acides phénoliques identifiés chez les microalgues

### 2.2.5. Caroténoïdes

#### ➤ Structure et classification

Les caroténoïdes sont les pigments les plus répandus dans la nature, plus de 750 molécules ont été décrites chez les algues, les végétaux supérieurs, les bactéries et les champignons (Takaichi 2011). Ce sont des molécules liposolubles appartenant à la famille des terpénoïdes contenant une chaîne centrale avec un système de double liaisons conjuguées qui peut porter des groupes terminaux cycliques. Les caroténoïdes sont séparés en deux groupes : les carotènes qui ne contiennent que des atomes de carbone et d'hydrogène, et les xanthophylles qui contiennent au moins un atome d'oxygène (fonctions hydroxyle, époxy, cétone par exemple) (Stahl and Sies

2003). Les structures des quelques caroténoïdes importants chez les algues sont présentées Figure 13.

➤ **Distribution chez les microalgues**

Les caroténoïdes sont essentiellement présents au niveau des complexes pigments-protéines dans la membrane des thylakoïdes, mais certaines espèces de microalgues peuvent également accumuler des caroténoïdes ( $\beta$ -carotène et astaxanthine) dans des globules lipidiques localisés dans le stroma du chloroplaste ou dans le cytoplasme (Solovchenko 2013). Certains caroténoïdes ne sont retrouvés que chez certaines classes d'algues, aussi peuvent-ils être utilisés comme marqueurs chémotaxonomiques (Takaichi 2011). Leur distribution parmi les différentes classes est résumée dans le Tableau 1.



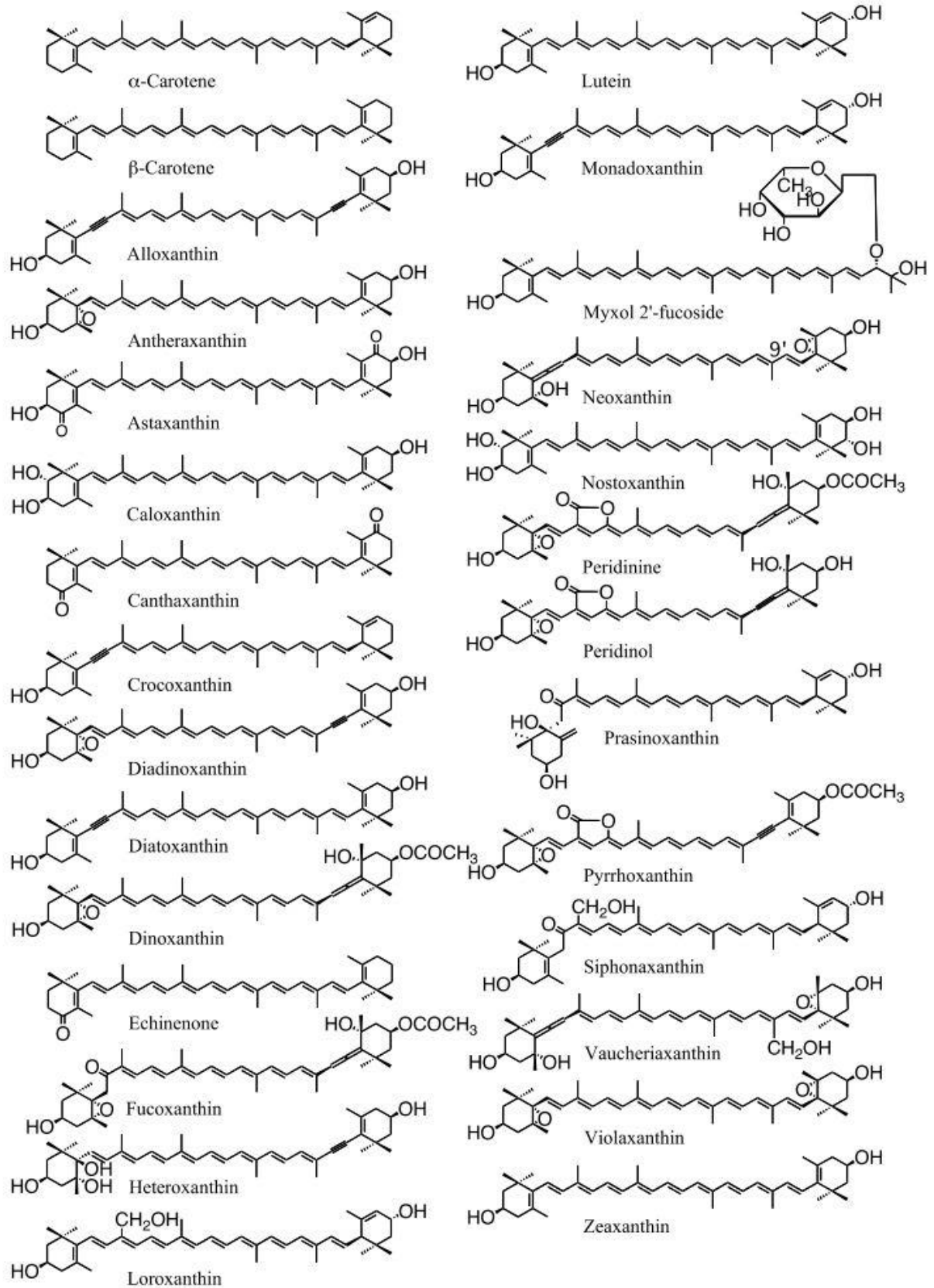


Figure 13. Structure de quelques caroténoïdes retrouvés chez les algues (Takaichi 2011)

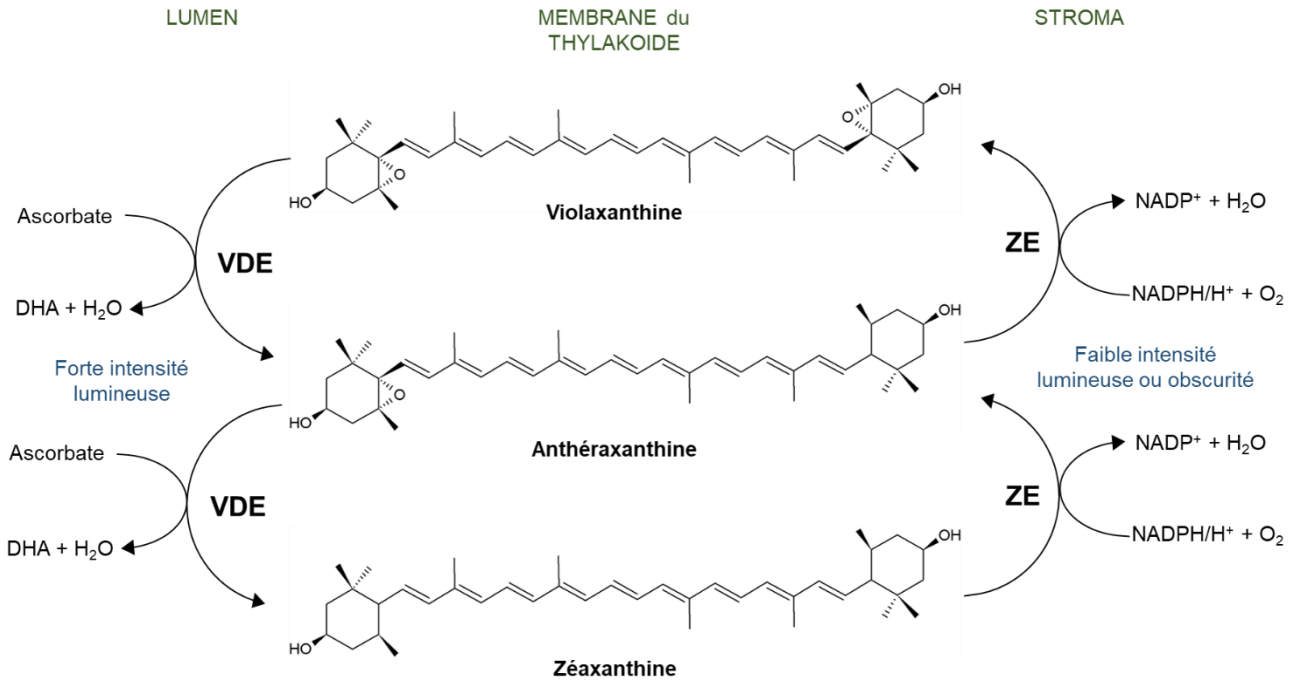
**Tableau 1.** Distribution des caroténoïdes chez les microalgues (d'après Takaichi (2011)).

Division Classe	Carotènes		Xanthophylles										Autres xanthophylles		
	$\beta$	$\alpha$	Zea	Viola	Neo	Dt	Dd	Fuco	Vau	Lut	Lo	Sx			
<b>Glaucophyta</b>	H		H												
<b>Rhodophyta</b>	H		H												
<b>Cryptophyta</b>		H	L											Alloxanthine (L), crocoxanthine (L), monadoxanthine (L)	
<b>Heterokontophyta</b>															
<b>Chrysophyceae</b>	H		L				L	L	H	L					
<b>Raphidophyceae</b>	H		H	L			L	L	L						
<b>Bacillariophyceae</b>	H		L				L	L	H						
<b>Xanthophyceae</b>	H		L				H	H						Esters de vau (L)	
<b>Eustigmatophyceae</b>	H			H							L				
<b>Haptophyta</b>	H		L				L	H	H					Esters de fuco (L)	
<b>Dinophyta</b>	L		L				L	H	L					Peridine (H)	
<b>Euglenophyta</b>	H		L		L		L	H				L	L		
<b>Chlorarachniophyta</b>	H		L	L	L					L	L			Esters de lo (L)	
<b>Chlorophyta</b>															
<b>Prasinophyceae</b>	H	L	L	H	H					L	L	H		Prasinoxanthine (L), esters de lo (L) et de sx (H)	
<b>Chlorophyceae</b>	H	H	L	H	H					H	L	L		esters de sx (L)	
<b>Trebouxiophyceae</b>	H		L	H	H					H					

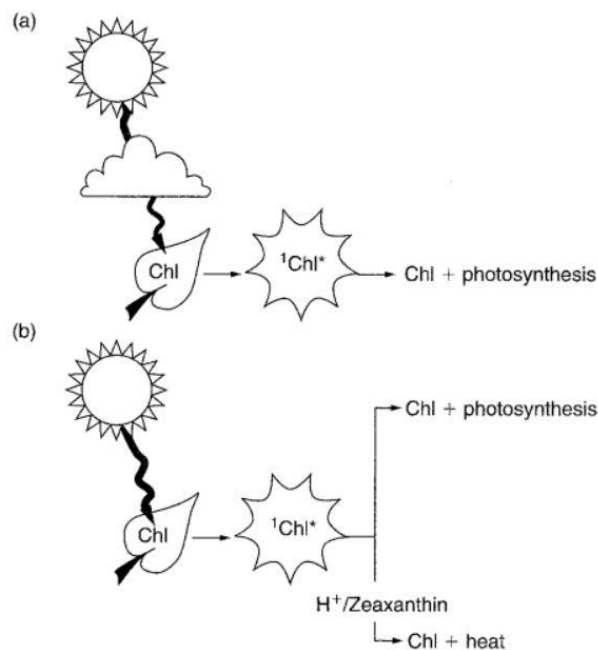
H : caroténoïdes majeurs pour la plupart des espèces de la classe, L : contenu faible pour la plupart des espèces de la classe, ou caroténoïde majeur pour quelques espèces de la classe, Zea : zéaxanthine, Viola : violaxanthine, Neo : néoxanthine, Dt : diatoxanthine, Dd : diadinoxanthine, Fuco : fucoxanthine, Vau : vaucheriaxanthine, Lut : lutéine, Lo : loroxanthine et Sx : siphonaxanthine.

### ➤ Mécanismes d'action

Le rôle des caroténoïdes est d'une part de transférer l'énergie lumineuse aux chlorophylles et d'autre part, de protéger le système photosynthétique en désactivant les ERO et en prévenant leur formation (Huang et al. 2017; Galasso et al. 2017). Le premier mécanisme de photoprotection fait intervenir des xanthophylles associés aux complexes antennaires du PSII qui permet la dissipation d'un excès d'énergie lumineuse sans dommages, selon une série de réactions appelée « cycle des xanthophylles » (Figure 14) (Demmig-Adams and Adams 1996; Eonseon et al. 2003). Lors d'un excès de lumière, la violaxanthine est convertie en anthéroxanthine puis en zéaxanthine par dé-époxydation assurée par la violaxanthine dé-époxydase qui utilise l'ascorbate comme cofacteur. Cette enzyme, liée aux thylakoïdes dans le lumen, est activée par un pH acide, un excès de proton dans le lumen signalant que l'énergie lumineuse absorbée excède la capacité de la chaîne de transport des électrons (Demmig-Adams and Adams 1996). La dé-époxydation de la violaxanthine en zéaxanthine est un phénomène très rapide de l'ordre de quelques minutes, et réversible lorsque l'intensité lumineuse devient faible ou à l'obscurité par l'action de la zéaxanthine époxydase. La zéaxanthine, contrairement à la violaxanthine, peut désactiver la  $^1\text{Chl}^*$  en dissipant son énergie sous forme de chaleur (Figure 15) (Demmig-Adams and Adams 1996; Jahns and Holzwarth 2012). Ce mécanisme de quenching non-photochimique (NPQ) diminue la durée de vie de la  $^1\text{Chl}^*$  et prévient donc la formation de  $^3\text{Chl}^*$  puis d'oxygène singulet dans le PSII. De plus, en dissipant l'énergie en excès, les possibilités de réduction de l' $\text{O}_2$  en radical superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dans le PSI sont minimisées (moins de fuites d'électron au niveau de la chaîne de transport) (Telfer et al. 2008). Le cycle de la violaxanthine a lieu essentiellement chez les chlorophytes. Il existe un cycle des xanthophylles alternatif, avec des fonctions similaires de photoprotection, chez certaines classes de microalgues (hétérokontes, haptophytes, euglénophytes et dinophycées, Tableau 1) pour lesquelles la diadinoxanthine est convertie en diatoxanthine (Goss and Jakob 2010).



**Figure 14.** Cycle des xanthophylles des chlorophytes. VDE : violaxanthine dé-époxydase, ZE : zéaxanthine époxydase, DHA : déhydroascorbate.



**Figure 15.** Représentation des conditions où la totalité (a) ou seulement une partie (b) de la lumière absorbée par la chlorophylle peut être utilisée pour la photosynthèse. Dans ce dernier cas, l'excès d'énergie qui ne peut pas être utilisé par la photosynthèse est dissipé sous forme de chaleur par la désactivation de la chlorophylle excitée à l'état singulet <sup>1</sup>Chl\* (Demmig-Adams and Adams 1996).

A forte intensité lumineuse, la probabilité de formation de  $^3\text{Chl}^*$  est importante malgré l'action du cycle des xanthophylles (Telfer et al. 2008). Dans les complexes antennaires, les caroténoïdes sont situés à proximité des chlorophylles, et peuvent ainsi rapidement neutraliser les  $^3\text{Chl}^*$  par des transferts triplet-triplet (10) avant qu'elles ne réagissent avec l' $^3\text{O}_2$  pour former de l' $^1\text{O}_2$  (Telfer et al. 2008). Les caroténoïdes peuvent également directement désactiver l'oxygène singulet s'il est formé (11) (Edge et al. 1997). Cette capacité de désactivation de l' $^1\text{O}_2$  est particulièrement importante dans le centre réactionnel du PSII où il n'y a pas de caroténoïdes à proximité immédiate de la paire spéciale de chlorophylle qui peut passer à l'état triplet puis réagir avec l' $^3\text{O}_2$  sans que la réaction ne soit neutralisée au préalable par les caroténoïdes (Telfer et al. 2008). Les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène) vont donc désactiver l' $^1\text{O}_2$  qui sera formé dans le centre réactionnel, protégeant ainsi le système photosynthétique de dommages oxydatifs. Les désactivations de la  $^3\text{Chl}^*$  et de l' $^1\text{O}_2$  aboutissent à la formation de caroténoïdes triplets ( $^3\text{CAR}^*$ ) qui se désexcitent sans dommage en dissipant l'excès d'énergie absorbée sous forme de chaleur (12) et peuvent à nouveau intervenir dans un cycle de désactivation (Telfer et al. 2008).



Les caroténoïdes sont considérés comme les molécules les plus efficaces pour désactiver l' $^1\text{O}_2$  grâce à leur système de doubles liaisons conjuguées. Ainsi, plus le nombre de doubles liaisons conjuguées sera important, plus le caroténoïde sera efficace (Edge et al. 1997).

Les caroténoïdes ont également la capacité de réagir avec les radicaux libres par 3 mécanismes : le transfert d'atome d'hydrogène (13), le transfert monoélectronique (14), et la formation d'adduit (15) (El-Agamey and McGarvey 2008).



Les interactions entre les caroténoïdes et les radicaux libres sont complexes car de nombreux paramètres entrent en jeu, tels que la nature du radical, la polarité du milieu réactionnel, la pression partielle en oxygène, les interactions avec d'autres antioxydants tels que l'ascorbate ou les tocophérols, et la concentration et la structure du caroténoïde (nombre de doubles liaisons conjuguées, présence et types de fonctions oxygénées, présence de groupes terminaux, configuration *cis* ou *trans*...) (Young and Lowe 2001; El-Agamey and McGarvey 2008). Les caroténoïdes peuvent par exemple réagir avec un radical peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) qui est ajouté à la

chaîne polyène du caroténoïde formant un adduit ROO-CAR<sup>\*</sup> qui pourra réagir avec un autre radical peroxyde formant un produit non radicalaire ROO-CAR-OOR permettant ainsi de rompre la réaction en chaîne de peroxydation des lipides. Ce phénomène a lieu à faible pression partielle d'oxygène, cependant, à plus haute pression partielle, le radical ROO-CAR<sup>\*</sup> peut réagir avec l'<sup>3</sup>O<sub>2</sub> pour former un radical ROO-CAR-OO<sup>\*</sup> qui agit comme un pro-oxydant et pourrait dans ce cas contribuer à la propagation de la peroxydation des lipides (El-Agamey and McGarvey 2008; Ribeiro et al. 2018).

### 2.2.6. Autres molécules antioxydantes

Il existe d'autres molécules antioxydantes plus spécifiques produites par certaines microalgues :

-Les mycosporines like-amino acids (MAA) forment une famille de trente-cinq molécules. Ce sont des molécules incolores hydrosolubles que l'on retrouve chez une large variété d'organismes marins (Wada et al. 2015). Chez les microalgues, les MAA les plus abondantes sont la mycosporine-glycine, la porphyra 334, la shinorine, l'asterina-330, le palythène, et le palythine (Sinha et al. 2007; Llewellyn and Airs 2010). Ces molécules ont pour principale fonction la protection contre les UV, mais il a été montré que certaines d'entre elles avaient également des propriétés antioxydantes. Elles peuvent notamment inhiber la peroxydation des lipides et neutraliser l'oxygène singulet et certains radicaux libres (Wada et al. 2015).

-Les polysaccharides sont des polymères constitués d'unités osidiques reliées par des liaisons glycosidiques attachées à la paroi cellulaire ou libérées dans le milieu (exopolysaccharides) (Raposo et al. 2013). Plusieurs polysaccharides issus de microalgues ont montré une activité antioxydante contre les radicaux libres, cependant cette activité *in vitro* reste assez faible (Tannin-Spitz et al. 2005; Balavigneswaran et al. 2013; Sun et al. 2014; Yu et al. 2019; Zhong et al. 2019).

-Les phycobiliprotéines sont des pigments hydrosolubles participant à la photosynthèse de certains groupes de microalgues. Elles sont composées d'une protéine et d'un chromophore appelé phycobiline (Glazer 1994). Elles peuvent neutraliser les ERO et chélater ou réduire les ions ferreux (Sonani 2015). Parmi les pigments on peut également citer la marennine, un pigment bleu vert produit par *Haslea ostrearia*, qui montre des propriétés anti-radicalaires et antioxydantes particulièrement intéressantes (Pouvreau et al. 2008).

### 3. Evaluation de l'activité antioxydante des microalgues : de la culture au criblage

L'évaluation des microalgues comme source d'antioxydant comporte plusieurs étapes toutes susceptibles d'affecter la teneur et la nature des antioxydants : la culture des microalgues, puis la récolte et le séchage de la biomasse, la réalisation d'extraits et enfin le criblage à l'aide de tests antioxydants. Ces étapes et les différentes options possibles sont présentées dans cette section ainsi que les résultats de criblages de l'activité antioxydante décrits dans la littérature ces vingt dernières années.

#### 3.1. La culture de microalgues

##### 3.1.1. Besoins fondamentaux

Les microalgues utilisées dans cette étude sont photoautotrophes (utilisation de l'énergie lumineuse et de CO<sub>2</sub> comme source de carbone), cependant il existe des espèces hétérotrophes qui assimilent du carbone et des nutriments organiques sans apport de photons ou mixotrophes qui assimilent à la fois du carbone organique et du CO<sub>2</sub>, à travers la photosynthèse (Perez-Garcia et al. 2011).

Pour cultiver des microalgues marines photoautotrophes il est nécessaire d'apporter :

-De la **lumière**, naturelle ou artificielle, indispensable à la réalisation de la photosynthèse. Un système d'agitation peut être ajouté pour améliorer l'accès des cellules à la lumière, cependant certaines espèces sont sensibles aux forces de cisaillement.

-Du **carbone** sous forme de CO<sub>2</sub> ou de bicarbonate. L'ajout de CO<sub>2</sub> par bullage acidifie le milieu ce qui peut permettre également de réguler le pH de la culture.

-Des **macronutriments** comprenant de l'azote minéral sous forme de nitrate, nitrite ou ammonium et du phosphore minéral sous forme de phosphate. Un apport de silice est également nécessaire pour les diatomées. Dans des conditions de fortes limitations nutritives, les microalgues sont capables d'utiliser du phosphore et de l'azote organiques (urée et acides aminés libres) (Cadoret et al. 2014).

-Des **micronutriments** comprenant des métaux (fer, cuivre, cobalt, zinc, manganèse...) et des vitamines (vitamines B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> et B<sub>7</sub>). Certaines espèces n'ont besoin que d'un type de vitamine ou peuvent complètement s'en affranchir (Croft et al. 2006).

Les nutriments sont apportés par des milieux d'enrichissement pour compléter et supplémenter les minéraux naturellement présents dans l'eau de mer. De plus, chaque espèce ou souche de microalgue a des préférences de température, pH, salinité, intensité lumineuse, au-delà desquels la croissance est dégradée, aussi peut-il être intéressant de contrôler ces paramètres

pour améliorer la productivité en biomasse. Ces paramètres vont également influencer la composition biochimique dont le contenu en antioxydants (voir paragraphe 3.5).

### **3.1.2. Modes de culture**

Il existe 3 modes de culture, un mode discontinu appelé culture en batch, un mode semi-continu, et un mode continu qui se différencient essentiellement par la manière dont les éléments nutritifs sont apportés à la culture.

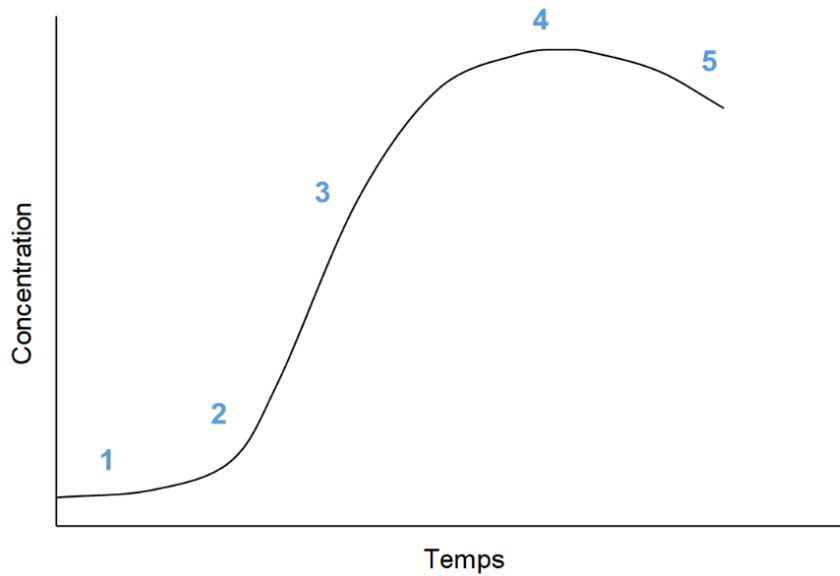
#### **➤ Culture en batch**

La culture en batch est le mode de culture le plus utilisé du fait de sa facilité de mise en œuvre à moindre coût, et du faible risque d'accumulation de contaminants. Un volume d'algue (en général 5 à 10 % du volume total) est inoculé dans un volume d'eau de mer enrichie avec des nutriments. La culture en batch évolue de manière dynamique du fait de variations constantes de l'intensité lumineuse avec l'augmentation de la densité cellulaire et de la concentration en nutriments qui sont consommés au fur et à mesure de la culture. La croissance est généralement séparée en cinq phases successives (Figure 16) :

- 1- Une phase de latence : les cellules s'acclimatent aux nouvelles conditions expérimentales (température, intensité lumineuse, pH...). Pendant cette phase la croissance est nulle.
- 2- Une phase exponentielle : les cellules se sont acclimatées et se divisent avec une vitesse exponentielle, la culture atteint son taux de croissance maximal.
- 3- Une phase de croissance : un ralentissement de la croissance a lieu en raison d'un début de limitation par la lumière ou les nutriments.
- 4- Une phase stationnaire : la concentration maximale est atteinte et la division cellulaire est nulle du fait d'une limitation totale par la lumière ou par une consommation complète d'au moins un des nutriments.
- 5- Une phase de sénescence : les réserves cellulaires sont épuisées conduisant à la mort des cellules.

La culture peut être prélevée pendant la phase de croissance pour inoculer un nouveau volume, ou être récoltée à tout moment pour analyses.

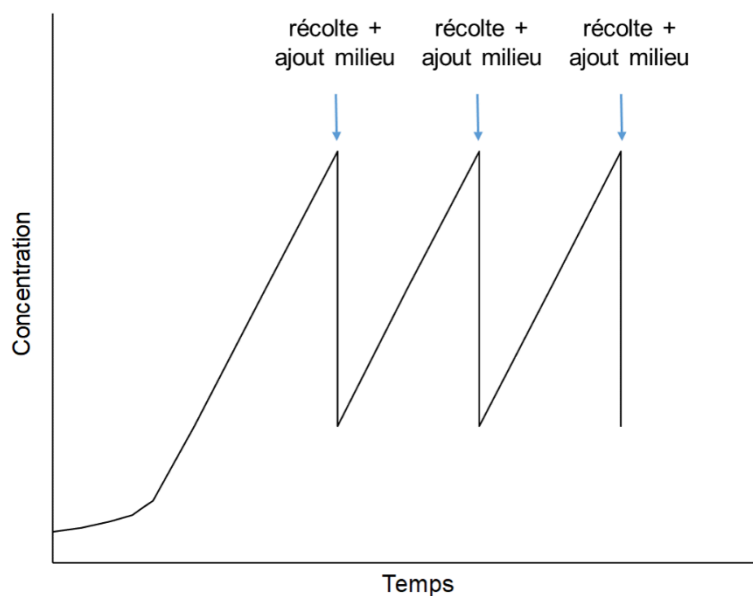




**Figure 16.** Représentation schématique d'une cinétique de croissance en batch.

#### ➤ Culture semi-continue

Avec ce mode de culture, une partie de la culture est récoltée périodiquement et est remplacée par du milieu de culture neuf pour permettre une nouvelle phase de croissance (Figure 17). Un quasi équilibre est atteint lorsque la concentration cellulaire et les paramètres de culture varient de manière identique entre chaque cycle d'alimentation.



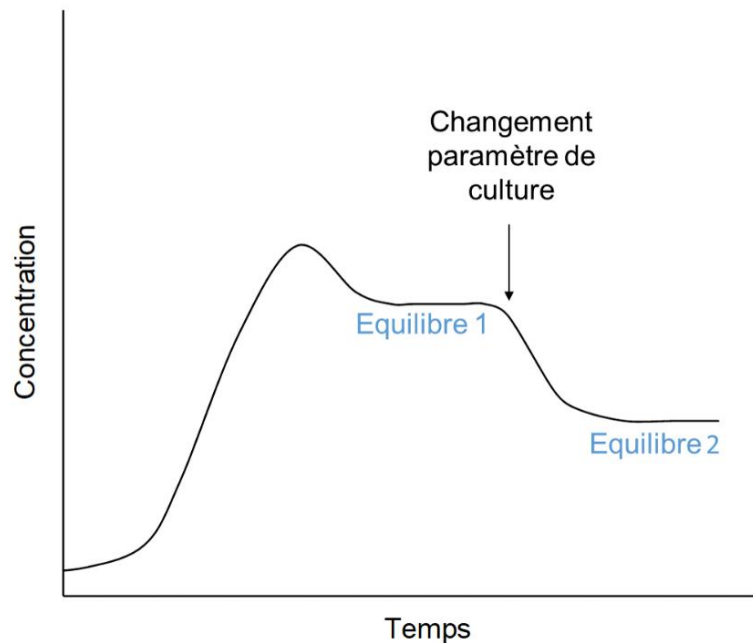
**Figure 17.** Représentation schématique d'une cinétique de croissance en batch alimenté

➤ **Culture en continu**

Avec ce mode de culture, généralement appliqué en photobioréacteur (PBR), du milieu nutritif neuf (eau + nutriments) est apporté constamment, et un volume de culture identique est récolté continuellement. Il existe deux approches :

-La culture en chemostat : du milieu de culture est fourni par une pompe dont on fixe le débit. La vitesse de croissance de la culture est donc imposée par le débit de la pompe. Si le débit imposé est supérieur à la vitesse de croissance de la culture, les cellules seront lessivées.

-La culture en turbidostat : la concentration cellulaire de la culture est fixée, et est maintenue constante par l'addition de milieu par une pompe asservie à un capteur sensible à la turbidité.



**Figure 18.** Représentation schématique d'une culture en continu

En fonction des paramètres de culture imposés, la culture atteindra un équilibre (Figure 18) où la vitesse de croissance sera égale au taux de dilution. Cet état d'équilibre peut en théorie être maintenu indéfiniment tant qu'aucune modification des paramètres de culture n'a lieu. La culture en continu présente l'avantage de maintenir les cellules dans un environnement stable et permet, à l'équilibre du système, d'obtenir une biomasse de qualité biochimique constante.

## 3.2. Récolte et séchage des microalgues

### 3.2.1. Procédés de récolte

La récolte de la biomasse est une étape critique de la production de microalgues du fait de la petite taille des cellules (1 à 100  $\mu\text{m}$ ), de leur faible concentration dans le milieu (0.1 à 10  $\text{g L}^{-1}$ ) et de la charge négative de la membrane de la plupart des microalgues qui empêche leur agrégation (Person et al. 2011; De Rosbo and Bernard 2014; Singh and Patidar 2018). Il n'existe pas de méthode universelle pour séparer les cellules microalgales de leur milieu de culture, la méthode utilisée dépendra de l'espèce (taille, densité de la cellule, fragilité), du volume à traiter et de l'utilisation finale. Plusieurs techniques ont été développées et peuvent être utilisées seules ou combinées.

#### ➤ Flocculation

La flocculation consiste à provoquer l'agrégation des cellules par une réduction ou neutralisation des charges négatives de la membrane des cellules. La flocculation peut être déclenchée par (i) une augmentation du pH (auto-flocculation), (ii) l'utilisation de produits chimiques (flocculation chimique) tels que des sels de fer et d'aluminium ou des polymères ioniques synthétiques ou naturels (chitosan par exemple), (iii) l'application d'électrodes à base de fer ou d'aluminium (électro-flocculation) ou (iv) l'application d'ultrasons (flocculation acoustique) (Wu, Zhu, et al. 2012; Molina Grima et al. 2013; González-Fernández and Ballesteros 2013; De Rosbo and Bernard 2014; Singh and Patidar 2018).

Cette technique est souvent utilisée comme étape de pré-concentration en combinaison avec d'autres techniques car la concentration finale est faible (inférieure à 5 % de matière sèche).

#### ➤ Centrifugation

Cette technique est l'une des plus utilisée à l'heure actuelle en laboratoire comme à grande échelle car elle est rapide, efficace (jusqu'à 15-30 % de matière sèche), ne nécessite pas de produits chimiques, et la majorité des microalgues peuvent être récoltées par centrifugation. Cependant elle est très coûteuse en terme d'investissement et de consommation d'énergie, aussi la récolte de grands volumes de culture peut-elle être couplée à une étape de pré-concentration pour avoir des volumes moins importants à traiter (De Rosbo and Bernard 2014). L'efficacité de la séparation dépendra des caractéristiques des cellules (taille, concentration cellulaire, densité), du type de centrifugeuse (centrifugeuse à bol, séparateur à assiettes, décanteur centrifuge ou hydrocyclone), du temps de séjour et de l'accélération (nombre de G) (Person et al. 2011; Molina Grima et al. 2013; Singh and Patidar 2018).

### ➤ **Flottation**

La flottation consiste à faire flotter les cellules à la surface pour ensuite écrémer la couche supérieure enrichie en microalgues. Certaines espèces ont naturellement tendance à flotter (en particulier les espèces riches en lipides), mais plus généralement le phénomène de flottation est provoqué par l'action de microbulles d'hydrogène créées par l'électrolyse de l'eau (électroflottation) ou l'action de petites bulles d'air (flottation par air dissous ou DAF utilisée pour le traitement des eaux usées) (Laamanen et al. 2016). Plusieurs facteurs influencent l'efficacité de la flottation tels que le pH, la salinité, la force ionique du milieu, la taille et la distribution des bulles ou l'ajout d'un flocculant. Cependant la concentration en biomasse dans la récolte reste assez faible (1 à 6 % de matière sèche dans le concentré) (Person et al. 2011; Laamanen et al. 2016; Singh and Patidar 2018).

### ➤ **Filtration**

La filtration consiste à retenir les cellules sur un filtre, la culture passant à travers le filtre par gravité, sous pression ou sous vide. Il existe une grande variété de filtres constitués de différents matériaux et diamètres de pores (Milledge and Heaven 2013). La filtration peut être plus ou moins fine, on distingue :

- La filtration frontale classique (diamètre de pore supérieur à 10  $\mu\text{m}$ ) : la culture à filtrer passe perpendiculairement au filtre. C'est un procédé simple mais réservé aux grosses cellules de plus de 40  $\mu\text{m}$  et qui est limité par le colmatage du filtre.
- La microfiltration (ou filtration tangentielle, diamètre de pore entre 0.1 et 10  $\mu\text{m}$ ) : la culture passe parallèlement au filtre et permet de récolter des cellules inférieures à 40  $\mu\text{m}$ . Le flux tangentiel retarde le colmatage. Ce procédé présente l'avantage d'être utilisable avec des espèces fragiles (Person et al. 2011; Molina Grima et al. 2013; Milledge and Heaven 2013).

### **3.2.2. Séchage**

Après récolte, les microalgues concentrées forment une pâte contenant encore 75 à 95 % d'eau. Ce taux d'humidité peut être problématique pour la conservation et l'extraction, aussi une étape de séchage est-elle nécessaire. Il existe différents procédés de séchage qui peuvent affecter la composition de la biomasse, aussi le choix de la technique doit-il tenir compte de l'utilisation visée. Les principaux procédés sont :

- **Le séchage solaire** : l'eau est évaporée par l'action du soleil. Ce procédé est très lent et le risque de détérioration de la biomasse est élevé (Chen et al. 2015; Show et al. 2015)

- **Le séchage par convection** : la biomasse est séchée par un flux d'air plus ou moins chaud. Cette technique est plus rapide que le séchage solaire, mais la qualité de la biomasse peut être impactée par la hausse de température (Chen et al. 2015; Show et al. 2015).
- **Le séchage par atomisation** : la pâte d'algue est pulvérisée en fines gouttelettes dans une enceinte verticale dans laquelle passe un courant d'air chaud pour évaporer l'eau. Le processus est très rapide (quelques secondes) et permet d'obtenir une poudre très fine, cependant certains composés thermosensibles tels que les pigments, les sucres ou les protéines peuvent être détériorés par la montée en température (Ryckebosch et al. 2011; Molina Grima et al. 2013).
- **Le séchage par lyophilisation** : la pâte d'algue est congelée puis la glace est sublimée sous vide. Ce procédé ne permet pas de traiter de gros échantillons et est assez long mais il est très doux, permet de conserver la qualité biochimique des microalgues, et peut fragiliser la membrane cellulaire ce qui facilitera l'extraction (Ryckebosch et al. 2011; Molina Grima et al. 2013; Kapoore et al. 2018), aussi cette méthode est-elle souvent privilégiée pour le séchage de biomasse destinée à la recherche d'activité chimique/biologique.

### 3.3. Extraction

L'extraction de la biomasse sèche de microalgue est de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la biomasse de microalgues, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Pour qu'une extraction soit efficace, le solvant doit pouvoir pénétrer dans la matrice cellulaire pour entrer en contact avec les molécules à extraire. Pour certaines espèces de microalgues, la paroi cellulaire peut être une véritable barrière (paroi épaisse, présence d'exopolysaccharides, frustule siliceux des diatomées...) pour le solvant aussi une perméabilisation ou une destruction de celle-ci est-elle nécessaire pour accéder au contenu cellulaire (Serive et al. 2012; Kapoore et al. 2018). A nouveau il n'existe pas de méthode universelle, le choix dépendra de l'espèce de microalgue et des molécules à extraire. Pour un criblage d'activité, l'objectif est d'obtenir un extrait brut le plus complet possible sans détériorer le produit. Les techniques simples sont généralement privilégiées :

-La **macération** dans un solvant est la technique la plus simple et parmi les plus utilisées pour réaliser des extraits bruts destinés à la recherche d'activité antioxydante, bien que longue et consommatrice de solvant (Tableau 3). Le temps de macération varie de quelques heures à quelques jours, et des solvants de polarités différentes peuvent être utilisés, seuls ou en mélange. Une étape de broyage (broyage à bille, homogénéisateur) est souvent ajoutée pour permettre un meilleur contact entre la matrice cellulaire et le solvant. La macération est aussi fréquemment combinée avec une extraction assistée par ultrasons.

-L'**extraction assistée par ultrasons** (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) est également très utilisée dans le cadre de la recherche d'activité antioxydante du fait de sa facilité de mise en œuvre, et du faible coût du matériel. Dans un milieu liquide, les ondes ultrasoniques génèrent des cycles de hautes et basses pressions. Des bulles d'air se forment dans le liquide à basse pression et grossissent jusqu'à atteindre une taille critique où elles explosent (phénomène de cavitation) générant des ondes de choc qui peuvent détruire la membrane cellulaire (Gerde et al. 2012; Azmir et al. 2013). Bien qu'efficace, cette technique peut altérer certains composés et notamment les antioxydants et les lipides par la formation de radicaux libres (Pingret et al. 2013).

D'autres techniques d'extractions plus efficaces, rapides et « vertes » existent mais sont moins utilisées dans le cadre de criblage probablement du fait du coût du matériel nécessaire ou de la quantité de matériel biologique nécessaire. On peut citer l'**extraction liquide sous pression** (PLE, Pressurized Liquid Extraction) qui consiste à utiliser des solvants sous haute pression et chauffés en dessous de leur point d'ébullition afin de les maintenir à l'état liquide (Esquivel-Hernández et al. 2017), l'**extraction aux fluides supercritiques** qui utilise un fluide (CO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O) dans des conditions supercritiques, c'est-à-dire à des température et pression supérieures aux valeurs de leurs points critiques (Ibañez et al. 2012) ou l'**extraction assistée par micro-ondes**, technique relativement peu onéreuse qui permet d'extraire rapidement et avec peu de dégradations de nombreux composés d'intérêt tels que les pigments, les lipides ou les polyphénols (Pasquet et al. 2011; Juin et al. 2015).

### 3.4. Evaluation de l'activité antioxydante des microalgues

#### 3.4.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro

Nous avons vu précédemment qu'il existe une multitude de molécules antioxydantes, avec des mécanismes d'actions différents, et une large variété d'ERO, aussi de nombreux tests antioxydants ont-ils été développés avec différents types de réaction. Les deux principaux mécanismes d'action des antioxydants (AH) pour désactiver les radicaux (X<sup>•</sup>), sur lesquels sont basés la majorité des tests chimiques *in vitro*, sont :

-**Le transfert d'atome d'hydrogène** (ou HAT pour Hydrogen Atom Transfer)



Ces réactions sont généralement rapides, elles sont complètes en quelques secondes à quelques minutes. L'efficacité de l'antioxydant est déterminée par sa capacité à donner un atome

d'hydrogène (énergie de dissociation homolytique), aussi plus la liaison A-H sera-t-elle faible, plus l'antioxydant sera efficace (Prior et al. 2005).

**-Le transfert monoélectronique** (ou SET pour Single Electron Transfer) :



Ces réactions sont plus lentes que les réactions de transfert d'hydrogène. La réaction est dépendante du pH, et l'efficacité de l'antioxydant est principalement déterminée par son potentiel d'ionisation. En général le potentiel d'ionisation diminue avec l'augmentation du pH conduisant à une augmentation de la capacité à donner un électron par déprotonation (Prior et al. 2005).

D'autres méthodes permettent également d'évaluer la capacité des antioxydants à chélater les métaux de transition ou à inhiber la réaction en chaîne de peroxydation des lipides. Les tests chimiques *in vitro* les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des microalgues sont recensés dans le Tableau 2, et les tests utilisés dans le cadre de la thèse sont décrits plus précisément. Il est important de préciser qu'il n'y a pas de test idéal, et qu'il est nécessaire d'utiliser plusieurs tests qui ont des mécanismes d'action différents pour évaluer la capacité antioxydante d'un extrait ou d'une molécule (Frankel and Meyer 2000; Prior et al. 2005; Carocho and Ferreira 2013).

**Tableau 2.** Principales méthodes chimiques utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des microalgues. HAT : hydrogen atom transfer, SET : single electron transfer.

Nom du test	Mécanisme	Principe	Détection	Mesure	Références
<b>ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)</b>	HAT	mesure de la neutralisation par un antioxydant du radical peroxyde généré par la décomposition thermique de l'AAPH( 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride), ralentissant la baisse de fluorescence par oxydation de la fluorescéine	fluorimétrie	excitation 485 nm émission 528 nm	(Cao et al. 1993; Ou et al. 2001)
<b>Test du blanchiment du <math>\beta</math>-carotène</b>	HAT	mesure de l'inhibition de l'oxydation du $\beta$ -carotène (décoloration) provoquée par des produits radicalaires issus de la peroxydation de l'acide linoléique	colorimétrie	absorbance à 434 nm	(Kenny et al. 2015)
<b>ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)</b>	HAT/SET	mesure de l'absorbance du radical cation ABTS (bleu) qui se décolore lorsqu'il est réduit par un antioxydant	colorimétrie	absorbance à 734 nm	(Re et al. 1999)
<b>DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)</b>	SET majoritaire / HAT	mesure de l'absorbance du radical DPPH (violet) qui se décolore lorsqu'il est réduit par un antioxydant	colorimétrie	absorbance à 515 nm	(Brand-Williams et al. 1995; Molyneux 2004; Huang et al. 2005)
<b>Test du pouvoir réducteur</b>	SET	mesure de la réduction du ferricyanide de potassium en ferrocyanide de potassium qui se colore en bleu en réagissant avec du $\text{FeCl}_3$	colorimétrie	absorbance à 700 nm	(Pisoschi et al. 2016)
<b>FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</b>	SET	mesure de la réduction par un antioxydant du complexe $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) qui se colore en bleu en milieu acide	colorimétrie	absorbance à 593 nm	(Benzie and Strain 1996)
<b>TAC (Total Antioxidant Capacity) par la méthode du phosphomolybdate</b>	SET	mesure de la réduction du molybdène Mo (VI) en Mo (V) qui forme à pH acide un complexe phosphate-Mo (V) vert	colorimétrie	absorbance à 695 nm	(Prieto et al. 1999)
<b>FTC (Ferric Thiocyanate assay)</b>	SET	mesure de l'inhibition par un antioxydant de la formation du complexe $\text{Fe}^{3+}$ -thiocyanate provoquée par des hydroperoxydes issus de la peroxydation de l'acide linoléique	colorimétrie	absorbance à 500 nm	(Moon and Shibamoto 2009)



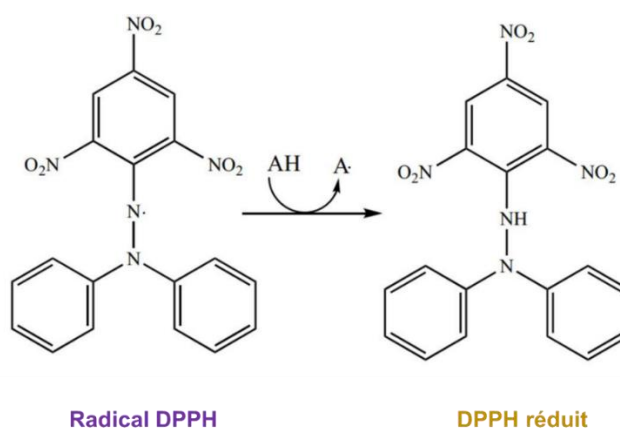
<b>Capacité de neutralisation du radical superoxyde</b>	SET	mesure de la neutralisation par un antioxydant du radical $O_2^{\cdot\cdot}$ généré par le système xanthine-xanthine oxydase ou la réaction du NADH avec la phenazine méthosulphate. La neutralisation du radical $O_2^{\cdot\cdot}$ inhibe la réduction du nitroblue tetrazolium (NBT) en un produit bleu, le formazan.	colorimétrie	absorbance à 560 nm	(Ewing and Janero 1995; Quick et al. 2000)
<b>FCA (Ferrous Chelating Activity)</b>	chélation	mesure de la chélation du $Fe^{2+}$ par un antioxydant concurrençant la chélation par la ferrozine qui forme un complexe violet avec le $Fe^{2+}$ .	colorimétrie	absorbance à 562 nm	(Işıl Berker et al. 2010)
<b>CCA (Copper Chelating Activity)</b>	chélation	mesure de la chélation du cuivre avec le pyrocatecol violet (PV). Le complexe bleu $CuSO_4$ -PV devient jaune quand le cuivre et le PV se dissocient en présence de chélateur	colorimétrie	absorbance à 632 nm	(Saiga et al. 2003)
<b>TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)</b>	oxydation des lipides	mesure de la formation d'aldéhydes, produits finaux de la peroxydation des lipides, qui se colorent en rose en présence d'acide thiobarbiturique	colorimétrie	absorbance à 534 nm	(Ghani et al. 2017)

### Tests antioxydants utilisés dans le cadre de cette étude :

#### ➤ Test DPPH

Le test DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) est l'un des tests les plus fréquemment utilisés pour évaluer l'activité anti-radicalaire. Cette méthode est basée sur des mécanismes SET et HAT, mais le mécanisme SET est majoritaire car les réactions de transfert d'hydrogène sont très lentes dans les solvants habituellement utilisés pour ce test (Huang et al. 2005). Le DPPH est un radical artificiel stable de couleur violette qui devient jaune pâle lorsqu'il est réduit par un antioxydant (Figure 19). Cette décoloration est suivie par une mesure d'absorbance à 515 nm (Brand-Williams et al. 1995; Molyneux 2004). Le résultat peut être exprimé en pourcentage d'inhibition pour une concentration de produit donnée, ou en  $IC_{50}$  (concentration de produit nécessaire pour réduire de moitié l'absorbance du radical DPPH), ou standardisé par rapport à un produit de référence.

Ce test présente l'avantage d'être très facile et rapide à mettre en œuvre. Cependant, il présente quelques inconvénients tels que des phénomènes d'encombrement stérique qui peuvent limiter l'accès au radical pour les grosses molécules, des interférences avec les molécules qui absorbent aussi à 515 nm telles que les caroténoïdes, la dépendance du test au pH et au solvant utilisé, et l'absence de solubilité du radical DPPH dans des solvants aqueux (Prior et al. 2005; Apak et al. 2013).

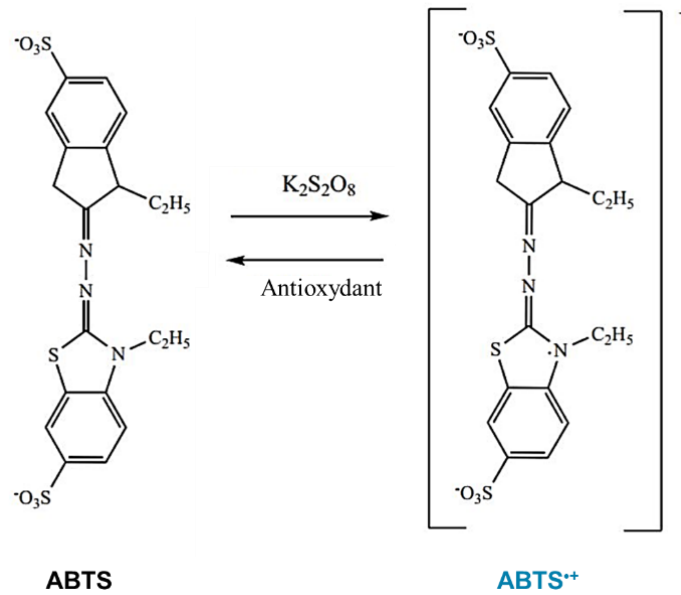


**Figure 19.** Neutralisation du radical DPPH par un antioxydant AH.

#### ➤ **Test ABTS ou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)**

Le test ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) est basé sur des mécanismes SET et HAT. Le radical cation ABTS, de couleur bleue, est généré par réaction avec du persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) (Figure 20). Lorsqu'il est réduit par un antioxydant, le radical se décolore et la décoloration est mesurée à 734 nm (Re et al. 1999). Le résultat peut être exprimé en  $IC_{50}$  ou peut être standardisé par rapport au trolox (analogue hydrosoluble de l' $\alpha$ -tocophérol) et sera exprimé en trolox équivalent (TE).

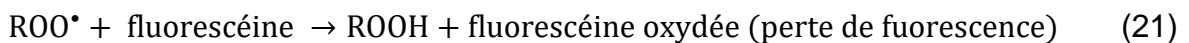
Cette méthode est très utilisée du fait de sa simplicité et rapidité. De plus, contrairement au radical DPPH, le radical cation ABTS peut être utilisé avec une large gamme de pH et est soluble dans les solvants aqueux et organique ce qui permet d'évaluer des molécules hydrophiles et lipophiles. Cependant, la génération du radical est longue (au moins 16h) et la cinétique de réaction avec certains antioxydants peut être plus lente que le temps de mesure et conduire à des erreurs dans la détermination de la capacité antioxydante (Prior et al. 2005; Apak et al. 2013).



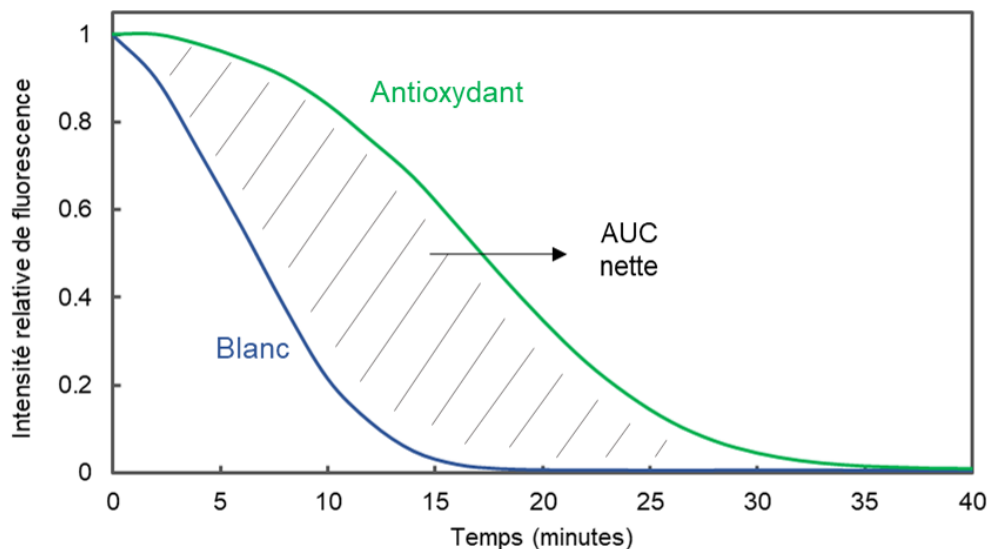
**Figure 20.** Génération du radical cation ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) et réaction avec un antioxydant

### ➤ Test ORAC

Le test ORAC Oxygen Radical Absorbance Capacity est une méthode fluorimétrique qui mesure la capacité d'un antioxydant à inhiber l'oxydation d'une sonde fluorescente, la fluorescéine, par des radicaux peroxydes. Ces radicaux sont générés par la décomposition thermique de l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) à 37°C selon la réaction (20) :



La réaction des radicaux peroxydes avec la fluorescéine aboutit à la formation d'un produit non fluorescent (21). Les antioxydants, en neutralisant les radicaux peroxydes par transfert d'hydrogène (22), ou par addition (23) ralentissent cette dégradation qui peut être suivie en fluorimétrie. Une courbe typique du suivi de fluorescence au cours du test ORAC est présentée Figure 21. L'aire sous la courbe (AUC) nette (AUC avec antioxydant – AUC sans antioxydant) de l'antioxydant est calculée et le résultat est standardisé par rapport au trolox (Cao et al. 1993; Ou et al. 2001; Prior et al. 2005).

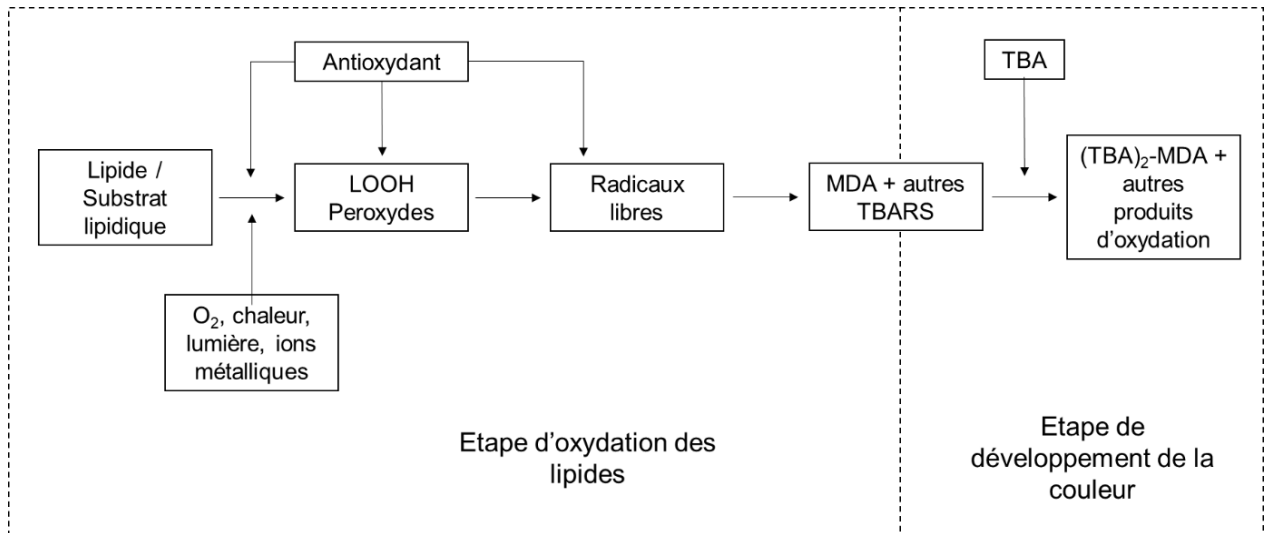


**Figure 21.** Exemple de cinétique de fluorescence de la fluorescéine avec et sans antioxydant (blanc) au cours du test ORAC. AUC : Aire sous la courbe.

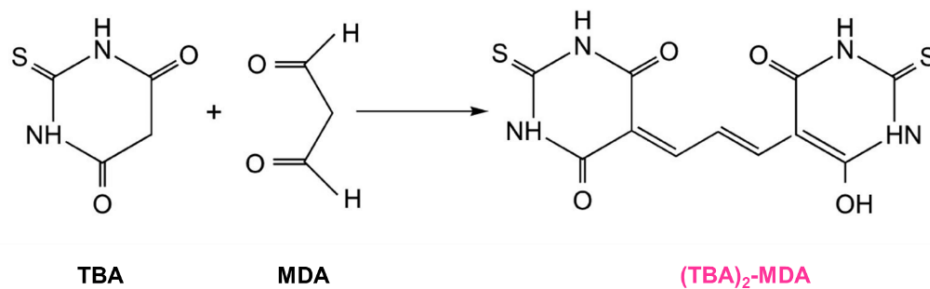
Cette méthode est plus longue à mettre en œuvre que les deux précédentes et nécessite du matériel moins courant dans les laboratoires. Néanmoins, le test ORAC permet d'évaluer à la fois les molécules hydrophiles et lipophiles, et la prise en compte de la cinétique est particulièrement intéressante pour les extraits qui contiennent de multiples molécules qui peuvent présenter des vitesses de réaction différentes. De plus l'utilisation de la fluorimétrie permet d'éviter les interférences avec des produits colorés (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, and Deemer 2002; Huang et al. 2005; Prior et al. 2005).

### ➤ Test TBARS

Le test TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) permet d'évaluer la capacité d'un antioxydant à inhiber la peroxydation d'un substrat lipidique (acide linoléique par exemple). L'oxydation due à la présence d'O<sub>2</sub> peut être accélérée en augmentant la température ou grâce à l'utilisation de catalyseurs (fer ou cuivre par exemple) ou d'initiateurs tels que l'AAPH (Figure 22). Les produits secondaires d'oxydation formés au cours de la peroxydation des acides gras insaturés sont majoritairement des aldéhydes, dont le malondialdéhyde (MDA), qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA), pour former, à 100°C et en milieu acide, un complexe rose qui est mesurable à 532 nm en spectrophotométrie (Figure 23) (Moon and Shibamoto 2009; Ghani et al. 2017).



**Figure 22.** Etapes du test TBARS (Ghani et al. 2017). MDA : malondialdéhyde, TBA : acide thiobarbiturique, TBARS : Substances réactives de l'acide thiobarbiturique



**Figure 23.** Formation du complexe TBA-MDA.

Le test TBARS est très long à mettre en œuvre, car l'oxydation du substrat lipidique est un processus lent (20-24 heures au minimum avec un catalyseur) et bien que ce test soit très largement utilisé, la méthodologie est encore très peu standardisée avec des protocoles qui varient au niveau du temps de réaction, du choix du substrat, de l'utilisation d'un catalyseur ou non, etc. Cependant, l'avantage de cette méthode réside dans l'utilisation d'un substrat lipidique qui permet de mettre en œuvre des réactions plus proches de celles qui ont lieu dans les systèmes physiologiques (Ghani et al. 2017).

### 3.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante des microalgues

L'intérêt pour les microalgues comme nouvelle source d'antioxydant a émergé il y a une vingtaine d'années. Les principales publications évaluant l'activité antioxydante d'extraits

bruts de microalgues par des tests chimiques *in vitro* sont présentées dans le Tableau 3. Dans le cadre de ces études, environ deux-cent souches de microalgues ont été évaluées. Les espèces les plus étudiées sont *Chlorella vulgaris* (onze souches), *Phaeodactylum tricoratum* (neuf souches) et *Dunaliella salina* (sept souches).

Les tests les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des microalgues sont les tests DPPH (trente-six études sur les quarante-neuf référencées), ABTS (dix-neuf études) et FCA (Ferrous Chelating Activity) (treize études). Globalement les résultats sont très hétérogènes selon les espèces de microalgues étudiées et les tests de mesure de l'activité antioxydante utilisés. Les protocoles des tests varient d'une étude à l'autre notamment au niveau de la méthode d'extraction, des solvants utilisés, du temps de réaction, et des concentrations testées. De plus, les résultats sont exprimés de manière différente rendant complexe la comparaison des résultats. Par exemple pour le test DPPH, les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition pour une concentration donnée (différente selon les études), ou en IC<sub>50</sub>, ou en trolox équivalent par unité de poids d'extrait ou de poids sec ou en acide ascorbique équivalent. Enfin l'utilisation d'un produit de référence comme point de comparaison n'est pas systématique, et le choix du produit de référence n'est pas toujours pertinent (par exemple la vitamine E et le BHT (hydroxytoluène butylé) utilisés par Lee et al. (2010) comme contrôle positif pour le test FCA ne sont pas actifs à la concentration testée).

Malgré tout, plusieurs études mettent en évidence le potentiel de certaines espèces de microalgues comme source d'antioxydants :

*Chloromonas* sp. et *Botrydiopsisidaceae* sp. (extraits éthanoliques) présentent une forte capacité à neutraliser les radicaux DPPH (IC<sub>50</sub> de 0,97 et 1,53 µg mL<sup>-1</sup> respectivement) et ABTS (IC<sub>50</sub> de 0,95 µg mL<sup>-1</sup> et 1,79 µg mL<sup>-1</sup>) qui est similaire à la vitamine C (Suh, Yang, et al. 2017; Suh, Kim, et al. 2017). Le test ABTS a également permis de mettre en évidence des activités intéressantes de *Scenedesmus obliquus* (IC<sub>50</sub> de 41 µg mL<sup>-1</sup>, Amaro et al. 2015), d'*Haematococcus pluvialis* (activité jusqu'à 1974 µmol TE g<sup>-1</sup> d'extrait pour une extraction à l'H<sub>2</sub>O supercritique, Rodríguez-Meizoso et al. 2010) et de *Dunaliella salina* (activité jusqu'à 1118 µmol TE g<sup>-1</sup> d'extrait à l'héxane, Herrero et al. 2006). Des résultats intéressants sont aussi obtenus avec le test DPPH pour *Galdieria sulphuraria*, *Ettlia carotinos*, *Neochloris texensis*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris*, *Schizochytrium limacinum*, *Stichococcus bacillaris*, et *Cryptocodinium cohnii* avec des pourcentages d'inhibition compris entre 89 et 95% à des concentrations d'extraits aqueux ou méthanoliques de 250 µg mL<sup>-1</sup> (Gürlek et al. 2020).

Natrah (2007) et al. ont montré que *Chaetoceros calcitrans*, *Scenedesmus quadricauda*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* et *Tetraselmis tetrahele* avaient une forte capacité à inhiber la peroxydation des lipides avec des pourcentages d'inhibition compris entre 88 et 98 % pour des extraits méthanoliques à 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  avec le test TBARS, et compris entre 88,4 et 97 % pour des extraits à 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  avec le test FTC (Ferric ThioCyanate assay, mesure indirecte de la quantité d'hydroperoxydes formés au cours des premiers stades de l'oxydation des lipides). *Euglena tuba* semble également être une espèce intéressante pour sa capacité à inhiber la peroxydation des lipides ( $\text{IC}_{50}$  avec test TBARS = 42  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) et à neutraliser le radical superoxyde ( $\text{IC}_{50} = 5.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Chaudhuri et al. 2014). Certaines espèces montrent aussi une bonne capacité à neutraliser le radical superoxyde telles que *Chaetoceros* sp. (1029  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  d'extrait au dichlorométhane), *Nannochloropsis* sp. (3224  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  d'extrait au méthanol, Goh et al. 2010), *Chlorella stigmatophora* et *Phaeodactylum tricornutum* ( $\text{IC}_{50}$  de 48.37 et 68.61  $\mu\text{g mL}^{-1}$  avec des extraits aqueux, Guzmán et al. 2001). Les extraits au chloroforme et au méthanol de *Chaetoceros* sp. montrent également des résultats intéressants avec le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (610 et 492,50  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ , Goh et al. 2010). On peut aussi noter les bons résultats obtenus avec le test TAC (Total Antioxydant Capacity) avec des  $\text{IC}_{50}$  inférieures à 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pour des extraits méthanoliques de *Chlorella vulgaris* et *Chlamydomonas reinhardtii* (Jayshree et al. 2016).

L'activité antioxydante du genre *Chlorella* a été mise en évidence par plusieurs auteurs avec différents tests antioxydants. En plus des bons résultats obtenus avec les tests DPPH, TBARS, FTC, TAC et de neutralisation du radical superoxyde présentés ci-dessus, Aremu et al. (2015, 2016) ont obtenu des  $\text{IC}_{50}$  jusqu'à 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  avec le test du blanchiment du  $\beta$ -carotène pour *Chlorella minutissima* et *Chlorella* sp., et Plaza et al. (2010) ont montré des activités allant jusqu'à 1008  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  d'extrait de *Chlorella vulgaris* avec le test ORAC.

Globalement, peu de liens sont faits entre ces activités antioxydantes et les métabolites impliqués. Il a quand même été montré des corrélations avec le contenu en caroténoïdes (Herrero et al. 2006; Aremu et al. 2015), le contenu en composés phénoliques (Aremu et al. 2015; Gürlek et al. 2020) dont les flavonoïdes (Jayshree et al. 2016) et l'acide gallique (Rodríguez-Meizoso et al. 2010) et le contenu en vitamine E (Rodríguez-Meizoso et al. 2010).

**Tableau 3.** Principales études évaluant l'activité antioxydante des microalgues *in vitro* par tests chimiques.

Espèces	Test antioxydant	Dosages	Activité	Contrôle positif avec produit de référence	Molécules impliquées dans l'activité	Méthode d'extraction	Réf.
1 <i>Grammatophora marina</i>	(i) DPPH (ii) FCA (iii) neutralisation du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (iv) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (v) neutralisation du OH <sup>•</sup> (vi) neutralisation de NO <sup>•</sup>	-	extraits à 2000 µg mL <sup>-1</sup> (i) 41 à 86 % inhib. (ii) 21 à 81 % inhib. (iii) 14 à 25 % inhib. (iv) 24 à 45 % inhib. (v) 10 à 35 % inhib. (vi) 12 à 33 % inhib.	α-toco. et BHT à 2000 µg mL <sup>-1</sup> (i) 70 et 72 % inhib (ii) 10 et 11 % inhib. (iii) 74 et 67 % inhib. (iv) 33 et 64 % inhib (v) 79 et 77 % inhib. (vi) 43 et 56 % inhib.	-	macération 80% MeOH ou lyse enzymatique (5 carbohydrases et 5 protéases)	(Affan et al. 2006)
2 <i>Chlorella vulgaris</i>	(i) DPPH (ii) ABTS (iii) ORAC (iv) FRAP	TPC	(i) 0,82 µmol TE g <sup>-1</sup> DW (ii) 15,1 µmol TE g <sup>-1</sup> DW (iii) 31,2 µmol TE g <sup>-1</sup> DW (iv) 0,62 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	composés phénoliques	UAE (30 min, t°C amb.) EtOH 50 %	(Agregán et al. 2018)
3 <i>Dunaliella salina</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Pavlova salina</i> , <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Tetraselmis chui</i> , <i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Isochrysis galbana</i>	ORAC	TPC, caroténoïdes totaux	45 à 577 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	-	macération ETOAC, Hex ou H <sub>2</sub> O	(Ahmed et al. 2014)
4 <i>Scenedesmus obliquus</i>	(i) DPPH (ii) ABTS (iii) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (iv) neutralisation de NO <sup>•</sup>	caroténoïdes, AGPI	(i) IC <sub>50</sub> de 412 à 878 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> de 41 à 648 µg mL <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> de 520 à 1236 µg mL <sup>-1</sup> (iv) IC <sub>50</sub> de 60 µg mL <sup>-1</sup>	-	-	macération (20 min 40°C) EtOH, Ace, lactate d'éthyle ou Hex/i-PrOH (3/2)	(Amaro et al. 2015)
5 <i>Scenedesmus</i> sp. + 4 souches de <i>Scenedesmus quadricauda</i>	(i) DPPH (ii) blanchiment du β-carotène	TPC, tannins, iridoïdes	(i) 6 à 70 % inhib. (extraits à 200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) 24 à 92 % inhib. (extraits à 400 µg mL <sup>-1</sup> )	(i) AA 98 % inhib. (200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) BHT 69 % d'inhibition (400 µg mL <sup>-1</sup> )	composés phénoliques	UAE (30 min, glace) MeOH 50%, Petet ou DCM	(Aremu et al. 2014)
6 <i>Chlorella minutissima</i>	(i) DPPH (ii) blanchiment du β-carotène	TPC, tannins, iridoïdes, pigments	(i) 10 à 70 % inhib. (extraits à 200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) IC <sub>50</sub> de 75 à 600 µg mL <sup>-1</sup>	(i) AA 97 % inhib. (200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) BHT IC <sub>50</sub> = 61 µg mL <sup>-1</sup>	caroténoïdes composés phénoliques	macération (1 nuit) + US (30 min, glace) MeOH, Petet ou DCM	(Aremu et al. 2015)
7 <i>Chlorella minutissima</i> + 2 souches de <i>Chlorella</i> sp.	(i) DPPH (ii) blanchiment du β-carotène	TPC, tannins, flavonoïdes, iridoïdes	(i) 25 à 100 % inhib. (extraits à 200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) IC <sub>50</sub> de 25 à 450 µg mL <sup>-1</sup>	(i) AA 97 % inhib. (200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) BHT IC <sub>50</sub> = 61 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (1 nuit) + US (30 min, glace) MeOH, Petet ou DCM	(Aremu et al. 2016)
8 38 souches de microalgues	(i) DPPH (ii) ABTS	-	(i) IC <sub>50</sub> de 44 à 1421 mg FW mL <sup>-1</sup> (ii) 5 à 195 mg AAE 100 g <sup>-1</sup> FW et 17 à 258 mg TE 100 g <sup>-1</sup> FW	-	-	US (30 min, obscu.) + macération (1 nuit, -4°C) EtOH	(Assunção et al. 2016)



9	<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Nannochloropsis granulata</i> , <i>Neochloropsis oleabundans</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Porphyridium aeruginum</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Tetraselmis chuii</i>	(i) DPPH (ii) ORAC	TPC, caroténoïdes, lipides, acides gras	(i) < à 50 % inhib. (extraits à 200 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) 6,7 à 53,0 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	composés phénoliques et lipides	macération MeOH (DPPH) ou PLE Hex/DCM (50/50)(70°C) puis Ac/H <sub>2</sub> O/AcOH (70/29.5/0.5) (80°C) (ORAC)	(Banskota et al. 2018)
10	<i>Chlorella kessleri</i>	(i) DPPH (ii) ABTS (iii) pouvoir réducteur	Caroténoïdes totaux et chlorophylles a et b	(i) 1,3 à 3,8 % inhib. (extraits à 2500 µg mL <sup>-1</sup> ) (ii) 196 à 346 µmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait (iii) DO700 0,266 à 0,473 (extraits à 2500 µg mL <sup>-1</sup> )	-	-	macération MeOH	(Bauer et al. 2017)
11	<i>Scenedesmus</i> sp.	(i) DPPH (ii) FRAP	TPC, flavonoïdes, caroténoïdes	(i) 0,60 à 3,71 µmol TE g <sup>-1</sup> DW (ii) 2,8 à 47,0 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	-	US (20 min) + macération (1h) EtOH/H <sub>2</sub> O (3:1), Hex, EtOAc, ou H <sub>2</sub> O	(Bulut et al. 2019)
12	<i>Botryococcus braunii</i>	ORAC	-	43 µmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait	-	-	broyage tampon phosphate	(Buono et al. 2012)
13	<i>Euglena tuba</i>	(ii) DPPH (ii) TBARS (iii) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>••</sup> (iv) neutralisation du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (vi) neutralisation du ONOO- (vii) neutralisation de l' <sup>1</sup> O <sub>2</sub> (viii) neutralisation de l'HClO	TPC, flavonoïdes, tannins, alkaloïdes, AA	(i) IC <sub>50</sub> = 146 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> = 42 µg mL <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> = 5.8 µg mL <sup>-1</sup> (iv) IC <sub>50</sub> = 47000 µg mL <sup>-1</sup> (v) IC <sub>50</sub> = 278 µg mL <sup>-1</sup> (vi) IC <sub>50</sub> = 2800 µg mL <sup>-1</sup> (vii) IC <sub>50</sub> = 880 µg mL <sup>-1</sup> (viii) IC <sub>50</sub> = 223 µg mL <sup>-1</sup>	(i) IC <sub>50</sub> AA = 5,3 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> mannitol = 571 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> quercetine = 42 µg mL <sup>-1</sup> (iv) IC <sub>50</sub> pyruvate de sodium = 3240 µg mL <sup>-1</sup> (v) IC <sub>50</sub> curcumine = 91 µg mL <sup>-1</sup> (vi) IC <sub>50</sub> ac. gallique = 876 µg mL <sup>-1</sup> (vii) IC <sub>50</sub> ac. lipoïque = 46 µg mL <sup>-1</sup> (viii) IC <sub>50</sub> AA = 236 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (15h) MeOH 70%	(Chaudhuri et al. 2014)
14	3 souches de <i>Chlorella</i> sp.	(i) DPPH (ii) FCA (iii) TBARS	TPC	(i) IC <sub>50</sub> de 810 à 1400 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> de 1220 à 1500 µg mL <sup>-1</sup> (iii) 5.9 à 88 % inhib. (extraits à 4000 µg mL <sup>-1</sup> )	(i) IC <sub>50</sub> BHT = 50 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> EDTA = 28 µg mL <sup>-1</sup> (iii) BHT 94 % d'inhib. (conc. non précisée)	-	broyage + macération eau 80°C ou macération (24h) EtOH 95%	(Choochote et al. 2014)
15	<i>Tetraselmis chuii</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Chlorella minutissima</i> , <i>Rhodomonas salina</i>	(i) DPPH (ii) FCA (iii) CCA	TPC	extraits à 1000 µg mL <sup>-1</sup> (i) 0 à 21 % inhib. (ii) 12 à 97 % inhib. (iii) 12 à 22 % inhib.	contrôles à 1000 µg mL <sup>-1</sup> (i) BHT 88 % inhib. (ii) EDTA 95 % inhib. (iii) EDTA 74 % inhib.	-	broyage + macération (1 nuit) Hex ou MeOH	(Custódio et al. 2012)
16	<i>Isochrysis galbana T-iso</i> , <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp.	(i) DPPH (ii) FCA (iii) CCA	TPC, acides gras	(i) IC <sub>50</sub> > 1000 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> de 730 à 4110 µg mL <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> de 900 µg mL <sup>-1</sup> à >10000 µg mL <sup>-1</sup>	(i) IC <sub>50</sub> BHT = 70 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> EDTA = 100 µg mL <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> EDTA = 280 µg mL <sup>-1</sup>	-	broyage + macération séquentielle Hex, Et, Ac et H <sub>2</sub> O	(Custódio et al. 2014)
17	<i>Chlorococcum minutum</i>	(i) TAC (ii) pouvoir réducteur	TPC	(i) 2,5 à 10 mg AAE g <sup>-1</sup> d'extrait (ii) 1 à 4 mg AAE g <sup>-1</sup> d'extrait	-	composés phénoliques	macération (72 h) EtOH, MeOH, ou Ac	(Elshobary et al. 2020)

18	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	(i) DPPH (ii) ABTS (iii) FCA	TPC, composés phénoliques majeurs, caroténoïdes totaux, fucoxanthine	(i) 0,07 à 1,43 mg TE g <sup>-1</sup> DW (ii) 1,21 à 10,60 mg TE g <sup>-1</sup> DW (iii) 0,29 à 18,52 mg Na- EDTA Eq g <sup>-1</sup> DW	-	caroténoïdes et composés phénoliques	broyage + UAE (30 min, t° amb.) MeOH, EtOH, Ac, Ac 90 %, Ac/CHCl <sub>3</sub> (90/10) ou Ac/CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80/10/10 )	(Foo et al. 2015)
19	<i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Odontella sinensis</i> , <i>Phaeodactylum tricoratum</i>	(i) ABTS (ii) FRAP (iii) FCA (iv) blanchiment du β-carotène	TPC, composés phénoliques majeurs, caroténoïdes totaux, fucoxanthine	(i) 2,0 à 21,6 mg TE g <sup>-1</sup> DW (ii) 0,2 à 2,0 mg TE g <sup>-1</sup> DW (iii) 1,4 à 13,4 mg EDTA eq g <sup>-1</sup> DW (iv) 0,1 à 1,4 mg TE g <sup>-1</sup> DW	-	caroténoïdes et composés phénoliques	broyage + macération MeOH	(Foo et al. 2017)
20	<i>Chaetoceros</i> sp., <i>Nannochloropsis</i> sp.	(i) DPPH (ii) FRAP (iii) FCA (iv) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>••</sup>	TPC	(i) 14 à 107 μmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait (ii) 172 à 610 μmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait (iii) 3,2 à 82,4 μmol EDTA Eq g <sup>-1</sup> d'extrait (iv) 228 à 3224 μmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait	-	-	macération (24h) Hex, DCM, CHCl <sub>3</sub> ou MeOH	(Goh et al. 2010)
21	<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp., <i>Isochrysis T-Iso</i> , <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Botryococcus</i> <i>braunii</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Neochloris oleabundans</i> , <i>Chaetoceros</i> <i>calcitrans</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> (red and green phase), <i>Parachlorella kessleri</i> , <i>Phaeodactylum tricoratum</i> , <i>Schizochytrium</i> sp.,	(i) ABTS (ii) FRAP (iii) AIOLA	TPC, caroténoïdes totaux	(i) 0 à 69 μmol TE g <sup>-1</sup> DW (ii) 3,3 à 90 μmol TE g <sup>-1</sup> DW (iii) 1,8 à 89,7 μmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	caroténoïdes et composés phénoliques	broyage + macération (30 min) EtOH/H <sub>2</sub> O (3/1) ou séquentiel Hex, EtOAc et H <sub>2</sub> O (80°C)	(Goiris et al. 2012)
22	<i>Phaeodactylum tricoratum</i> , 2 souches de <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Haematococcus</i> <i>pluvialis</i> , <i>Scenedesmus maximus</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>quadricauda</i> , <i>Desmodesmus</i> <i>pleimorphus</i> , <i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Porphyridium</i> <i>aeruginum</i>	ABTS	caroténoïdes	0,8 à 149 mg L <sup>-1</sup> AAE μg <sup>-1</sup> chlorophylle a	-	-	broyage + macération EtOH 50 %	(Guedes et al. 2013)
23	<i>Galdieria sulphuraria</i> , <i>Ettlia carotinoso</i> , <i>Neochloris texensis</i> , <i>Chlorella</i> <i>minutissima</i> , <i>Stichococcus bacillaris</i> , <i>Schizochytrium limacinum</i> , <i>Cryptocodinium cohnii</i> , et <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>	DPPH	TPC	89 à 95% inhib. (extraits à 250 μg mL <sup>-1</sup> )	BHT 98 % d'inhibition (250 μg mL <sup>-1</sup> )	TPC	UAE (20 min) MeOH ou macération H <sub>2</sub> O (100°C, 30 min)	(Gürlek et al. 2020)
24	<i>Chlorella stigmatophora</i> , <i>Phaeodactylum tricoratum</i>	(i) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>••</sup> (ii) neutralisation du OH <sup>•</sup> (iii) neutralisation du HClO	-	(i) IC <sub>50</sub> 48 à 170 μg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> 180 à 250 μg mL <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> > 1000 μg mL <sup>-1</sup>	-	-	UAE H <sub>2</sub> O puis soxhlet DCM et MeOH sur résidu d'extraction	(Guzmán et al. 2001)

25	<i>Chlorella vulgaris</i>	FRAP	TPC	0,006 à 58,2 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	composés phénoliques	macération séquentiel Hex, EtOAc ou H <sub>2</sub> O (80°C)	(Hajimahmoodi et al. 2010)
26	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Nannochloris</i> sp., et <i>Tetraselmis suecica</i>	(i) DPPH (ii) pouvoir réducteur (iii) FCA	TPC, flavonoïdes, caroténoïdes	(i) IC <sub>50</sub> 356 à 400 µg mL <sup>-1</sup> (ii) 24 à 33 AAE mL <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> 2810 à 12820 µg mL <sup>-1</sup>	(i) IC <sub>50</sub> AA = 3,70 µg mL <sup>-1</sup> (ii) BHT = 1,44 AAE mg <sup>-1</sup> (iii) IC <sub>50</sub> EDTA = 10 µg mL <sup>-1</sup>	-	?	(Haoujar et al. 2019)
27	<i>Dunaliella salina</i>	ABTS	caroténoïdes	10,7 à 1118 µmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait	-	caroténoïdes	PLE Hex, EtOH ou H <sub>2</sub> O	(Herrero et al. 2006)
28	<i>Dunaliella salina</i>	ABTS	caroténoïdes	115 à 452 µmol TE g <sup>-1</sup> d'extrait	-	caroténoïdes	CO <sub>2</sub> sub- et supercritique	(Jaime et al. 2007)
29	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(i) DPPH (ii) TAC (iii) FRAP	TPC + flavonoïdes	(i) IC <sub>50</sub> de 397 µg mL <sup>-1</sup> à 423 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> de 55 µg mL <sup>-1</sup> à 73 µg mL <sup>-1</sup> (iii) DO700 de 0,124 à 0,136 (extraits à 250 µg mL <sup>-1</sup> )	(ii) IC <sub>50</sub> AA = 128 µg mL <sup>-1</sup> (iii) DO700 AA à 250 µg mL <sup>-1</sup> = 0.423	flavonoïdes	macération MeOH	(Jayshree et al. 2016)
30	<i>Ankistrodesmus</i> sp., <i>Euglena cantabrica</i>	DPPH	-	8,3 à 71 % inhib. (extraits à 1000 µg mL <sup>-1</sup> )	BHT 26% inhib. BHA 91% inhib. à 1000 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (40 min) MeOH ou H <sub>2</sub> O	(Jerez-Martel et al. 2017)
31	<i>Halochlorococcum porphyrae</i> , <i>Oltamanssiellopsis unicellularis</i>	(i) DPPH (ii) FCA (iii) neutralisation du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (iv) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>••</sup> (v) neutralisation du OH <sup>•</sup> (vi) neutralisation de NO <sup>•</sup>	TPC	extraits à 2000 µg mL <sup>-1</sup> (i) 42 à 95 % inhib. (ii) 3,5 à 72 % inhib. (iii) 5,1 à 42 % inhib. (iv) 5,4 à 58 % inhib. (v) 4,2 à 31 % inhib. (vi) 1,2 à 51 % inhib.	contrôles à 2000 µg mL <sup>-1</sup> (i) BHT, α-toco. 94 % inhib. (ii) BHT 11 % α-toco. 10 % inhib. (iii) BHT 60 % α-toco. 62 % inhib. (iv) BHT 63 % α-toco. 61 % inhib. (v) BHT 77 % α-toco. 79 % inhib. (vi) BHT 26 % α-toco. 25 % inhib.	-	macération 80% MeOH puis fractionnement avec Hex, CHCl <sub>3</sub> et EtOAc ou lyse enzymatique (5 carbohydrases et 5 protéases)	(Lee et al. 2010)
32	<i>Chlamydomonas nivalis</i> , <i>Chlorella protothecoides</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i> , <i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Nitzschia laevis</i> , <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Schizochytrium mangrovei</i> , <i>Thraustochytrium</i> sp.	ABTS	TPC	0 à 11,4 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	-	macération (30 min) séquentiel Hex, EtOAc et H <sub>2</sub> O (80°C)	(Li et al. 2007)
33	<i>Tetraselmis</i> sp., <i>Dunaliella salina</i> , <i>Dunaliella</i> sp., <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Chlorella</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp.	DPPH	TPC, caroténoïdes totaux, AGPI	IC <sub>50</sub> de 247 à 464 µg mL <sup>-1</sup>	BHT IC <sub>50</sub> = 6,2 µg mL <sup>-1</sup> AA IC <sub>50</sub> = 2,5 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (3h, obscu.) EtOH	(Maadane et al. 2015)
34	<i>Isochrysis galbana</i>	(i) DPPH (ii) ABTS	TPC, β-glucan, Co-Q10, β-carotène, fucoxanthine	(i) 0 à 17mg AAE L <sup>-1</sup> (ii) 52 à 56 µmol TE g <sup>-1</sup> DW	-	-	broyage + macération (18 h) EtOH 96 % ou H <sub>2</sub> O	(Matos et al. 2019)

35	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	(i) DPPH (ii) blanchiment du $\beta$ -carotène (iii) FRAP	caroténoïdes, tocophérols, acides gras	(i) 1,08 à 1,8 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ d'extrait (ii) 64 à 97 % inhib. (extraits à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (iii) 48 à 86 $\mu\text{mol Fe(II) g}^{-1}$ d'extrait	-	caroténoïde, tocophérols, acides gras	CO <sub>2</sub> supercritique	(Millao and Uquiche 2016)
36	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Oocystis pusilla</i> , <i>Scenedesmus rubescens</i>	DPPH	TPC	0,36 à 17,5 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ d'extrait	-	composés phénoliques	macération (30 min, 25°C) séquentiel Hex, EtOAc et H <sub>2</sub> O (80°C)	(Morowvat and Ghasemi 2016)
37	<i>Cymbella</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Tetraselmis tetrahele</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Oocystis</i> sp., <i>Trachelomonas</i> sp.	(i) DPPH (ii) FTC (iii) TBARS	-	(i) aucune activité pour extrait de 0,25 à 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ii) 0 à 97 % d'inhibition (extraits à 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (iii) 0 à 98 % inhib. (extraits à 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	(i) $\alpha$ -toco. 85 %, quercetine 65 %, BHT 74 % inhib. (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (ii) $\alpha$ -toco. 84 %, quercetine 92 %, BHT 100 % inhib. (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (iii) $\alpha$ -toco. 71 %, quercetine 90 %, BHT 98 % inhib. (80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	-	macération (4 j) MeOH	(Natrah et al. 2007)
38	2 souches de <i>Nannochloris</i> sp., <i>Picochlorum</i> sp., <i>Desmochloris</i> sp.	(i) DPPH (ii) FCA (iii) CCA	TPC, composés phénoliques, composition pigmentaire	extraits à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (i) < 10% inhib. (ii) < 25% inhib. (iii) < 30% inhib.	contrôles à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (i) BHT 88% inhib. (ii) EDTA 96 % inhib. (iii) EDTA 76 % inhib.	-	broyage + macération (1 nuit, 20°C) MeOH	(Pereira et al. 2015)
39	<i>Chlorella vulgaris</i>	(i) ABTS (ii) ORAC (iii) neutralisation du O <sub>2</sub> <sup>••</sup>	TPC	(i) 146 à 789 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ d'extrait (ii) 243 à 1008 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ d'extrait (iii) IC <sub>50</sub> 8260 à 10752 $\mu\text{g mL}^{-1}$	extrait de romarin (i) 2805 à 2811 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (ii) 4615 à 4892 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (iii) IC <sub>50</sub> 464 à 665 $\mu\text{g mL}^{-1}$	-	H <sub>2</sub> O supercritique	(Plaza et al. 2010)
40	<i>Haematococcus pluvialis</i>	ABTS	GC-MS	366 à 1974 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ d'extrait	-	$\alpha$ -toco., acide gallique, produits de caramélisation	H <sub>2</sub> O supercritique	(Rodríguez-Meizoso et al. 2010)
41	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis salina</i> , <i>Nannochloropsis limnetica</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Desmodesmus</i> sp.	(i) DPPH (ii) ABTS (iii) FCA (iv) FRAP (v) TAC	TPC, flavonoïdes, ac. phénoliques, tocophérols, caroténoïdes totaux + composition	(i) 8,4 à 14 % inhib. (extraits à 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (ii) 2,7 à 24,3 TE g <sup>-1</sup> (iii) 3,3 à 8,6 % chélation (extraits à 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (iv) 0,14 à 0,45 AAE g <sup>-1</sup> (v) 3,0 à 9,0 GAE g <sup>-1</sup>	-	composés phénoliques, caroténoïdes et tocophérols	UAE (45 min, obscu, t°C amb.) MeOH	(Safafar et al. 2015)
42	<i>Tetraselmis suecica</i>	DPPH	composition pigmentaire	21 % inhib. (extrait à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\alpha$ -toco. 6 % inhib. (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	-	macération (30 min, obscu, azote) EtOH/H <sub>2</sub> O (3/1)	(Sansone et al. 2017)
43	<i>Parachlorella kessleri</i>	(i) DPPH (ii) ABTS (iii) FCA (iv) TAC	TPC, chlorophylle a et b, caroténoïdes totaux	(i) 32 à 69 % inhib. (extraits à 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (ii) 1,4 à 3,0 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ d'extrait (iii) 20 % inhib. (extraits à 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (iv) 2,2 à 4,3 mg AAE g <sup>-1</sup> d'extrait	-	-	broyage + macération MeOH	(Sharma et al. 2019)

44	<i>Trentepohlia umbrina</i>	(i) DPPH (ii) pouvoir réducteur (iii) neutralisation du O <sub>2</sub>	TPC, flavonoïdes	(i) IC <sub>50</sub> = 665 µg mL <sup>-1</sup> (ii) DO700 = 0,0124 (extrait à 125 µg mL <sup>-1</sup> ) (iii) IC <sub>50</sub> = 839 µg mL <sup>-1</sup>	(i) IC <sub>50</sub> AA = 6,4 µg mL <sup>-1</sup> (ii) DO700 AA = 0,0478 (125µg mL <sup>-1</sup> ) (iii) IC <sub>50</sub> AA = 116 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (72h) MeOH	(Simic et al. 2012)
45	<i>Dunaliella salina</i>	DPPH	chlorophylles, caroténoïdes totaux	15 à 57 % inhib. (extrait à 250 µg mL <sup>-1</sup> )	AA 95 % inhib. (250 µg mL <sup>-1</sup> )	-	US (10 min) + macération (4 j) EtOH	(Singh et al. 2016)
46	<i>Skeletonema marinoi</i>	ABTS	TPC, flavonoïdes, AA, β-carotène, diatoxanthine	~250 à 1500 fg AAE cellule <sup>-1</sup>	-	composés phénoliques, flavonoïdes, AA	US (1 min, glace) + macération (30 min, obscu.) MeOH	(Smerilli et al. 2019)
47	<i>Chloromonas</i> sp.	(i) DPPH (ii) ABTS	-	(i) IC <sub>50</sub> = 0,97 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> = 0,95 µg mL <sup>-1</sup>	(i) IC <sub>50</sub> AA = 0,12 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> AA = 0,18 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (24 h) EtOH	(Suh, Yang, et al. 2017)
48	<i>Botrydiopsisidaceae</i> sp.	(i) DPPH (ii) ABTS	-	(i) IC <sub>50</sub> = 1,53 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> = 1,79 µg mL <sup>-1</sup>	(i) IC <sub>50</sub> AA = 0,15 µg mL <sup>-1</sup> (ii) IC <sub>50</sub> AA = 0,19 µg mL <sup>-1</sup>	-	macération (24 h) EtOH	(Suh, Kim, et al. 2017)
49	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Schizochytrium</i> sp.	(i) DPPH (ii) TAC (iii) FCA (iv) pouvoir réducteur	TPC, flavonoïdes	extraits à 500 µg mL <sup>-1</sup> (i) 15 % à 30 % inhib. (ii) DO695 0,500 à 1,000 (iii) 10 à 60 % inhib. (iv) DO700 0,050 à 0,300	(ii) BHT DO695 0,500 (500 µg mL <sup>-1</sup> ) (iii) EDTA 65 % inhib. (50 µg mL <sup>-1</sup> ) (iv) BHT DO700 0,300 (500 µg mL <sup>-1</sup> )	composés phénoliques	macération (2 j) EtOH 70 %	(Yu et al. 2017)

? : non décrit, α-toco. : α-tocophérol, AA : acide ascorbique, AAE : acide ascorbique équivalent, ABTS : 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid, Ac : acétone, ac. : acide, AcOH : acide acétique, AGPI : acides gras polyinsaturés, AIOLA : AAPH-induced oxidation of linoleic acid, amb. : ambiante, BHA : hydroxyanisole butylé, BHT : hydroxytoluène butylé, CCA : copper chelating activity, CHCl<sub>3</sub> : chloroforme, Co-Q10 : co-enzyme Q10, DCM : dichlorométhane, DO700 : absorbance à 700 nm, DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DW : poids sec, Eq : équivalent, EtOAc : acétate d'éthyle, EtOH : éthanol, FCA : ferrous chelating activity, FRAP : ferric reducing antioxidant power, FTC : ferric thiocyanate assay, FW : poids frais, GAE : acide gallique équivalent, GC-MS : gas chromatography – mass spectroscopy, HClO : acide hypochloreux, Hex : hexane, i-PrOH : isopropanol, IC<sub>50</sub> : concentration d'inhibition 50, inhib. : inhibition, MeOH : méthanol, obscu. : obscurité, ORAC : oxygen radical absorbance capacity, Petet : éther de pétrole, PLE : extraction liquide sous pression, TAC : total antioxydant capacity, TBARS : thiobarbituric acid reactive substance, TE : équivalent trolox, TPC : composés phénoliques totaux, UAE : extraction assistée par ultrasons, US : ultrasons.

### **3.5. Effets des conditions de culture sur l'activité antioxydante des microalgues**

Le métabolisme des microalgues est modulé par les conditions environnementales. Cette caractéristique peut être utilisée pour influencer la production de molécules d'intérêt en modifiant les conditions de culture (Paliwal et al. 2017; Chen, Wan, et al. 2017). L'exposition à un excès de lumière, aux UV, à des températures, pH et salinités extrêmes, à un déficit en nutriment ou à une concentration importante en métaux provoquent une production accrue d'ERO (Pinto et al. 2003; Suzuki and Mittler 2006; Liu et al. 2007; Janknegt et al. 2009; Tammam et al. 2011; Roach and Krieger-Liszkay 2014; Çakmak et al. 2015). Des mécanismes de protection sont mis en œuvre par la cellule pour s'acclimater à ces stress abiotiques. Ils incluent l'intervention du système antioxydant impactant ainsi l'activité antioxydante. Cette capacité d'acclimatation à un stress est spécifique à chaque espèce et dépendra du type de stress, de son intensité et de sa durée (Borowitzka 2018). L'activité antioxydante des microalgues a été très étudiée ces dernières années, mais relativement peu de données existent sur l'impact des conditions de culture sur l'activité antioxydante globale.

#### **3.5.1. Effets de l'intensité lumineuse sur l'activité antioxydante**

L'exposition à des intensités lumineuses qui dépassent les capacités photosynthétiques de la cellule conduit à une augmentation de la formation d'ERO qui peut provoquer des dommages au niveau des PS, particulièrement le PSII et inhiber son fonctionnement (photoinhibition) (Roach and Krieger-Liszkay 2014; Nishiyama and Murata 2014). Le système antioxydant est mobilisé pour protéger l'appareil photosynthétique, aussi l'activité antioxydante est-elle impactée par l'intensité lumineuse.

Sozmen et al. (2018) ont mesuré l'effet d'une augmentation de l'intensité lumineuse de 66 à 385  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sur l'activité antioxydante évaluée avec les tests DPPH, ABTS et FRAP et la concentration en composés phénoliques de *Chlorella miniata*. L'augmentation de l'intensité lumineuse induit une augmentation de l'activité antioxydante mesurée avec les tests ABTS (activité multipliée par 5 entre 66 et 236  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) et FRAP (activité multipliée par 10 entre 66 et 275  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) jusqu'à une valeur optimale de 236 et 275  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pour les tests ABTS et FRAP respectivement. Cependant l'intensité lumineuse n'a pas d'effet sur l'activité mesurée avec le test DPPH. Globalement le contenu en composés phénoliques suit des variations similaires à l'activité antioxydante mesurée avec les tests ABTS et FRAP.

Smerilli et al. (2019) se sont intéressés à l'impact de l'intensité lumineuse sur la réponse antioxydante de *Skeletonema marinoi*. L'exposition à une forte intensité lumineuse (600  $\mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) provoque une augmentation de la capacité de neutralisation du radical ABTS qui est couplée à une augmentation du contenu en composés phénoliques, en acide ascorbique et en diatoxanthine.

A l'inverse, une baisse de l'inhibition de la peroxydation des lipides a été observée avec l'augmentation de l'intensité lumineuse de 25 à 150 puis à 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pour *Navicula sp.* (Perelman et al. 1998).

### 3.5.2. Effets des UV sur l'activité antioxydante

Les UV sont potentiellement nuisibles en raison de leur effet destructeur sur de nombreuses molécules telles que les bases des acides nucléiques, les acides aminés ou les lipides membranaires. L'appareil photosynthétique est particulièrement touché, et une baisse de l'activité photosynthétique est souvent observée après une exposition trop importante aux UV (Holzinger and Lütz 2006). L'activité antioxydante semble stimulée par l'application d'UV. En effet, l'application d'UV-A et d'UV-C provoque pour *Chlamydomonas nivalis*, une algue des neiges, une stimulation de l'activité antioxydante mesurée avec le test du blanchiment du  $\beta$ -carotène. De plus le contenu en composés phénoliques augmente légèrement (5 à 12%) après une exposition aux UV-A et de manière plus prononcée (12 à 24 %) après une exposition aux UV-C (Duval et al. 1999). De même, Copia et al. (2012) ont montré que *Chlorella sp.* exposée aux UV-B avait une capacité de neutralisation du radical DPPH et un contenu en composés phénoliques plus important.

### 3.5.3. Effets de la température et du pH

La température et le pH influencent de nombreux processus métaboliques aussi l'activité antioxydante est-elle impactée par ces deux facteurs. L'effet de la température (20, 25 et 30°C) et du pH (6,7 et 8) ont été étudiés sur la capacité de neutralisation du radical ABTS de *Scenedesmus obliquus* (Guedes, Amaro, Pereira, et al. 2011). Une augmentation du pH entraîne une augmentation de l'activité antioxydante quelle que soit la température et une augmentation de la température induit une augmentation de l'activité antioxydante quel que soit le pH, aussi la plus haute activité antioxydante est-elle obtenue à pH 8 et 30°C. De plus, à pH 7, la température a un effet beaucoup plus marqué sur l'activité antioxydante. Singh et al. (2016) ont observé des effets similaires avec *Dunaliella salina* concernant la température : une élévation de ce paramètre induit une augmentation de l'activité de neutralisation du DPPH (multipliée par deux entre 28 et 37°C), du pouvoir réducteur et du contenu en caroténoïdes totaux, alors que la température optimale de croissance est comprise entre 15 et 25°C.

Sozmen et al. (2018) ont également montré un effet positif de l'augmentation de la température sur l'activité antioxydante de *Chlorella miniata* mesurée avec le test ABTS (multipliée par deux entre 14 et 24°C). Néanmoins, l'élévation de la température a un effet peu prononcé sur l'activité mesurée avec les tests FRAP et DPPH, et a globalement un impact négatif sur le contenu en composés phénoliques.

A l'inverse, l'activité d'inhibition de la peroxydation des lipides de *Navicula* sp. cultivée entre 17 et 37°C est maximale à 19°C et diminue avec l'augmentation de la température, mais la température optimale de croissance pour cette espèce est de 31°C (Perelman et al. 1998).

#### **3.5.4. Effets des nutriments (azote et phosphore)**

Après le carbone, l'azote et le phosphore sont quantitativement les principaux éléments constituant la biomasse de microalgue. L'azote entre majoritairement dans la composition des acides nucléiques, des protéines et de la chlorophylle, et le phosphore dans la composition des acides nucléiques et des phospholipides membranaires (Geider and La Roche 2002). Un déséquilibre de la concentration en nutriments dans le milieu aura donc des conséquences au niveau de tout le métabolisme. Globalement, une carence en nutriment a un effet négatif sur l'activité antioxydante. Pour plusieurs espèces du genre *Chlorella*, une baisse de l'activité antioxydante (tests DPPH et blanchiment du  $\beta$ -carotène), du contenu en caroténoïdes et composés phénoliques a été mesurée avec une carence en azote (Aremu et al. 2015, 2016). De même, la carence en azote provoque une baisse de trois à dix fois de l'activité antioxydante de *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis suecica* and *Phaeodactylum tricornutum* (test ABTS) (Goiris, Van Colen, et al. 2015). L'activité est également diminuée par une carence en phosphore bien que l'effet soit moins marqué. Cette réduction de l'activité antioxydante est accompagnée d'une baisse du contenu en caroténoïdes et en composés phénoliques, mais d'une augmentation en vitamine C (particulièrement avec la carence en phosphore) et en vitamine E (uniquement pour la carence en phosphore) (Goiris, Van Colen, et al. 2015). Des effets similaires de la carence en azote et phosphore ont été observés pour *Chlamydomonas reinhardtii* sur la capacité de neutralisation du radical peroxyde (test ORAC, Çakmak et al. 2015). De plus une supplémentation en azote (multiplié par cinq par rapport au contrôle) permet d'augmenter l'activité antioxydante. Dans les deux cas, la carence en azote ou phosphore provoque une augmentation du contenu en caroténoïdes et une baisse d'activité de la catalase. Cependant, l'activité de la SOD diminue avec la carence en azote alors qu'elle augmente avec la carence en phosphore (Çakmak et al. 2015)



A l'inverse, l'activité antioxydante de *Dunaliella salina* mesurée avec les tests DPPH et FCA est supérieure pour une culture carencée en azote (multipliée par plus de 2,5 pour le test DPPH) et s'accompagne d'une hausse du contenu en caroténoïdes (Singh et al. 2016).

### 3.5.5. Effets de la salinité

Un changement de salinité conduit à des stress osmotique et ionique qui induisent de nombreux ajustements métaboliques tels que la synthèse d'osmolytes et d'antioxydants pour protéger la cellule (Mishra and Jha 2011). Ainsi une augmentation de l'activité antioxydante (tests DPPH et FCA) et du contenu en caroténoïdes en réponse à une élévation de la salinité de 1 à 3,5 M NaCl est observée chez *Dunaliella salina* qui est une espèce halotolérante (Singh et al. 2016). A l'inverse, une faible augmentation de la salinité de 38,3 à 43,2 ‰ conduit à une diminution de l'activité d'inhibition de la peroxydation des lipides pour *Navicula* sp. (Perelman et al. 1998).

### 3.5.6. Effets des métaux

Certains métaux sont indispensables à la cellule (fer, cuivre, zinc, cobalt, manganèse), ils entrent dans la composition de nombreuses molécules ou structures impliquées dans des processus essentiels tels que la photosynthèse, ou sont co-facteurs de nombreuses enzymes (Pinto et al. 2003; Miazek et al. 2015). Cependant à forte concentration ces métaux ainsi que les métaux non essentiels peuvent avoir des effets négatifs. Ils peuvent notamment participer à la réaction de Fenton (cuivre et fer) qui aboutit à la production du radical hydroxyle ou perturber la chaîne de transport des électrons photosynthétiques (cadmium, plomb, mercure) avec pour conséquence la production d'oxygène singulet et de radical superoxyde (Pinto et al. 2003). La présence de métaux va donc fortement influencer l'activité antioxydante.

*Chlorella sorokiniana* et *Scenedesmus acuminatus* ont été exposées à des doses sub-létales de cuivre (25 et 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$  respectivement) pendant sept jours (Hamed et al. 2017). L'activité antioxydante mesurée avec le test FRAP est multipliée par 4.6 pour *Chlorella* en présence de cuivre, et par 2,4 pour *Scenedesmus*. Cette élévation de l'activité est accompagnée d'une augmentation du contenu en glutathion, acide ascorbique, composés phénoliques totaux, proline et tocophérols pour les deux espèces. Le contenu en flavonoïdes augmente également pour *Chlorella* mais reste stable pour *Scenedesmus*. De plus, en présence de cuivre, il y a une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, APX, GR) (Hamed et al. 2017). De même, la capacité de neutralisation du radical peroxyde de *Chlamydomonas reinhardtii* (test ORAC) augmente lorsque du zinc est ajouté au milieu de culture (concentration en zinc multipliée par cinq par rapport au contrôle), ainsi que le contenu en caroténoïdes, et l'activité

de la SOD et de la CAT, mais accompagné d'une baisse de l'activité de la GR (Çakmak et al. 2015).

## 4. Applications des antioxydants naturels

Les antioxydants synthétiques sont largement utilisés en industrie cosmétique et agro-alimentaire car très économiques et faciles d'emploi. Cependant leur utilisation est actuellement controversée (notamment le BHA (hydroxyanisole butylé) et le BHT (hydroxytoluène butylé)) car ils pourraient être dangereux pour la santé et l'environnement (Lourenço et al. 2019). Les consommateurs sont donc demandeurs de produits naturels alternatifs aux produits synthétiques pour lesquels les microalgues offrent des perspectives intéressantes.

### 4.1. Cosmétiques

Les antioxydants ont deux fonctions dans les produits cosmétiques : un rôle conservateur pour protéger les ingrédients sensibles à l'oxydation, notamment les corps gras, et un rôle d'actif « anti-âge » afin de contrer les effets du stress oxydatif sur la peau en renforçant les défenses antioxydantes naturelles (Andreassi and Andreassi 2003). La peau possède un système de défense contre les ERO constitué d'antioxydants endogènes, essentiellement sous forme enzymatique, et d'antioxydants exogènes apportés par l'alimentation (vitamine C, vitamine E, caroténoïdes...), qui protègent la peau des dommages oxydatifs. Cependant dans certaines circonstances (exposition aux UV, pollution, vieillissement...), ce système de défense est affaibli avec pour conséquence une perte de fermeté et d'élasticité cutanée et l'apparition de rides (Andreassi and Andreassi 2003; Kusumawati and Indrayanto 2013). L'utilisation d'antioxydants par voie topique permettrait de maintenir le pool d'antioxydant pour protéger la peau (Ratz-Lyko et al. 2012; Kusumawati and Indrayanto 2013).

Les ingrédients cosmétiques sont relativement peu règlementés en Europe, le fabricant est responsable de la sécurité de son produit et doit s'assurer de son innocuité et, quand cela se justifie, apporter la preuve d'un effet revendiqué (Novoveská et al. 2019). De plus, de manière générale l'antioxydant doit rester stable, ne pas modifier l'aspect, l'odeur ou la couleur du produit (Soto et al. 2018). Ainsi une multitude d'antioxydants naturels existent sur le marché des cosmétiques qu'il s'agisse de composés purs ou d'extraits à la composition complexe. Les microalgues sont déjà couramment utilisées pour leur activité antioxydante dans les produits cosmétiques. Sur la base de données européennes des substances et ingrédients cosmétiques (European Commission database for information on cosmetic substances and ingredients, CosIng, European Commission 2016) des extraits de *Thalassiosira aestivalis.*, *Chaetoceros*

spp., *Nannochloropsis* spp., *Chlorella* spp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, et *Tetraselmis chui* sont déjà référencés comme actifs antioxydants.

## 4.2. Agro-alimentaire

Dans l'industrie agro-alimentaire, les antioxydants sont utilisés pour l'alimentation humaine et animale comme conservateurs pour prolonger la durée de vie des aliments et boissons afin de prévenir leur dégradation par oxydation, et comme ingrédients fonctionnels pour apporter des avantages nutritionnels à un aliment (par exemple un jus d'orange enrichi en vitamine C) (Carocho et al. 2017; Lourenço et al. 2019). L'utilisation d'ingrédients antioxydants dans les produits alimentaires à destination des humains est très règlementée par des lois spécifiques à chaque pays. Dans l'Union Européenne, il existe une liste d'additifs antioxydants autorisés dont quelques-uns peuvent être d'origine naturelle tels que la vitamine C (E300-E304), la vitamine E (E306-E309), la résine de gaïac (E314) et l'extrait de romarin (E392). Certains caroténoïdes sont également autorisés comme colorants, mais peuvent avoir un rôle antioxydant tel que le  $\beta$ -carotène (E160a), le lycopène (E160d), la lutéine (E161b), la violaxanthine (E161e), la zéaxanthine (E161h), la canthaxanthine (E161g) ou l'astaxanthine (E161j) (Carocho et al. 2017).

Pour les aliments et ingrédients qui n'ont pas été consommés de façon significative avant 1997, ce qui est le cas de presque toutes les microalgues, le règlement européen dit « Novel Food » s'applique (European Commission 2015). La mise sur le marché des « Novel Food » doit faire l'objet d'une autorisation qui ne sera délivrée que s'il a été montré que l'aliment ne présente aucun risque en matière de sécurité pour la santé humaine (Turck et al. 2016). Au-delà du cadre réglementaire, pour présenter un intérêt pour l'industrie agro-alimentaire, un antioxydant ne devrait pas affecter la couleur, l'odeur et le goût de l'aliment, et devrait être efficace à faible concentration (0.001-0.01 %), être facilement utilisable, être stable pendant la transformation et le stockage et être peu coûteux (Carocho et al. 2017; Lourenço et al. 2019). A l'heure actuelle, une vingtaine d'espèces de microalgues sont autorisées pour la consommation humaine en Europe en tant qu'aliment ou ingrédient alimentaire (CEVA 2019).

Pour les aliments destinés aux animaux, les additifs antioxydants sont soumis à autorisation préalable de mise sur le marché qui reste uniquement valable dix ans après leur délivrance. Les matières premières ne sont par contre pas soumises à autorisation préalable, mais un apport de microalgue comme antioxydant dans un aliment pour animaux ne pourrait être considéré comme matière première que si elle fournit par ailleurs des protéines, des minéraux, des matières grasses, des fibres, de l'énergie ou des glucides (European Commission 2013).

Enfin on peut noter l'utilisation d'antioxydant dans des emballages « actifs » ou des films protecteurs comestibles appliqués sur l'aliment, en alternative à l'incorporation d'antioxydant dans le produit (Sanches-Silva et al. 2014).

### 4.3. Santé

Dans le domaine de la santé, les antioxydants sont essentiellement utilisés dans les compléments alimentaires. Il a été montré que le stress oxydatif jouait un rôle crucial dans la pathogenèse de nombreuses maladies, telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, les maladies inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes et les cancers (Cacciapuoti 2016; Singh et al. 2019). De plus, les études épidémiologiques ont montré qu'une consommation régulière d'aliments riches en antioxydants réduirait le risque de développer des maladies associées au stress oxydatif (Calvani et al. 2020). Il a donc été suggéré que la supplémentation alimentaire en antioxydants pouvait participer à prévenir ces maladies. De nombreuses études basées sur des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré l'effet bénéfique des molécules antioxydantes pour la santé (Pashkow et al. 2008; Park et al. 2010; Peng et al. 2011; Jain and Ramawat 2013; Gammone et al. 2015). Cependant l'utilisation de compléments alimentaires antioxydants est soumise à controverse, car les études cliniques, rares, présentent des résultats contradictoires probablement du fait de différents dosages, formulations, durées de traitement, et populations testées (Smeriglio et al. 2020). Certaines études ont même montré des effets dangereux pour la santé, par exemple une augmentation de 18 % d'apparition du cancer des poumons a été observée chez des fumeurs qui avaient été supplémentés en  $\beta$ -carotène à forte doses (Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group 1994).

Malgré cette controverse, le secteur des compléments alimentaires antioxydants est en pleine croissance. Les compléments alimentaires étant considérés comme des denrées alimentaires, le règlement « Novel Food » s'applique pour de nouveaux ingrédients, tels que les microalgues. Il existe une liste positive de substances vitaminiques et minérales autorisées avec des limites maximales et minimales, parmi lesquelles les vitamines C et E, et le  $\beta$ -carotène. De plus, les allégations santé (par exemple « la vitamine E contribue à la protection des cellules contre le stress oxydatif ») sont strictement encadrées par la réglementation européenne. En effet, les compléments alimentaires n'étant pas des médicaments, ils ne peuvent pas revendiquer un effet thérapeutique (European Commission 2002). La vingtaine de microalgues autorisées en alimentation humaine (CEVA 2019) sont déjà largement utilisées dans les compléments alimentaires, seules (chlorelle par exemple) ou en « cocktail » avec d'autres ingrédients, en utilisant l'algue *in toto* ou à partir d'extraits.

---

## **Chapitre 2 - Méthode d'isolement des microalgues**

---



## 1. Contexte

La première étape de ce travail était de constituer une souchothèque de microalgues calédoniennes. L'un des critères était d'isoler des espèces robustes, capables de résister aux conditions environnementales locales et de se développer en bassins extérieurs ouverts où les paramètres de culture peuvent fortement varier (par exemple la salinité avec l'évaporation ou des fortes pluies et la température entre le jour et la nuit). Un deuxième critère retenu concernait la mise en évidence d'un taux de croissance élevé, pour obtenir de fortes productivités, les microalgues étant destinées à une filière de production de biomasse.

Pour répondre au premier critère, les zones de prélèvements soumises à des fortes variations des paramètres environnementaux (lumière, température, salinité...) ont été privilégiées, telles que les estuaires de rivières, les fonds de baies ou les mangroves.

Il existait plusieurs options pour isoler les microalgues à partir de prélèvements naturels. L'utilisation de méthodes « traditionnelles » (Andersen and Kawachi 2005) telles que :

- L'isolement cellule à cellule par micropipette : l'objectif est de prélever une cellule (sous le microscope ou la loupe binoculaire) par aspiration à l'aide d'une micropipette formée à partir d'une pipette pasteur ou un capillaire, effilés à la flamme. La cellule est déposée dans une goutte d'eau stérile, puis prélevée à nouveau et redéposée dans une autre goutte. Le processus est répété jusqu'à obtenir une cellule « propre » de tout protiste ou autre espèce de microalgue ; elle est ensuite mise en culture. Cette technique requière une certaine dextérité, et est difficile à mettre en œuvre pour les cellules de petites tailles et/ou très mobiles.
- L'isolement en milieu solide : un échantillon est déposé et répandu à la surface d'une plaque d'agar enrichie en milieu de culture de manière similaire aux techniques utilisées pour les bactéries. La plaque est ensuite incubée jusqu'à ce que des colonies de cellules de microalgues se forment. Les colonies sont ensuite prélevées et mises en culture. Cette méthode est limitée aux espèces qui ont la capacité de croître sur un milieu solide.
- L'isolement par dilutions : le principe de cette méthode est de diluer un échantillon jusqu'à obtenir une cellule par échantillon. Si la concentration cellulaire est connue, le taux de dilution peut être calculé pour obtenir, en théorie, une cellule pour un volume donné, sinon, des dilutions successives peuvent être réalisées et mises en culture. Cette méthode est efficace pour isoler une espèce abondante dans un échantillon, mais limite l'isolement d'espèces faiblement concentrées.

Globalement ces méthodes sont fastidieuses, et donnent peu d'informations sur la vitesse de croissance des espèces. Il est aussi possible d'isoler les microalgues de manière plus

automatisée en utilisant un cytomètre en flux associé à un trieur (Sieracki et al. 2005), cependant ce matériel est coûteux et n'est souvent pas disponible dans les laboratoires. De plus cette technique ne donne pas non plus d'indication sur le taux de croissance.

Aussi, pour isoler les microalgues ayant les plus forts taux de croissance, une méthode d'isolement basée sur le principe de la « compétition-exclusion » en culture continue a-t-elle été développée. Cette technique d'isolement a été décrite de manière théorique et modélisée (Masci et al. 2008; Bayen and Mairet 2014; Djema et al. 2020), mais n'avait, à notre connaissance, jamais été appliquée à des échantillons naturels afin de constituer une banque de souche.



## 2. A dilution-exclusion approach using continuous culture in stirred closed photobioreactors to isolate microalgae strains from tropical coastal water

**Article soumis dans Methods X :** Coulombier N, Le Déan L, Malo F, Brun P, Lebouvier N, Jauffrais T. A dilution-exclusion approach using continuous culture in stirred closed photobioreactors to isolate microalgae strains from tropical coastal water

### 2.1. Résumé

Pour développer la production commerciale de microalgues dans les zones tropicales il est nécessaire de cribler la biodiversité afin d'identifier des souches originales et productives. Pour répondre à cet objectif, l'une des conditions préalables est d'isoler des espèces adaptées aux conditions climatologiques et ayant un taux de croissance élevé. Dans cette étude, nous décrivons une méthode pour isoler des espèces de microalgues robustes et à croissance rapide. Nous avons couplé l'utilisation d'un collecteur de phytoplancton à une technique d'isolement par "dilution-exclusion" en photobioréacteur (PBR) pour isoler des souches de microalgues parmi un assemblage de phytoplancton provenant du milieu naturel et exposé aux conditions tropicales côtières.

- Un collecteur de phytoplancton a été développé pour concentrer de manière douce les microalgues *in situ*. Un facteur de concentration jusqu'à dix a été atteint en fonction de la biomasse et de la turbidité des microalgues.
- Grâce à la culture en continu qui impose un taux de dilution, les microalgues ont ensuite été isolées en fonction de leur vitesse de croissance et de leur capacité à supporter les paramètres physico-chimiques appliqués dans les PBR (par exemple, la lumière, la température, la salinité, le pH).
- L'objectif était d'isoler des souches de microalgues adaptées aux conditions environnementales locales afin de pouvoir les cultiver en PBR et en systèmes ouverts.

### 2.2. Abstract

To develop microalgae commercial production in tropical areas, it is necessary to screen their biodiversity to identify original and productive strains. With this goal, a common prerequisite is to isolate species with high growth rate and that are adapted to specific climatological conditions. In the present study, we describe a method to isolate robust and fast growing microalgae species. We used a phytoplankton sampler coupled with a "dilution-exclusion"

approach using a stirred closed photobioreactor (PBR) to isolate microalgae strains from natural phytoplankton community exposed to tropical coastal conditions.

- A cross shape phytoplankton sampler was developed to gently concentrate the microalgae in situ by a factor up to ten depending on microalgal biomass and turbidity.
- Microalgae were then isolated based on their growth dynamics in PBRs and on their capacity to handle physicochemical parameters (e.g. light, temperature, salinity, pH).
- The objective was to isolate microalgae strains adapted to the local climatological conditions to support culture in closed stirred PBRs and open pond systems.

**Keywords :** microalgae, isolation, selection, PBR, aquaculture, biotechnology

### **2.3. Background**

Isolation of microalgae for culture purpose is well established (reviewed in Andersen and Kawachi 2005). Nonetheless, isolation pipelines for specific use are still under development and it is necessary to screen the biodiversity to identify original and productive strains to further develop the microalgae industry (Meireles et al. 2003; Rodolfi et al. 2009; Boelen et al. 2013; Chauton et al. 2015; Steinrücken et al. 2017). In addition, even though international microalgae culture collections already offer a large resource to explore, there are several interests to constitute local strain collection. First, local microalgae strains are expected to be more adapted to local environmental conditions. Furthermore, introduction of non-native microalgae species are often limited by regional environmental policy. In addition, intellectual property of international culture collection and global regulation such as Nagoya protocol about the access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization could be obstacles to the development of commercial production of microalgae (Jakob 2013). One common prerequisite to produce commercially microalgae is to isolate species with relatively high growth rates and productivity (Chauton et al. 2015) that are adapted to the local climatological conditions to support culture in open raceway pond systems and in stirred closed photobioreactors. However, traditional methods of isolation are time consuming, require skill and patience, and do not provide information about the growth rate of the isolated species. It was demonstrated by modelling growth with one limiting substrate that continuous culture in chemostat could be used to select microorganisms from a pool of species according to the competitive-exclusion principle (Smith and Waltman 1995; Masci et al. 2008; Bayen and Mairet 2014). This principle states that the species which can grow at a rate equal to the dilution

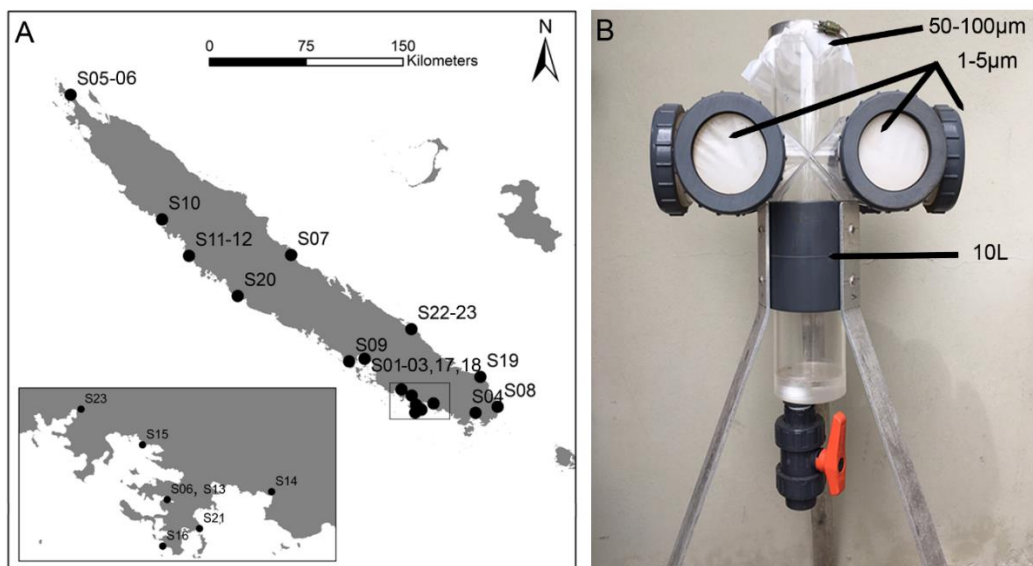
rate survives whereas the others species will disappear (Smith and Waltman 1995; Masci et al. 2008; Bayen and Mairet 2014). In the present study, we describe a method developed, and used, to concentrate and then isolate fast growing and robust microalgal species using a “dilution-exclusion” approach in stirred closed photobioreactor (PBR).

## 2.4. Sample Collection

Seawater samples were collected in different coastal habitats exposed to peculiar environments (e.g., metal-rich terrigenous inputs, salinity, temperature) around the main land of New Caledonia (Figure 24A, Table 4).

In the field, microalgae were concentrated in a homemade phytoplankton sampler (Figure 24B):

1. The seawater was filtered through a 50 or 100  $\mu\text{m}$  mesh to suppress small grazers and large particles (Figure 24).
2. The water in excess went through six 1 or 5  $\mu\text{m}$  meshes (Figure 24B, Table 5) to concentrate the microalgae by a factor up to 10.
3. The seawater was collected from the 10 L phytoplankton sampler (Figure 24B) and immediately transported to the laboratory.



**Figure 24.** Map of New Caledonian Islands highlighting the sampling sites where the seawater containing the isolated strains were collected (A). Phytoplankton sampler developed to filtrate and concentrate the algae (B).

**Table 4.** Sampling date, site and culture codes, and field data registered at the different sampling sites in New Caledonia

Site & culture codes	Field data							Site description
	Salinity	Temperature (°C)	pH	O <sub>2</sub>	Filtered volume (L)	Entrance mesh (µm)	Exit mesh (µm)	
S01	34	26.1	8.39	nd	10	100	1	Semi intensive shrimp pond
S02	38	23	8	nd	3	30	nd	Shrimp tank
S03	36	24.6	8.8	9.8	50	100	5	Semi intensive shrimp pond
S04	30	27.6	8.3	6.4	50	100	1	Mining industry, mangrove zone, river estuaries
S05	150	32.2	8.3	3.3	5	100	nd	Salt pan
S06	36	28	8	nd	90	100	1	Nickel industry, urban zone
S07a-b	34.9	28.5	8.06	6.1	80	50	1	Enclosed bay
S08	26.41	21	7.91	5.2	30	50	1	River estuary
S09a-b	nd	nd	nd	nd	5	100	nd	Shrimp pond effluent
S10	38.4	24.5	7.76	5.1	nd	nd	nd	Semi intensive shrimp pond effluent
S11	27	30.4	7.8	5.1	50	50	1	Mangrove zone, river estuary
S12	29.8	20.4	7.94	4.5	120	50	1	Mangrove zone, river estuary
S13	34.7	23.4	7.96	7.1	50	100	1	Nickel industry, urban zone
S14	11.72	22	7.84	5.8	10	50	nd	River estuary
S15	34.9	22.1	7.9	5.8	60	100	1	River estuary
S16	36.74	nd	nd	nd	>100	100	1	Oceanic influence, urban zone
S17	36.5	27	7.83	5.4	5	50	nd	Shrimp biofloc tank
S18	36.4	29	7.5	6.3	5	50	nd	Shrimp biofloc tank
S19	20	26.5	7.05	3.6	5	50	nd	River estuary
S20	36.3	30	7.2	3	70	100	1	Semi intensive shrimp pond effluent
S21	37.8	25.1	6.6	4.5	30	100	1	Oceanic influence, urban zone
S22	15	25.4	8.09	7.1	80	100	1	Mangrove zone, river estuary
S23	2	30.3	8.77	0.7	80	100	1	River estuary

**Table 5.** Culture codes, initial number of phytoplankton genus observed in the collected seawater and experimental conditions applied, dilution rate ( $\mu$ ), temperature, salinity, pH, and PAR to isolate different microalgae strains. PAR: photosynthetically active radiation.

culture codes	Culture conditions						Isolated Strains
	Genus observed	$\mu$ day <sup>-1</sup>	Temp °C	Sal	pH	Incident PAR $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$	
S01	5	0.15	28	35	7.56	90	<i>Picochlorum</i> sp.
S02	10	0.2	20	35	8	30	<i>Cylindrotheca</i> sp.
S03	10	0.2	25	35	8	150	<i>Tetraselmis</i> sp.
S04	6	0.2	27	35	7.5	200	<i>Nephroselmis</i> sp.
S05	2	0.1	28	120	7.5	700	<i>Dunaliella</i> sp.
S06	11	0.3	21	35	7.5	50	<i>Thalassiosira</i> sp. & <i>Nitzschia</i> sp.
S07a-b	11	0.3	21	35	7.5	95	<i>Chaetoceros</i> sp. & <i>Nitzschia</i> sp.
S08	8	0.2	20	35	8.5	120	<i>Chaetoceros</i> sp.
S09a-b	10	0.3	28	35	7.5	300	<i>Arthrospira</i> sp. & <i>Schizochlamydeella</i> sp.
S10	5	0.3	28	35	7.5	100	<i>Tetraselmis</i> sp.
S11	10	0.2	30	35	7.5	70	<i>Asterionellopsis</i> sp. & <i>Entomoneis</i> sp.
S12	10	0.3	28	35	7.5	220	<i>Chaetoceros</i> sp.
S13	10	0.25	27	35	7.5	150	<i>Pavlova</i> sp.
S14	9	0.3	27	12	7.5	140	<i>Chaetoceros</i> sp.
S15	12	0.4	25	35	7.5	165	<i>Nitzschia</i> sp. & <i>Entomoneis</i> sp.
S16	7	0.4	27	35	7.5	215	<i>Chaetoceros</i> sp.
S17	8	0.5	27	35	6.8	600	<i>Chaetoceros</i> sp.
S18	3	0.4	29	35	7.5	125	<i>Odontella</i> sp.
S19	9	0.2	29	35	8.5	70	<i>Entomoneis</i> sp.
S20	11	0.3	23	35	8.5	650	<i>Rhodomonas</i> sp.
S21	7	0.2	23	35	6.5	200	<i>Tetraselmis</i> sp.
S22	4	0.3	21	35	7.8	50	<i>Chaetoceros</i> sp.
S23	9	0.2	23	35	7.5	280	<i>Rhodomonas</i> sp.

## 2.5. Isolation

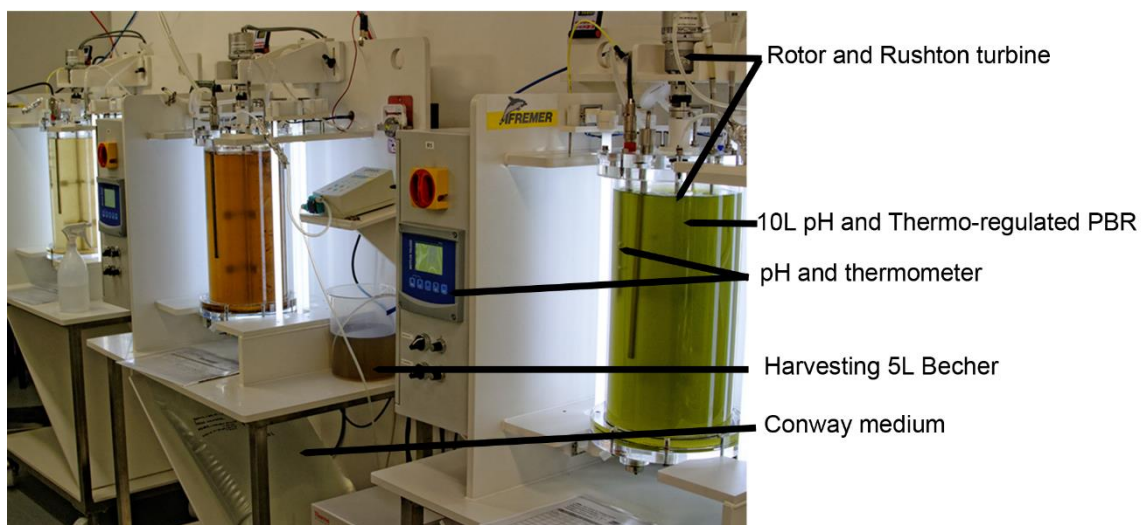
The microalgae strains were isolated using stirred tubular PBRs of 10 L (460 mm × 250 mm), made of transparent polymethylmethacrylate (PMMA, Figure 25).

1. Prior inoculation, PBRs were sterilized using peroxyacetic acid (5 ppm) for 20 min and rinsed twice with filtered seawater (0.2  $\mu\text{m}$ ).
2. The PBRs were inoculated with 10 L of concentrated pre-filtered seawater samples with addition of Conway medium (Walne 1966) and silicates ( $1.4 \times 10^{-4}$  M).
3. The PBRs were operated using different conditions depending on season and sampling site (Table 5). The pH was maintained between 7.0 - 8.5 using automatic CO<sub>2</sub> addition with a pH measurement loop (electrode InPro4800SG, Mettler Toledo) and the temperature was thermo-regulated between 20-30°C with a recirculating chiller (Thermo Scientific, Accel 250LC). A continuous light was provided on one-half side of the reactor using seven adjustable fluorescent

light tubes (OSRAM cool daylight HO24W/965, Figure 25). A Rushton turbine was used to stir the culture between 30 and 120 rpm (Figure 25).

4. After inoculation, the culture was kept in batch for a few days (2 to 4 days) to increased microalgal concentration and then conducted in continuous at given dilution rates (up to  $0.5 \text{ day}^{-1}$ , Table 5) in a Conway culture medium (Walne 1966). The culture produced was collected daily in a 3L beaker to control the dilution rate, the cell concentration and number and proportion of species. In agreement with the competitive-exclusion principle (Smith and Waltman 1995; Bayen and Mairet 2014), species with growth rate lower than the dilution rate were washed out over time, and the dominant species with the higher growth rate remained in the PBRs. Dilution rate was increased until one or two single species were microscopically identified (Figure 26).

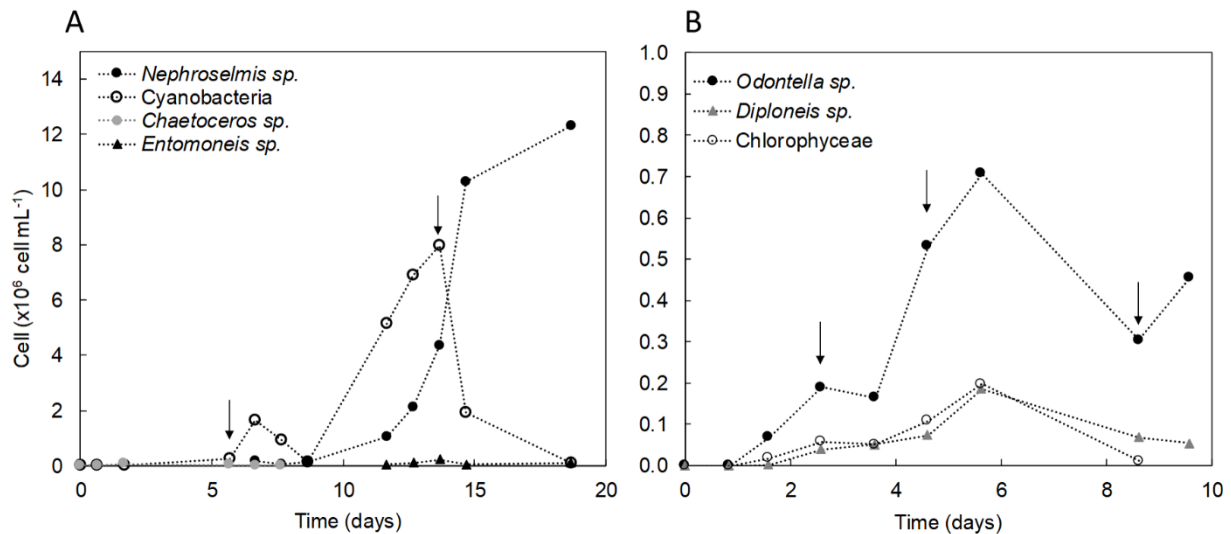
5. A classical dilution technique was then used to obtain a monospecific culture of the dominant species (Andersen and Kawachi 2005) that was subsequently treated with an antibiotic mix (Le Chevanton et al. 2013; Jauffrais et al. 2017).



**Figure 25.** 10L stirred closed photobioreactor developed to carry out the “dilution-exclusion” approach to isolate the fast growing microalgae strains. Temperature, light, pH, rotor speed, dilution rate and medium content are controlled.

The “dilution-exclusion” approach using PBR in continuous culture in chemostat was described and modelled previously (Masci et al. 2008; Bayen and Mairet 2014; Djema et al. 2020), however, to our knowledge, it has never been implemented on natural phytoplankton community to isolate microalgae. In this study, it was used several times on natural phytoplankton communities. Different sites were sampled in New Caledonia (Figure 24A) to

isolate species/strains able to sustain a production in PBR with a relatively high growth rate. The number of genus microscopically observed and identified at each sampling site and the culture condition applied to isolate the different strains are presented in Table 5. These cultures conditions allowed to isolate 28 strains (e.g. Table 5), from natural phytoplankton community that are now going to be taxonomically identified at specific rank using morphological and DNA metabarcoding. However, the success rate of this isolation process is between 20-25% owing to bacterial or undesired picoplankton contaminations in PBRs.



**Figure 26.** Example of two cultures in PBR using the “dilution-exclusion” approach. Cell culture concentration (cell mL<sup>-1</sup> x 10<sup>6</sup>) of S04 over 20 days in photobioreactor operating in continuous culture mode at 0.1 (black arrow at day 6) and 0.2 day<sup>-1</sup> (black arrow at day 14) dilution rate allowing to isolate *Nephroselmis sp.* (A) and of S18 over 10 days in photobioreactor operating in continuous culture mode at 0.2 (black arrow at day 3), 0.3 (black arrow at day 5) and 0.4 day<sup>-1</sup> (black arrow at day 9) dilution rate allowing to isolate *Odontella sp.* (B). Only species observed more than one day are represented (lines are drawn to guide the eyes).

## 2.6. Acknowledgments

The authors are thankful to Dr. Simon Van Wynsberge, for kindly providing the map and to authors are thankful to Dr. Liêt Chim for improving a first version of the manuscript. The authors acknowledge the Province Nord, the Province Sud, the Government of New Caledonia and the Comité Interministériel de l’Outre-Mer (CIOM) for financial support through the AMICAL1 and 2 research programs.

The South Province of New Caledonia (n°26960, n°1546 and n°9705) and the North Province of New Caledonia (n°609011-55 and n°609011-54) delivered the sampling authorizations.





---

## **Chapitre 3 - Criblage de l'activité antioxydante**

---



## 1. Contexte

Les microalgues calédoniennes sont naturellement exposées aux éléments traces métalliques et à de forts rayonnements UV du fait de la position géographique de la Nouvelle-Calédonie par rapport à la couche d'ozone. De plus les microalgues de la souchothèque AMICAL proviennent de zones soumises à de fortes intensités lumineuses (souvent au-dessus de  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) et aux variations des paramètres environnementaux, notamment la salinité, la température et le pH. L'exposition à cet environnement singulier a probablement permis aux microalgues calédoniennes d'acquérir des mécanismes d'adaptation *via* la synthèse de métabolites spécifiques avec potentiellement des propriétés antioxydantes.

Un criblage de l'activité antioxydante a donc été réalisé sur douze espèces de la souchothèque AMICAL et les résultats sont présentés dans ce chapitre. Les douze espèces de microalgues ont été choisies parmi l'ensemble des souches isolées en Nouvelle-Calédonie pour deux raisons (i) leur facilité de culture et de récolte pour anticiper une future montée en échelle ; (ii) leur appartenance à différents groupes taxonomiques afin d'avoir de la diversité parmi les espèces testées.

Afin de prendre en compte les différents mécanismes d'action des antioxydants, il est nécessaire d'utiliser plusieurs tests (Frankel and Meyer 2000; Prior et al. 2005). Par conséquent, dans cette étude quatre tests antioxydants complémentaires les uns des autres ont été utilisés : les tests DPPH et ABTS qui mesurent l'action d'un antioxydant contre les radicaux DPPH et ABTS, le test ORAC qui mesure la capacité d'un antioxydant à neutraliser le radical peroxyde, et le test TBARS qui mesure la capacité à inhiber la peroxydation des lipides (voir paragraphe 3.4.1 page 41 pour le détail des mécanismes des tests).

L'activité antioxydante des microalgues est connue pour être influencée par les paramètres de culture, tels que l'intensité lumineuse, la température, le pH ou la salinité (Guedes, Amaro, Pereira, et al. 2011a; Sozmen et al. 2018; Smerilli et al. 2019). L'intensité lumineuse est un paramètre particulièrement important car elle impacte directement la photosynthèse qui est un processus générateur d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, l'exposition à des intensités lumineuses qui dépassent les capacités photosynthétiques de la cellule (photoinhibition) conduit à une augmentation de la formation d'ERO, principalement de l'oxygène singulet au niveau du centre réactionnel du PSII et des radicaux superoxydes au niveau du PSI (Krieger-Liszkay et al. 2008; Demidchik 2015). Le système antioxydant, notamment les caroténoïdes, est mobilisé pour protéger l'appareil photosynthétique des dommages provoqués par un excès d'ERO (Telfer et al. 2008), influençant ainsi l'activité

antioxydante. La valeur d'intensité lumineuse entraînant la photoinhibition est dépendante de l'espèce (Gómez et al. 2004), on peut donc s'attendre, selon les espèces, à des effets différents de l'intensité lumineuse sur l'activité antioxydante. Les caroténoïdes sont particulièrement impliqués dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique. En effet, ils préviennent la production d'ERO grâce au cycle des xanthophylles par la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur (Jahns and Holzwarth 2012), et désactivent certaines ERO, notamment l'oxygène singulet (Telfer et al. 2008). Aussi, afin d'évaluer l'effet de l'intensité lumineuse, l'activité antioxydante a-t-elle été mesurée sur des microalgues cultivées à deux intensités lumineuses, une faible ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) et une relativement forte ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). De plus pour mettre en évidence les liens entre l'activité antioxydante et le contenu en caroténoïdes, la composition pigmentaire des douze espèces de microalgues a été déterminée en HPLC.

## 2. Impacts of light intensity on antioxidant capacity and carotenoid content of tropical algae

**Article publié :** Coulombier N, Nicolau E, Le Déan L, Antheaume C, Jauffrais T, Lebouvier N. 2020. Impact of Light Intensity on Antioxidant Activity of Tropical Microalgae. *Marine Drugs*. 18(2):122

### 2.1. Résumé

Douze espèces de microalgues isolées dans les lagons tropicaux de Nouvelle-Calédonie ont été criblées pour évaluer leur potentiel comme nouvelle source d'antioxydants. Les microalgues ont été cultivées à deux intensités lumineuses afin d'étudier l'influence de ce facteur sur l'activité antioxydante.

Afin d'évaluer les propriétés antioxydantes des extraits de microalgues, quatre tests avec différents modes d'action ont été utilisés : DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygénés) et TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique). Ce criblage a été couplé à une analyse pigmentaire afin de relier l'activité antioxydante et la teneur en caroténoïdes. Les résultats ont montré qu'aucune des microalgues étudiées ne peut neutraliser les radicaux DPPH et ABTS. Par contre *Chaetoceros* sp., *Nephroselmis* sp. et *Nitzschia* A sp. ont la capacité de neutraliser le radical peroxyde (ORAC) et *Tetraselmis* sp., *Nitzschia* A sp. et *Nephroselmis* sp. peuvent inhiber la peroxydation des lipides (TBARS). La composition en caroténoïdes est typique des microalgues étudiées et l'analyse pigmentaire met en évidence la présence de siphonaxanthine, détectée chez *Nephroselmis* sp., comme un pigment d'intérêt. Il a été constaté que les xanthophylles étaient les principaux contributeurs à la capacité de piégeage des radicaux peroxydes mesurée par le test ORAC, mais qu'il n'y avait pas de lien entre les caroténoïdes et l'inhibition de la peroxydation des lipides mesurée par le test TBARS. De plus, les résultats ont montré que l'intensité lumineuse a une forte influence sur la capacité antioxydante des microalgues : dans l'ensemble, les activités antioxydantes mesurées avec le test ORAC sont meilleures à haute intensité lumineuse, tandis que les activités antioxydantes mesurées avec le test TBARS sont meilleures à faible intensité lumineuse. Cela suggère que la production de composés antioxydants différents est liée à l'intensité lumineuse.

## 2.2. Abstract

Twelve microalgae species isolated in tropical lagoons of New Caledonia were screened as a new source of antioxidants. Microalgae were cultivated at two light intensities to investigate their influence on antioxidant capacity. To assess antioxidant property of microalgae extracts, four assays with different modes of action were used: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and thiobabaturic acid reactive substances (TBARS). This screening was coupled to pigment analysis to link antioxidant activity and carotenoid content. The results showed that none of the microalgae studied can scavenge DPPH and ABTS radicals, but *Chaetoceros* sp., *Nephroselmis* sp., and *Nitzschia* A sp. have the capacity to scavenge peroxy radical (ORAC) and *Tetraselmis* sp., *Nitzschia* A sp., and *Nephroselmis* sp. can inhibit lipid peroxidation (TBARS). Carotenoid composition is typical of the studied microalgae and highlights the siphonaxanthin, detected in *Nephroselmis* sp., as a pigment of interest. It was found that xanthophylls were the major contributors to the peroxy radical scavenging capacity measured with ORAC assay, but there was no link between carotenoids and inhibition of lipid peroxidation measured with TBARS assay. In addition, the results showed that light intensity has a strong influence on antioxidant capacity of microalgae: Overall, antioxidant activities measured with ORAC assay are better in high light intensity whereas antioxidant activities measured with TBARS assay are better in low light intensity. It suggests that different antioxidant compounds production is related to light intensity.

**Keywords:** *Nephroselmis*; light intensity; *in vitro* antioxidant activity; siphonaxanthin; carotenoid; bioactive compounds

## 2.3. Introduction

In the last decade, the demand has increased for sustainable sources of natural antioxidants for nutritional, cosmetic, and pharmaceutical applications as an alternative to controversial synthetic antioxidants. Most natural antioxidants available on the market derive from terrestrial plants (Augustyniak et al. 2010), but new antioxidants from marine origin are getting attention (Gammone et al. 2015; Aklakur 2016; Galasso et al. 2017). Microalgae are a promising source for natural antioxidant products (Guedes, Amaro, and Malcata 2011a; Zuluaga et al. 2017), as their productivity is greater than terrestrial plant (Wijffels et al. 2010), culture conditions could be controlled, and marine microalgae production at a commercial scale does not compete with

agriculture for freshwater access and arable land. In addition, to be adapted to a large range of environments, microalgae produce a large diversity of secondary metabolites (Guedes, Amaro, and Malcata 2011b; Mimouni et al. 2012). This exceptional chemodiversity is being explored and is a promising source of antioxidant (Li et al. 2007; Rodriguez-Garcia and Guil-Guerrero 2008; Hajimahmoodi et al. 2010; Goiris et al. 2012; Ahmed et al. 2014; Maadane et al. 2015), as only few species have been investigated among the thousands described. To highlight the full potential of microalgae, identifications of new high producing strains and new compounds are needed. It is thus necessary to identify new strains with high productivity and/or new compounds of interest.

The production of secondary metabolites by microalgae is modulated by environmental conditions (Guedes, Amaro, Pereira, et al. 2011; Barra et al. 2014; Paliwal et al. 2017; Chen, Wan, et al. 2017). In response to abiotic stresses (i.e., high light, UV, salinity, temperature, metal concentration, or nutrient starvation), through photosynthesis and aerobic metabolism microalgae produce reactive oxygen species (ROS) which can be toxic and cause cell damages. Microalgae have developed defense strategies. One of them is the synthesis of an heterogeneous group of molecules which have the ability to delay, prevent, or remove oxidative damage to the cell (Halliwell 2007). It includes enzymes (e.g., superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic molecules such as carotenoids, phenolic acids, or vitamins C and E (Abalde et al. 1991; Raposo and de Moraes 2015; Safafar et al. 2015) that are present in high concentration in some species (Cezare-Gomes et al. 2019). Carotenoids protect the cell against oxidative stress by dissipating excess of energy through the xanthophyll cycle (Demmig-Adams and Adams 1996; Latowski et al. 2011; Jahns and Holzwarth 2012) and by scavenging ROS, mainly singlet oxygen and peroxy radical (Stahl and Sies 1993, 2003; Patias et al. 2017). In an aquatic environment and especially in tropical areas, microalgae are submitted to strong light variation and have to quickly adapt to light excess or limitation. The effect of light on antioxidants production, especially carotenoids, is known to be complex and species specific (Ben-Amotz and Avron 1983; Hejazi and Wijffels 2003; Lamers et al. 2010; Xia et al. 2013; Ho et al. 2014; McClure et al. 2018). While many studies focus on the effect of light on specific antioxidant molecules, investigations about its effect on global antioxidant activity of microalgae are scarce. However, nutraceuticals or aquaculture preparations often use the whole biomass or crude algal extract, with no purification of molecules of interest.

In this study, we aimed to explore the bio and chemodiversity of microalgae present in lagoons of New Caledonia, a well-known hotspot of biodiversity (Laurent and Pietra 2004; Motuhi et al. 2016). Specific environmental conditions (i.e., high UV radiation owing to the leaner ozone

layer and high metal concentration of natural origin or caused by mining activity) made these lagoons a source of original microalgae strains with unusual phenotypes, and promising molecules. In this context, microalgae strains were isolated from areas of New Caledonia particularly exposed to metal-rich terrigenous inputs, with strong variation and exposure to sun, salinity, and temperature (Motuhi et al. 2016). We hypothesized that microalgae exposed to these stressful environments might have developed adaptive mechanisms using original secondary metabolites with interesting antioxidant properties. We tested this hypothesis by using four different antioxidant assays, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and thiobabaturic acid reactive substances (TBARS) coupled with pigment analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) to (i) screen and assess the global antioxidant capacities and pigment composition of twelve microalgae species grown at two light intensities, and (ii) to investigate the link between carotenoids concentration and antioxidant properties.

## 2.4. Material and methods

### 2.4.1. Strains

Twelve species of microalgae isolated in New Caledonia have been selected for their ease of handling and high growth potential (Motuhi et al. 2016). Authorizations for the sampling were delivered by the South Province of New Caledonia (n°26960, n°1546, and n°9705) and the North Province of New Caledonia (n°609011-55 and n°609011-54). The twelve species belong to six classes: Five of them are Bacillariophyceae; *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia* sp. A, *Nitzschia* sp. B, *Bacillaria* sp., and *Entomoneis punctulata*, two strains belong to Mediophyceae; *Chaetoceros* sp. and *Thalassiosira weissflogi*, two of them are Trebouxiophyceae; *Picochlorum* sp. and *Schizochlamydeella* sp., one strain belongs to Chlorophyceae; *Dunaliella* sp., one strain is a Chlorodendrophyceae; *Tetraselmis* sp., and the last strain *Nephroselmis* sp. belongs to Nephrophyceae (Annexe 1).

### 2.4.2. Culture conditions

For antioxidant assays, microalgae were cultivated in 10 L air bubbled balloon in batch condition. They were inoculated by seven day old cultures grown in the same conditions. Cultures were done in Conway-enriched seawater (Walne 1966) filtered at 0.2 µm and sterilized. Temperature was set at 28 °C ± 1, and pH regulated at 7.5 ± 0.3 by CO<sub>2</sub> injection. Continuous light was applied and set using a Li-cor quantum meter (LI-250A) with a spherical probe (US-SQS/L) at two different intensities of 250 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (low light condition) and



600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (high light condition) to all species, except for *Bacillaria* sp. which was unable to grow in HL condition. At stationary growth phase, microalgae biomasses were harvested by centrifugation, freeze dried, and kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until extraction.

For pigment analysis, microalgae were grown in sterile 1 L flasks in the same conditions as 10 L cultures for antioxidant assays without pH regulation. Cells were harvested by centrifugation, freeze dried, and kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2.4.3. Extraction

Two extraction protocols were applied, a first one for antioxidant assays and pigments quantification with a mixture of solvent with a broad polarity to extract a large variety of secondary metabolite, and a second one for the specific characterization of the microalgae pigment composition. Methanol/dichloromethane (MeOH/DCM) dried extracts for evaluation of antioxidant activity were obtained by suspending freeze dried biomasses (1.5 to 5.5 g) from 10 L cultures in 100 mL of MeOH/DCM mixture (50:50 v/v), and submitted to ultrasound for 60 min. Extracts were then filtered and the process was repeated until the biomass became colorless. The crude MeOH/DCM extracts were pooled and dried under vacuum in a rotary evaporator at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Fresh acetone extracts for pigments analysis were obtained by suspending 1 mg of freeze dried biomass from 1 L cultures in 1 mL of acetone 95% and submitted to ultrasound 10 min in an ice bath.

### 2.4.4. DPPH assay

DPPH assay measures the capacity of an antioxidant to scavenge DPPH radical by electron donation. In presence of radical scavenger, purple DPPH radical is reduced to a pale yellow compound and the discoloration of the radical is measured at 515 nm (Prior et al. 2005). DPPH radical scavenging capacity of microalgae extracts was evaluated with the slightly modified method of Kenny et al. (2015). Trolox, ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, and astaxanthin were used as reference compounds. MeOH/DCM dried extracts were diluted in ethanol at a concentration ranging from 20 to 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and loaded (100  $\mu\text{L}$ ) in 96 well plates. The same volume of reference compounds (0.5–500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and ethanol (blank) were placed in the wells. Then, 100  $\mu\text{L}$  of DPPH (0.12 M in ethanol) was added. To prevent interference from carotenoids, a control was performed by adding 100  $\mu\text{L}$  of ethanol instead of DPPH. After an incubation of 30 min in darkness at room temperature, absorbance at 515 nm was measured.

Percentage of inhibition of DPPH (I%) was calculated for each sample with the following equation:

$$I\% = \left[ \frac{(A_{blank} - A_{sample})}{A_{blank}} \right] \times 100 \quad (1)$$

where  $A_{blank}$  is the absorbance at 515 nm of DPPH in ethanol and  $A_{sample}$  is the absorbance at 515 nm of the sample minus the absorbance of the control with ethanol instead of DPPH.

The results are expressed as  $IC_{50}$ , the concentration needed to scavenge 50% of radical. It was determined by linear regression by plotting concentration of each extract or reference compound with their corresponding I%.

### 2.4.5. ABTS assay

In ABTS assay, antioxidants scavenge the blue chromophore ABTS radical cation ( $ABTS^{\bullet+}$ ) by either electron donation or hydrogen electron transfer (Prior et al. 2005). It induces a discoloration that can be followed at 734 nm. ABTS assay was applied to microalgae MeOH/DCM dried extracts according to Re et al. (1999) with modifications to take colored algal material into account and to fit with 96 well plates. Reference compounds were similar to the one used in the DPPH assay.  $ABTS^+$  was generated by mixing 2.45 mM of potassium persulfate and 7 mM ABTS solution and placed 12 to 16 h in darkness at room temperature before use. Microalgae MeOH/DCM dried extracts and reference compounds were diluted in ethanol at a concentration ranging from 10 to 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 0.5 to 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Then 100  $\mu\text{L}$  of each sample were placed in 96 well plates.  $ABTS^+$  solution was diluted with ethanol to have an absorbance of  $0.70 \pm 0.02$ , and 100  $\mu\text{L}$  of the mixture was added to the wells. Controls containing ethanol instead of  $ABTS^+$  were performed to prevent pigment interferences. Immediately after 6 min of incubation at 30°C, the absorbance was measured at 734 nm. Percentage of inhibition was calculated with the same equation than for DPPH (Equation (1)) where  $A_{blank}$  is the absorbance at 734 nm of  $ABTS^+$  in ethanol, and  $A_{sample}$  the absorbance at 734 nm of the sample minus the absorbance of the control with ethanol instead of  $ABTS^+$ . For each microalgae extract and reference compounds,  $IC_{50}$  values were calculated as described before.

### 2.4.6. ORAC assay

ORAC assay measures the chain breaking capacity of an antioxidant against peroxy radicals by hydrogen atom transfer. Peroxy radicals, induced by the thermal decomposition of 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), react with a fluorescent probe

(fluorescein), causing a fluorescence loss over time that is measured (Prior et al. 2005). According to Watanabe et al. (2016), microalgae MeOH/DCM dried extracts were diluted (3.125 to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in mixture containing DMSO/diluent 10:90 (v/v) with diluent made up of 7% (w/v) of randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (RMCD) in 50% (v/v) acetone aqueous solution. Trolox (0.5 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), used as standard, was diluted in the same mixture DMSO/diluent. Each sample was loaded (35  $\mu\text{L}$ ) in 96 wells plate, and the same volume of DMSO/diluent was used as blank. Then 115  $\mu\text{L}$  of fluorescein (77.5 nM) was added to the wells. After 10 min of incubation at 37 °C with agitation at 20 rpm, 50  $\mu\text{L}$  of AAPH (82.4 mM) was added. Fluorescence decay was measured every 2 min for 300 min at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 528 nm.

Area under the curve (AUC) for each sample was calculated with the following formula from Huang et al. (2002):

$$\text{AUC} = 0.5 + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0} + \dots + \frac{f_{298}}{f_0} + 0.5 \left( \frac{f_{300}}{f_0} \right) \quad (2)$$

where  $f_0$  is the initial fluorescence and  $f_i$  is the fluorescence at time  $i$ . Net AUC was obtained by subtracting AUC of the blank to the sample. The calibration curve of trolox was constructed by plotting trolox concentration versus net AUC and used for the quantification of antioxidant activity of the microalgae extracts by linear regression. The results are expressed as ORAC value in  $\mu\text{g}$  trolox equivalent  $\text{mg}^{-1}$  of extract.

#### 2.4.7. TBARS assay

TBARS assay measures antioxidant capacity to inhibit lipid peroxidation. The degradation of lipids leads to the formation of malondialdehyde (MDA) that reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a red complex that can be followed at 534 nm (Ghani et al. 2017). The method of Ahmed et al. (2015) was applied on microalgae MeOH/ extract with some modifications to fit with algal material. Fe-ascorbate system was chosen for oxidation catalysis with linoleic acid as the source of unsaturated fatty acid. Linoleic acid (0.2 mL) was emulsified with Tween 20 (0.4 mL) and phosphate buffer (19.4 mL, 20 mM, pH 7.4). Microalgae MeOH/DCM dried extracts (0.5 mL, 15.625 to 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or reference compounds (0.5 mL, 0.03 to 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) diluted in ethanol were mixed with phosphate buffer (0.6 mL),  $\text{FeSO}_4$  (0.2 mL, 0.01%), ascorbic acid (0.2 mL, 0.01%), and linoleic emulsion (0.5 mL). Ascorbic acid, as part of the catalysis system, has not been tested as a reference compound. Blank samples were made by substituting microalgae extract with the same volume of ethanol. After 24 h of incubation at 37 °C, oxidation was stopped by mixing 0.4 mL of each sample with butylated hydroxytoluene (BHT) (0.04 mL,

0.4%). Then a mixture (0.44 mL) of TBA (0.8%) and trichloroacetic acid (TCA) (4%) was added. To prevent pigment interferences, controls containing phosphate buffer instead of TBA/TCA were performed. The samples were incubated at 100°C for 30 min, and then cooled and centrifuged. The absorbance of the supernatant was measured at 534 nm. The percentage of inhibition of linoleic acid peroxidation was calculated with (Equation (1)) as for DPPH and ABTS assay where  $A_{blank}$  is the absorbance at 534 nm of blank sample with ethanol, and  $A_{sample}$  is the absorbance at 534 nm of the sample minus the absorbance of the control with phosphate buffer instead of TBA/TCA. For each microalgae extract and reference compounds, IC<sub>50</sub> values was calculated from regression lines by plotting percentage of inhibition of linoleic acid peroxidation with their corresponding extracts concentrations.

#### 2.4.8. Pigments analysis

Pigments analysis was performed on fresh 95% aqueous acetone extracts to characterize lipophilic pigment composition and on MeOH/DCM dried extracts to study the relationship between carotenoids content and antioxidant activity.

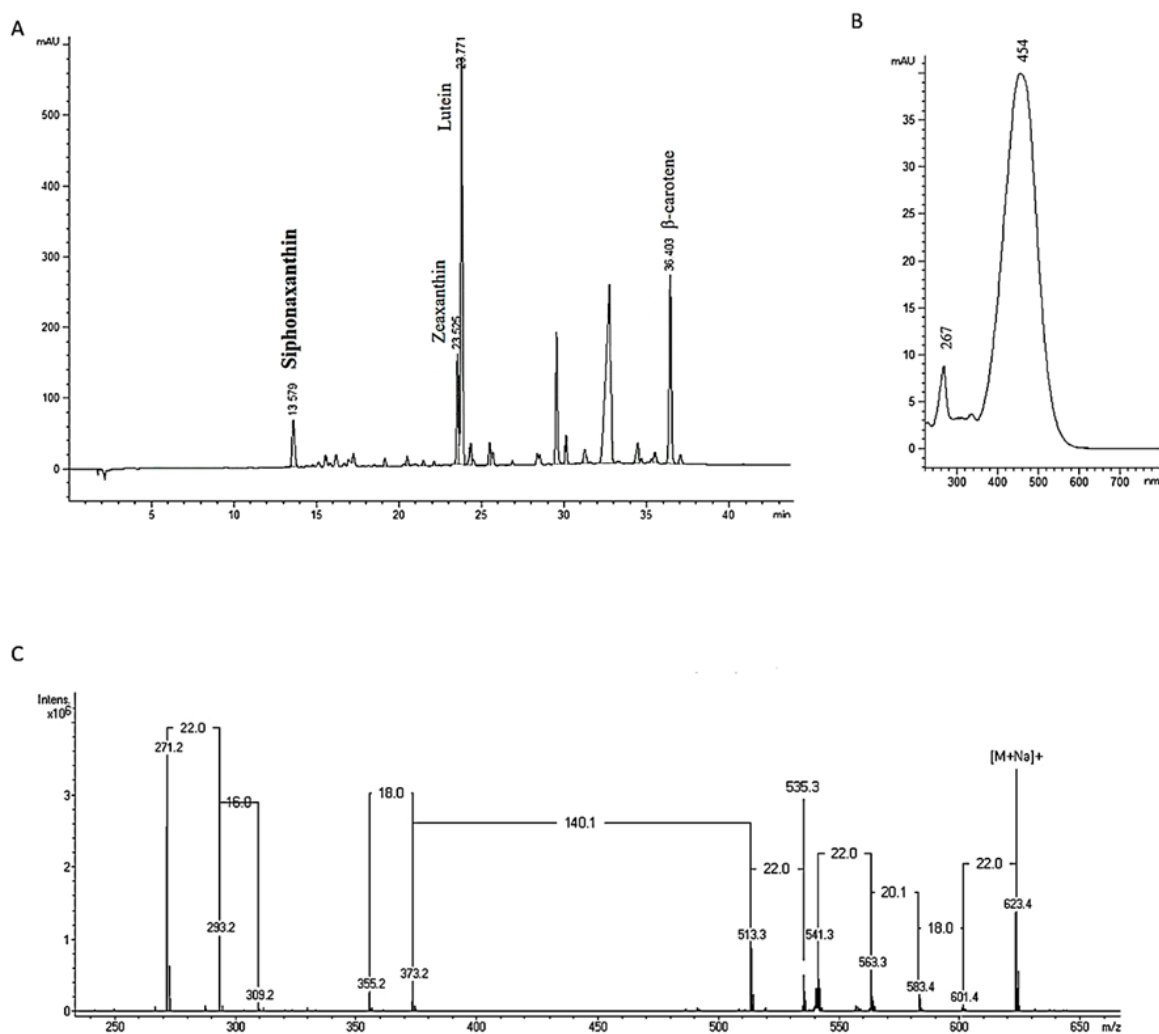
Just after extraction, fresh acetone extracts were filtered on a 0.2 µm PTFE filter before immediate HPLC analysis. MeOH/DCM dried extracts were solubilized in ethanol at 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> and filtered on a 0.2 µm PTFE filter before HPLC analysis. The samples were analyzed by HPLC-UV-DAD (Agilent Technologies, United States, series 1200 HPLC-UV-DAD) using an Eclipse XDB-C8 reverse phase column (150 by 4.6 mm, 3.5 µm particle size, Agilent Technologies) following the method by Van Heukelem and Thomas (2001). HPLC grade MeOH and water were purchased from Merck Chemicals (Germany) and tetrabutyl ammonium acetate from Sigma-Aldrich (Germany). Quantification was carried out using external calibration against pigments standard (lutein, neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin, β-carotene, diatoxanthin, diadinoxanthin, and fucoxanthin provided by DHI, Denmark). Quantification of siphonaxanthin was done according to fucoxanthin standard as recommended by Roy et al. (2013).

#### 2.4.9. Mass spectrometry analysis of siphonaxanthin

One unidentified pigment in *Nephroselmis* sp. was also analyzed by mass spectrometry (MS) analysis using an ion trap Bruker Esquire HCT Ultra MS instrument equipped with an electrospray ion source in positive mode (data were viewed by using Hystar Bruker software). HPLC quality solvents were purchased from Fischer Chemicals (Leicestershire, UK). Dried extract of *Nephroselmis* sp. HL was dissolved in methanol/acetone 50:50 (v/v) at 5 mg mL<sup>-1</sup>.

Optimized pseudo isocratic elution was applied on a RP C18ec Macherey Nagel Nucleodur C18ec (4.6 by 250 mm) column and using as solvent A, water plus formic acid 0.05%, and as solvent B (methanol plus formic acid 0.05%). The analytical conditions were as follows: Flow rate one mL min<sup>-1</sup>, injection volume of 50 µL, 10 min 5% of A to 0% of A, then 35 min 100% of B.

Siphonaxanthin characterization (Figure 27): UV/VIS (ethanol) λ<sub>max</sub> (retention time): 267, 454 nm (6.7 min), MS-ESI + *m/z*: 623.4 [M + Na]<sup>+</sup>; 601.4 [M + H]<sup>+</sup>; and 583.4 [M + H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.



**Figure 27.** Identification and characterization of siphonaxanthin: HPLC chromatogram at 450 nm of *Nephroselmis* sp. HL crude extract (A), UV-vis spectrum in HPLC system (B), and mass spectrum of siphonaxanthin (C).

#### 2.4.10. Statistical analysis

Data in tables and text are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Normality and equality of variance were tested and depending on the results, statistical analyses consisted of analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis test followed by a Tuckey Test or a Mann–Whitney test. Significant effects of light, species, and the interaction of the two factors on antioxidant activity were tested with a two-way ANOVA when possible. Pearson correlation test was used to study the relationship between antioxidant activity and carotenoids content. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . All tests were performed with Statgraphics Centurion XV.I (StatPoint Technologies, Inc., United States).

### 2.5. Results and discussion

#### 2.5.1. Antioxidant activity

To investigate antioxidant activity of microalgae extracts and to consider the complexity of antioxidant actions, we used four different antioxidant assays with different reaction mechanisms.

DPPH assay measures the ability of a product to quench DPPH radical by electron donation (Prior et al. 2005). DPPH quenching capacity of microalgae extract was measured and compared to pure reference compounds of different structural classes. The nature of the molecules tested strongly influences DPPH radical scavenging capacity (table 6). The best inhibition concentration 50 (IC<sub>50</sub>) values are observed for trolox (water-soluble  $\alpha$ -tocopherol analogue),  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbic acid (respectively 4.71, 6.20, and 8.73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The capacity of carotenoids (astaxanthin and  $\beta$ -carotene) to scavenge DPPH radical is weaker, on average 50 times lower than trolox (IC<sub>50</sub> of 228.59 and 257.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). These results are consistent with Müller et al. (2011) who found no DPPH radical scavenging activity among 19 carotenoids. Microalgae extracts also present low capacity to quench DPPH radical. The best IC<sub>50</sub> value obtained for *Nephroselmis* sp. high light (HL) (395.93  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) is 84 times higher than trolox. Furthermore, nine extracts were found to be inactive (IC<sub>50</sub> > 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *Tetraselmis* sp. HL, *Picochlorum* sp. low light (LL), *Schyzochlamydeella* sp. LL and HL, *Nitzschia* sp. A HL, *Nitzschia* sp. B LL and HL, *Thalassiosira weissflogi* HL, and *Entomoneis punctulata* LL). ABTS assay measures the capacity of a product to scavenge ABTS radical cation by either direct reduction via electron donation or by hydrogen atom transfer (Prior et al. 2005). Results of ABTS assay follow the same trends as results of DPPH assay with some exceptions (table 6). The best IC<sub>50</sub> values are also obtained with ascorbic acid, trolox, and  $\alpha$ -

tocopherol (respectively 6.08, 6.36, and 10.78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) but activities of  $\beta$ -carotene and astaxanthin measured with ABTS assay are better than with DPPH assay activities. Equally, microalgae extracts are on average 1.5 times more active toward ABTS radical cation than DPPH radical. However, activities of microalgae extracts measured with ABTS assay are still low compared to reference compounds, with  $\text{IC}_{50}$  32 (*Tetraselmis* sp. LL) to 161 (*Picochlorum* sp. LL) times higher than ascorbic acid when activities were sufficient to be measured.

ORAC assay measures the scavenging capacity of a product against peroxy radicals by hydrogen atom transfer. Trolox is used as reference and results are expressed in trolox equivalent (TE). Microalgae extracts are much more efficient to scavenge peroxy radicals than DPPH and ABTS radicals. The best antioxidant activities measured with ORAC assays (table 1) were obtained for *Chaetoceros* sp. HL (190.30  $\mu\text{g TE}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) and *Nephroslemis* sp. HL (188.32  $\mu\text{g TE mg}^{-1}$ ), with only a factor of five difference compared to trolox. The lowest activities are measured for *Thalassiosira weissflogi* HL (27.71  $\mu\text{g TE mg}^{-1}$ ) and *Schizochlamyde* sp. LL and HL (no activity measured) as for DPPH and ABTS assays.

TBARS assay measures the capacity of a product to inhibit the chain reaction of lipid peroxidation initiated by the ferrous-ascorbate system. Antioxidant can stop the chain reaction by scavenging free radicals but also by limiting the formation of the radicals by metal chelation (Gordon 1990). The best  $\text{IC}_{50}$  are obtained with reference compounds trolox (0.24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and  $\alpha$ -tocopherol (1.30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Conversely no inhibition of lipid peroxidation was observed with  $\beta$ -carotene and astaxanthin (table 6). Extracts of *Tetraselmis* sp. at both light intensity (15.43 and 22.77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for LL and HL, respectively), *Nitzschia* sp. A LL (24.63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and *Nephroselmis* sp. HL (31.40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) are the most active extracts against lipid peroxidation whereas *Entomoneis punctulata* HL (473.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and *Nitzschia* sp. B LL and HL (190.91 and 202.28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) are the less active.

**Table 6.** Antioxidant activities of reference compounds and microalgae extracts cultivated at two light intensities, 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (low light (LL)) and 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (high light (HL)). Different letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

		DPPH	ABTS	ORAC	TBARS
		(IC <sub>50</sub> in $\mu\text{g}$ of dry extract $\text{mL}^{-1}$ )	(IC <sub>50</sub> in $\mu\text{g}$ of dry extract $\text{mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{g}$ Trolox equivalent $\text{mg}^{-1}$ of dry extract)	(IC <sub>50</sub> in $\mu\text{g}$ of dry extract $\text{mL}^{-1}$ )
<i>Nephroselmis</i> sp.	LL	695.80 $\pm$ 57.28 <sup>hi</sup>	558.16 $\pm$ 70.02 <sup>j</sup>	138.82 $\pm$ 0.88 <sup>f</sup>	63.39 $\pm$ 5.04 <sup>h</sup>
	HL	395.93 $\pm$ 70.98 <sup>f</sup>	311.08 $\pm$ 26.80 <sup>f</sup>	188.32 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	31.40 $\pm$ 2.13 <sup>e</sup>
<i>Tetraselmis</i> sp.	LL	753.99 $\pm$ 81.35 <sup>jk</sup>	193.17 $\pm$ 11.18 <sup>e</sup>	110.48 $\pm$ 0.71 <sup>i</sup>	15.43 $\pm$ 2.47 <sup>c</sup>
	HL	>1000	341.38 $\pm$ 28.86 <sup>g</sup>	89.16 $\pm$ 1.51 <sup>o</sup>	22.77 $\pm$ 4.54 <sup>d</sup>
<i>Dunaliella</i> sp.	LL	823.98 $\pm$ 77.14 <sup>kl</sup>	430.69 $\pm$ 31.48 <sup>h</sup>	59.51 $\pm$ 1.47 <sup>s</sup>	58.20 $\pm$ 8.35 <sup>gh</sup>
	HL	892.18 $\pm$ 67.60 <sup>m</sup>	794.54 $\pm$ 64.60 <sup>m</sup>	141.53 $\pm$ 0.79 <sup>e</sup>	68.24 $\pm$ 5.65 <sup>i</sup>
<i>Picochlorum</i> sp.	LL	>1000	981.96 $\pm$ 40.66 <sup>o</sup>	55.17 $\pm$ 0.68 <sup>t</sup>	42.10 $\pm$ 5.87 <sup>f</sup>
	HL	671.50 $\pm$ 61.75 <sup>h</sup>	463.90 $\pm$ 17.30 <sup>i</sup>	98.64 $\pm$ 0.80 <sup>l</sup>	87.76 $\pm$ 8.36 <sup>k</sup>
<i>Schizochlamyde</i> sp.	LL	>1000	>1000	n.d.	55.41 $\pm$ 3.72 <sup>g</sup>
	HL	>1000	>1000	n.d.	43.51 $\pm$ 8.88 <sup>f</sup>
<i>Nitzschia</i> sp. A	LL	497.27 $\pm$ 79.37 <sup>g</sup>	462.96 $\pm$ 17.88 <sup>i</sup>	179.75 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	24.63 $\pm$ 6.07 <sup>d</sup>
	HL	>1000	>1000	119.76 $\pm$ 1.49 <sup>h</sup>	98.77 $\pm$ 7.73 <sup>l</sup>
<i>Nitzschia</i> sp. B	LL	>1000	>1000	78.95 $\pm$ 1.54 <sup>p</sup>	190.91 $\pm$ 24.36 <sup>p</sup>
	HL	>1000	>1000	92.02 $\pm$ 1.52 <sup>n</sup>	202.28 $\pm$ 27.86 <sup>p</sup>
<i>Thalassiosira weissflogi</i>	LL	939.31 $\pm$ 104.41 <sup>n</sup>	620.26 $\pm$ 54.67 <sup>k</sup>	69.99 $\pm$ 1.49 <sup>q</sup>	114.58 $\pm$ 6.69 <sup>m</sup>
	HL	>1000	>1000	27.71 $\pm$ 0.95 <sup>u</sup>	164.44 $\pm$ 5.35 <sup>o</sup>
<i>Entomoneis punctulata</i>	LL	>1000	>1000	68.09 $\pm$ 1.58 <sup>r</sup>	147.34 $\pm$ 17.47 <sup>n</sup>
	HL	839.30 $\pm$ 84.45 <sup>lm</sup>	>1000	94.20 $\pm$ 1.45 <sup>m</sup>	473.56 $\pm$ 66.26 <sup>q</sup>
<i>Cylindrotheca closterium</i>	LL	890.75 $\pm$ 72.49 <sup>mn</sup>	615.65 $\pm$ 27.05 <sup>k</sup>	105.48 $\pm$ 1.58 <sup>j</sup>	79.67 $\pm$ 11.87 <sup>j</sup>
	HL	710.60 $\pm$ 61.83 <sup>hij</sup>	654.79 $\pm$ 21.27 <sup>l</sup>	127.14 $\pm$ 1.29 <sup>g</sup>	103.48 $\pm$ 15.18 <sup>l</sup>
<i>Chaetoceros</i> sp.	LL	484.47 $\pm$ 87.98 <sup>g</sup>	441.03 $\pm$ 17.20 <sup>h</sup>	170.00 $\pm$ 0.57 <sup>d</sup>	77.97 $\pm$ 6.16 <sup>j</sup>
	HL	773.52 $\pm$ 68.35 <sup>k</sup>	791.40 $\pm$ 49.81 <sup>m</sup>	190.3 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	116.08 $\pm$ 17.32 <sup>m</sup>
<i>Bacillaria</i> sp.	LL	749.55 $\pm$ 87.70 <sup>ij</sup>	895.81 $\pm$ 44.93 <sup>n</sup>	102.19 $\pm$ 1.45 <sup>k</sup>	60.14 $\pm$ 8.54 <sup>gh</sup>
Trolox		4.71 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	6.36 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	-	0.24 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
$\alpha$ -Tocopherol		6.20 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	10.78 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	-	1.30 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
Ascorbic acid		8.73 $\pm$ 1.63 <sup>c</sup>	6.08 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	-	-
$\beta$ -Carotene		257.33 $\pm$ 20.89 <sup>e</sup>	37.04 $\pm$ 2.56 <sup>c</sup>	-	>200
Astaxanthin		228.59 $\pm$ 41.71 <sup>d</sup>	98.54 $\pm$ 6.58 <sup>d</sup>	-	>200

n.d.: Not detected



As expected, inter- and intra-microalgae classes variations were observed for antioxidant activities. Microalgae of the same genus could even have very different antioxidant activity. For example, *Nitzschia* sp. A, especially in LL, can prevent lipid peroxidation and scavenge peroxy radical, whereas *Nitzschia* sp. B is inactive. It was already noticed by other authors (Li et al. 2007; Goiris et al. 2012; Assunção et al. 2016) who found strong variations of radical scavenging capacity of different species of *Chlorella*, *Porphyridium*, or *Nannochloropsis* and even with different strains of a given species.

According to the assay used, the results showed large variations of antioxidant activity from microalgae extracts. For example, *Tetraselmis* sp. extracts are the most active to prevent lipid peroxidation in TBARS assay whereas they have low antioxidant action toward DPPH radical and peroxy radical in ORAC assay. Similarly, *Chaetoceros* sp. HL is the most efficient extract against peroxy radical whereas it has almost no effect on scavenging DPPH and ABTS radicals and to inhibit lipid peroxidation. Those different antioxidant activities of microalgae extracts in specific tests confirm the need to use several assays with different mechanisms of action to evaluate antioxidant capacities of natural extracts as supported by other authors (Frankel and Meyer 2000; Prior et al. 2005; Rodriguez-Amaya 2010; Carocho and Ferreira 2013).

The results obtained with the four assays reveal that none of the microalgae studied has an interesting activity against DPPH and ABTS radicals compared to reference compounds. The best results to scavenge peroxy radical was achieved by *Chaetoceros* sp., *Nephroselmis* sp., and *Nitzschia* sp. A. The last two species also have the capacity to prevent lipid peroxidation as much as *Tetraselmis* sp. In published data about evaluation of microalgae as natural antioxidant, assays used differ in method (i.e., extraction procedure, solvent, substrate, time of reaction, and concentration), data units, and analysis. Furthermore, in most assays, no comparison to reference compounds is made that hampers comparison between studies and highlight the need to standardized procedures used in antioxidant studies.

### 2.5.2. Carotenoids

To investigate the link between carotenoid content and antioxidant activity of microalgae, the carotenoid content of microalgae MeOH/DCM extracts was determined by HPLC and UV/Visible detection. The carotenoid analysis of microalgae extracts reveals large variations of carotenoid concentration and composition (Table 7). *Nephroselmis* sp. HL has the higher concentration of total carotenoid ( $66.89 \mu\text{g mg}^{-1}$ ), 1.7 times more than *Nitzschia* sp. A HL ( $38.20 \mu\text{g mg}^{-1}$ ), which has the second highest content, followed by *Nitzschia* sp. LL ( $28.80 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). *Thalassiosira weissflogi* HL ( $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) and *Schizochlamydeella* sp. HL ( $0.18$

$\mu\text{g mg}^{-1}$ ) and LL ( $2.29 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) showed the lowest content of total carotenoids. With the exception of  $\beta$ -carotene that is common to all species, we can distinguish two groups from carotenoids composition corresponding, classically, to the phyla of Chlorophyta and Bacillariophyta (Annexe 2) (Serive et al. 2017). In species belonging to Chlorophyta (*Nephroselmis* sp., *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Picochlorum* sp., and *Schizochlamydeella* sp.) lutein and zeaxanthin in addition to  $\beta$ -carotene are the major carotenoids. With the exception of *Nephroselmis* sp., lutein represents more than 50% of total carotenoids, followed by 9% to 31% of  $\beta$ -carotene and 8% to 23% of zeaxanthin. *Nephroselmis* sp., compared to other Chlorophyte species, is characterized by a higher level of zeaxanthin which represents more than 50% of total carotenoids for both light conditions. This species also has the highest level of  $\beta$ -carotene for both light intensities, the highest content in lutein in HL condition, and an interesting pigment with UV-vis spectrum and mass spectrometry similar to siphonaxanthin (Figure 27) (Yoshii et al. 2005). This xanthophyll is mainly found in Ulvophyceae, Chlorophyceae, and Prasinophyceae and has already been described in *Nephroselmis* genus (Yoshii et al. 2005). It exhibits antioxidant activity (Dambeck and Sandmann 2014) but also anti-angiogenic effect (Ganesan et al. 2010), apoptosis-inducing effects (Ganesan et al. 2011), and can inhibit adipogenesis (Li et al. 2015). In species belonging to Bacillariophyta (*Nitzschia* sp. A and B, *Thalassiosira weissflogi*, *Entomoneis punctulata*, *Cylindrotheca closterium*, *Chaetoceros* sp., and *Bacillaria* sp.), fucoxanthin is the major carotenoid, representing more than 70% of total carotenoids in all species. The highest concentration of this carotenoid is measured in *Nitzschia* sp. A in both light conditions ( $32.30 \mu\text{g mg}^{-1}$  HL and  $22.40 \mu\text{g mg}^{-1}$  LL). Bacillariophytes are also characterized by the presence of cis-fucoxanthin (4% to 16% of total carotenoids), diatoxanthin (1% to 15% of total carotenoids), and smaller amounts of  $\beta$ -carotene than Chlorophytes (2% to 9% of total carotenoids).

Light intensity strongly influences carotenoid content and composition, and its effects seems species specific. Indeed, *Nephroselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Picochlorum* sp., *Nitzschia* sp. A, and *Entomoneis punctulata*, has higher total carotenoid and individual carotenoids content with HL intensity, whereas the opposite is observed for *Tetraselmis* sp., *Schizochlamydeella* sp., *Nitzschia* sp. B, *Thalassiosira weissflogi*, *Cylindrotheca closterium*, and *Chaetoceros* sp. (Table 7). Carotenoids are usually separated in two categories: Primary carotenoids located in the photosynthetic apparatus, that act as accessory light harvesting pigment or with protective function, and secondary carotenoids separated from photosynthetic apparatus that have mainly photoprotective functions. When microalgae are exposed to light-excess conditions, photosynthetic pigments (chlorophyll and primary carotenoids) generally decrease whereas

secondary carotenoids increase in some chlorophytes species (Richmond 2008; Mulders et al. 2014). It could explain the different effect of light intensity on carotenoid content observed in this study. For species belonging to Bacillariophyta, carotenoid content is mainly constituted of fucoxanthin, a photosynthetic pigment. As expected there is higher fucoxanthin in LL condition in most species which is in agreement with the literature (Gómez-Loredo et al. 2016; Petrushkina et al. 2017; McClure et al. 2018). In Chlorophyte species, lutein is the major carotenoid. It is a primary carotenoid with both accessory light harvesting and photoprotective functions (Mulders et al. 2014). As a primary pigment, we expected that lutein content decrease with increasing light intensity as in *Tetraselmis* sp and *Schizochlamydes* sp. However, there is higher lutein content in HL condition for *Nephroselmis* sp., *Dunaliella* sp., and *Picochlorum* sp. Contrasted results are also observed in the literature according to species: Lutein accumulation was observed with increasing light intensity in *Parachlorella* sp. (Heo et al. 2018) whereas a decreased was measured in *Desmodesmus* sp., *Muriellopsis* sp., and *Chlorella zofingiensis* (Del Campo et al. 2000, 2004; Xie et al. 2013).

Another extracting method was performed using 95% aqueous acetone. In these extracts, the distribution pattern of the carotenoids is different compared to MeOH/DCM extracts. Acetone fresh extracts are characterized by the presence, besides carotenoids detected in MeOH/DCM extracts, of diadinoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, and a significant increase in t-neoxanthin concentration while minor changes are observed for other carotenoids (Table 8). All absent compounds in MeOH/DCM extracts belong to the subclass of xanthophyll 5,6-epoxides (Figure 28) which are known to be sensible to degradations by heat through epoxide isomerization (Bonnie and Choo 1999). The internal constraint of 5,6-epoxy ring causes a subsequent rearrangement to a 5,8-dihydrofuran ring that give compounds which are then degraded by the oxidation process. This mechanism of action is further highlighted in our experiments by partial or non-degradation of fucoxanthin in MeOH/DCM extracts which is the only xanthophyll 5,6-epoxide to have its position eight occupied by a ketone group that blocks rearrangement to a 5,8-dihydrofuran ring. In this case, the epoxide isomerization results in a partial isomerization of fucoxanthin into cis-fucoxanthin which is not observed when carotenoids analyses are performed on fresh acetone extracts (Nakazawa et al. 2009; Honda et al. 2019).

**Table 7.** Quantification of carotenoids ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  of extract) in MeOH/DCM dried extracts of microalgae cultivated at two light intensities,  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LL) and  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (HL). Lut, lutein; t-Neo, t-neoxanthin; Siph, siphonaxanthin; Zea, zeaxanthin;  $\beta$ -Car,  $\beta$ -carotene; Fuco, fucoxanthin; cis-Fuco, cis-fucoxanthin; and Dt, diatoxanthine

		Lut	t-Neo	Siph	Zea	$\beta$ -Car	Fuco	Cis-Fuco	Dt	Total Carotenoids		
Chlorophyta	<i>Nephroselmis</i> sp.	LL	4.7	n.d.	4.11	13.6	5.4	n.d.	n.d.	n.d.	27.81	
		HL	13.5	n.d.	6.89	39.3	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	66.89	
	<i>Tetraselmis</i> sp.	LL	9.51	1.43	n.d.	1.91	4.42	n.d.	n.d.	n.d.	17.27	
		HL	7.04	1.38	n.d.	1.76	3.01	n.d.	n.d.	n.d.	13.19	
	<i>Dunaliella</i> sp.	LL	3.36	0.29	n.d.	0.53	1.9	n.d.	n.d.	n.d.	6.08	
		HL	4.83	0.15	n.d.	1.55	2	n.d.	n.d.	n.d.	8.53	
	<i>Picochlorum</i> sp.	LL	7.07	n.d.	n.d.	2.32	0.89	n.d.	n.d.	n.d.	10.28	
		HL	7.27	0.92	n.d.	2.37	2.79	n.d.	n.d.	n.d.	13.35	
	<i>Schizochlamydeella</i> sp.	LL	1.58	n.d.	n.d.	0.18	0.53	n.d.	n.d.	n.d.	2.29	
		HL	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.18	
	Bacillariophyta	<i>Nitzschia</i> sp. A	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.4	22.4	4.5	0.5	28.8
			HL	n.d.	n.d.	n.d.	1.3	0.9	32.3	2.5	1.2	38.2
<i>Nitzschia</i> sp. B		LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.2	10.3	1.1	0.1	11.7	
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.2	7.4	0.3	0.2	8.1	
<i>Thalassiosira weissflogi</i>		LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.3	10.76	1	1.4	14.46	
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	n.d.	0.1	
<i>Entomoneis punctulata</i>		LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	0.6	n.d.	7.6	
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.5	15.3	2.9	0.6	20.3	
<i>Cylindrotheca closterium</i>		LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	12.6	1.3	0.7	15.1	
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.4	12.1	0.9	1.3	14.7	
<i>Chaetoceros</i> sp.		LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.3	19.3	2.2	4	26.8	
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12.4	1.2	2.4	16	
<i>Bacillaria</i> sp.	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.5	16.3	3.4	0.7	21.9		

n.d.: Not detected

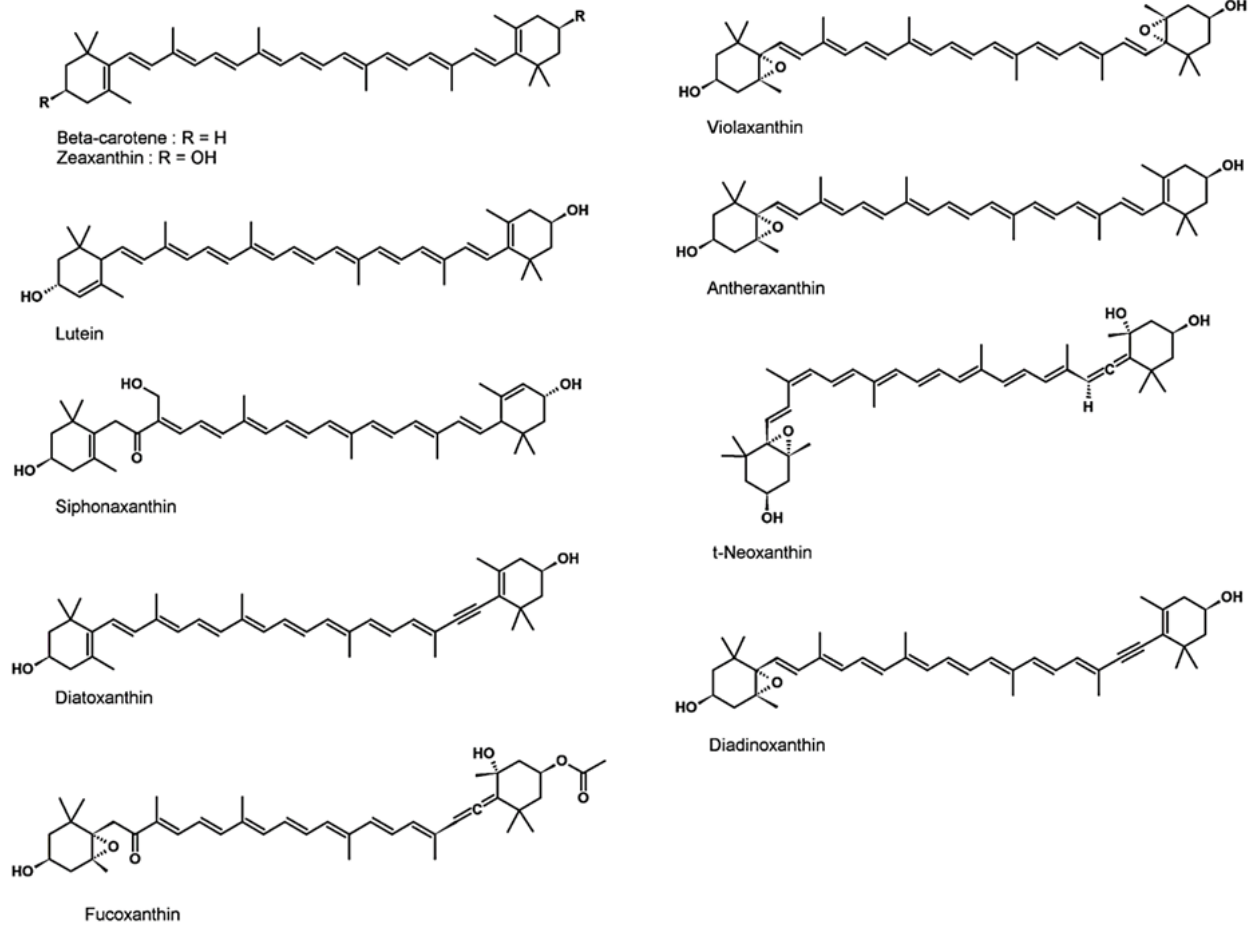


Figure 28. Carotenoids structure

**Table 8.** Quantification of carotenoids ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  of biomass) in fresh acetone extracts of microalgae cultivated at two light intensities,  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LL) and  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (HL). Lut, lutein; t-Neo, t-neoxanthin; Siph, siphonaxanthin; Zea, zeaxanthin;  $\beta$ -Car,  $\beta$ -carotene; Viola, violaxanthin; Anthe, antheraxanthin; Fuco, fucoxanthin; cis-Fuco, cis-fucoxanthin; Dt, diatoxanthin; and Dd, diadinoxanthin.

		Lut	t-Neo	Siph	Zea	$\beta$ -Car	Viola	Anthe	Fuco	Cis-Fuco	Dt	Dd	Total Carotenoids	
Chlorophyta	<i>Nephroselmis</i> sp.	LL	0.48	0.21	0.14	0.68	0.65	0.33	0.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.6
		HL	0.31	0.11	0.05	0.73	0.36	0.14	0.09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.79
	<i>Tetraselmis</i> sp.	LL	1.02	0.39	n.d.	0.59	0.92	0.47	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.47
		HL	1.63	0.4	n.d.	2.84	1.97	0.23	0.12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.19
	<i>Dunaliella</i> sp.	LL	2.57	0.44	n.d.	9.21	1.12	0.27	0.35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13.96
		HL	3.74	0.57	n.d.	11.67	1.87	0.35	0.59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18.79
	<i>Picochlorum</i> sp.	LL	1.26	0.23	n.d.	4.51	0.13	0.02	0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.2
		HL	0.54	0.08	n.d.	2.03	0.05	0.01	0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.75
	<i>Schizochlamydes</i> sp.	LL	0.08	0.01	n.d.	0.31	0.02	0.01	0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.44
		HL	0.12	0.02	n.d.	0.91	0.02	0.01	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.1
Bacillariophyta	<i>Nitzschia</i> sp. A	LL	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	0.07	n.d.	n.d.	2.35	n.d.	0.02	0.26	2.77
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	0.06	n.d.	n.d.	1.44	n.d.	0.02	0.26	1.84
	<i>Nitzschia</i> sp. B	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.32	n.d.	n.d.	6.25	n.d.	0.43	0.68	7.68
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.27	n.d.	n.d.	5.16	n.d.	0.37	0.56	6.36
	<i>Thalassiosira weissflogi</i>	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.36	n.d.	n.d.	3.76	n.d.	0.6	0.91	5.63
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.33	n.d.	n.d.	3.49	n.d.	0.55	0.85	5.22
	<i>Entomoneis punctulata</i>	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.39	n.d.	n.d.	5.23	n.d.	0.15	0.9	6.67
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.33	n.d.	n.d.	4.34	n.d.	0.13	0.77	5.57
	<i>Cylindrotheca closterium</i>	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.17	n.d.	n.d.	2.82	n.d.	0.08	0.83	3.9
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12	n.d.	n.d.	1.61	n.d.	0.1	0.65	2.48
	<i>Chaetoceros</i> sp.	LL	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	0.02	n.d.	n.d.	1.35	n.d.	0.21	0.07	1.72
		HL	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	0.11	n.d.	n.d.	0.78	n.d.	0.49	0.26	1.72
	<i>Bacillaria</i> sp.	LL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.3	n.d.	n.d.	5.36	n.d.	0.21	0.72	6.59

n.d.: Not detected

### 2.5.3. Correlation between antioxidant activity and carotenoid content

With the aim to highlight a link between antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae extract, a correlation analysis was performed (Table 9). However, since no interesting antioxidant activities were measured with DPPH and ABTS, the results of these assays were not considered.

The correlation analysis reveals a strong positive correlation (correlation coefficient of 0.71) between antioxidant activity measured with ORAC assay and total carotenoid content. However, the  $R^2$  value (0.51) suggests that besides carotenoids, other compounds contributed to the antioxidant activity measured in the microalgae extracts. A closer look to carotenoid composition indicates that xanthophylls contribute greatly (correlation coefficient of 0.71) to the correlation with antioxidant activity measured with ORAC assay, specifically lutein for species belonging to Chlorophytes (correlation coefficient of 0.78,  $R^2$  of 0.60). On the other hand,  $\beta$ -carotene content is not correlated with the antioxidant activity measured with ORAC assay.

Considering TBARS assay, correlation analysis shows that carotenoids do not contribute to the antioxidant activity measured (correlation coefficients non-significant). Others types of molecules are involved to prevent lipid peroxidation. This inhibition might be explained by phenolic (Salah et al. 1995; Cho et al. 2003) and fatty acid compounds present in the extracts. However, phenolic compounds are probably not the molecules involved in our study as no activities is found using DPPH and ABTS assays, whereas these assays are known to highlight antioxidant activity of polyphenols (Liu et al. 2008; Floegel et al. 2011). Since the solvent mixture, MeOH/DCM, is commonly used for lipid extraction (Cequier-Sánchez et al. 2008), a significant amount of lipids could be present in our extracts and could explain the results on antioxidant activities. Indeed, Custódio et al. (2012) showed that *Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella minutissima*, and *Rhodomonas salina* have radical scavenging and metal chelating activity, and hypothesized that it is related to the high abundance of polyunsaturated fatty acid (PUFA) in their algal extracts. Yoshida et al. (1991) also demonstrated that phosphatidylcholine, a phospholipid, can inhibit lipid peroxidation induced by Fe-ascorbate system by chelating iron.

**Table 9.** Pearson correlation test between major carotenoid content and antioxidant activities measured with oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and thiobabituric acid reactive substances (TBARS) assays.

	ORAC Assay		TBARS Assay	
	Correlation Coefficient	R <sup>2</sup>	Correlation Coefficient	R <sup>2</sup>
total carotenoids	0.71 **	0.51	-0.12 <sup>ns</sup>	-
total xanthophylls	0.71 **	0.51	-0.10 <sup>ns</sup>	-
lutein	0.78 **	0.6	-0.34 <sup>ns</sup>	-
zeaxanthin	0.70 *	0.48	-0.18 <sup>ns</sup>	-
fucoxanthin	0.60 *	0.35	-0.24 <sup>ns</sup>	-
β-Carotene	0.36 <sup>ns</sup>	-	-0.30 <sup>ns</sup>	-

ns: Non significant, \*:  $p < 0.05$ , and \*\*:  $p < 0.01$

#### 2.5.4. Effect of light intensity on antioxidant activity

Microalgae were cultivated at two light intensities (250 at LL to 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at HL) to evaluate the impact of this key factor on antioxidant activity. The light intensity applied to microalgae culture has an influence on anti-radical activity measured with DPPH and ABTS assays (table 6). However, these activities remain well below activities measured with trolox,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbic acid regardless light intensity. Light intensity has a strong effect on antioxidant activity measured with ORAC assay ( $p < 0.001$ ), e.g., *Dunaliella* sp. antioxidant activity was doubled by increasing light intensity. However, according to species, light intensity can have contrasting effects on antioxidant activity measured with ORAC assay. For *Nephroselmis* sp., *Dunaliella* sp., *Picochlorum* sp., *Nitzschia* sp. B, *Entomoneis punctulata*, *Cylindrotheca closterium*, and *Chaetoceros* sp., increasing light intensity from 250 to 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  led to an increase of the antioxidant activity contrary to *Tetraselmis* sp., *Nitzschia* sp. A, and *Thalassiosira weissflogi*.

Light intensity influences positively or negatively the capacity of microalgae extracts (except *Nitzschia* sp. B) to inhibit lipid peroxidation with TBARS assay. Antioxidant activity measured with TBARS assay is maximized with LL intensity for most microalgae species in contrast to results observed with ORAC assay. Indeed, apart from *Nephroselmis* sp. and *Schizochlamydeella* sp., increasing light intensity causes a decrease of the antioxidant capacity of all species up to four folds (e.g., *Nitzschia* sp. A). We hypothesized that antioxidant activity measured with TBARS assay could be related to PUFA content. In that case, higher PUFA levels would be measured in LL culture condition. It is consistent with numerous studies that suggest that PUFA



content is inversely related to growth light intensity in most microalgae species (Molina Grima et al. 1994; Guihéneuf et al. 2009; Amini Khoeyi et al. 2012; Boelen et al. 2013; He et al. 2015; Mitra et al. 2015).

The contrasted effects of light intensity on results highlight that the assays used are more or less specific to given antioxidant molecules present in the extracts. Overall, high light intensity promotes the production of compounds able to scavenge peroxy radical, whereas low light intensity promotes compounds that inhibit lipid peroxidation. It implies that light intensity will drive the antioxidant production towards one type of molecules instead of the other. However, *Nephroselmis* sp. and *Nitzschia* sp. A both have the capacity to limit lipid peroxidation and to scavenge peroxy radicals in HL conditions and LL conditions, respectively. Those contrasted results highlight the need for further photophysiological investigations to link antioxidant capacity to light history and biochemical composition of microalgae species.

Few studies explored the impact of light intensity on the global antioxidant activity of microalgae. Published results focus on the effects of culture conditions on specific antioxidant compounds, especially carotenoids. Nevertheless, some studies revealed significant effect of light intensity on antioxidant molecules and highlight that this result is often species-specific. For example, Zhang et al. (2017) showed that increasing light intensity from 40 to 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  led to a decrease of  $\beta$ -carotene and superoxide dismutase in *Chaetoceros calcitrans* whereas it led to an increase of both molecules in *Thalassiosira weissflogi* and high light combined with other abiotic stresses stimulates the synthesis of astaxanthin and  $\beta$ -carotene in *Haematococcus pluvialis* (Boussiba and Vonshak 1991; Kobayashi et al. 1992; Wang et al. 2003) and *Dunaliella salina* (Ben-Amotz and Avron 1983; Hejazi and Wijffels 2003; Lamers et al. 2010), respectively.

## 2.6. Conclusions

The results of the four antioxidant assays highlight the need to use several assays with different modes of action to investigate the most comprehensive antioxidant activity of natural extracts. Indeed, none of the twelve microalgae tested have the capacity to scavenge DPPH and ABTS radicals but they can scavenge peroxy radical (*Chaetoceros* sp., *Nephroselmis* sp., and *Nitzschia* A sp.) and inhibit lipid peroxidation (*Tetraselmis* sp., *Nitzschia* A sp., and *Nephroselmis* sp.). These antioxidant properties are linked to the biochemical composition of the microalgae: Peroxy radical scavenging capacity measured with ORAC assay is correlated to xanthophylls whereas lipid peroxidation inhibition measured with TBARS assay is related to other compounds that may be PUFA.

The carotenoid detected on fresh acetone extracts and MeOH/DCM extracts showed different profiles according to extraction methods and owing to the thermal degradation of the xanthophyll 5,6-epoxides (violaxanthin, diadinoxanthin, and antheraxanthin). Otherwise, carotenoid composition of microalgae extracts is typical of the studied species, but highlights the possibility to produce pigment of interests, such as siphonaxanthin, with microalgae. The siphonaxanthin has several bioactive properties, including antioxidant activity; nonetheless, the effects of culture conditions on its production by microalgae have not yet been investigated. The present results showed that light intensity is a key factor to influence global antioxidant activity of microalgae. Indeed, for most species tested, HL intensity increases peroxy radical scavenging capacity whereas LL intensity increases lipid peroxidation inhibition. Other parameters (temperature, pH, salinity, nutrient, etc.) are known to impact biochemical content of microalgae. Thus, it would be interesting to study the effects of these parameters to optimize antioxidant production, especially siphonaxanthin production by *Nephroselmis* sp.

### **2.7. Acknowledgments**

The authors are thankful to Liet Chim for his help in the experiments design, and manuscript improvement.

---

## **Chapitre 4 - Effets des conditions de cultures sur l'activité antioxydante**

---



## 1. Contexte

Nous avons vu que l'activité antioxydante pouvait être influencée par les paramètres de cultures appliqués aux microalgues (voir paragraphe 3.5 Chapitre 1 - Etat de l'art). En effet, l'exposition à certaines conditions environnementales telles que des fortes intensités lumineuses, des pH, températures et salinités extrêmes, des carences en nutriments ou des concentrations importantes en métaux provoquent une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans la cellule (Pinto et al. 2003; Suzuki and Mittler 2006; Liu et al. 2007; Janknegt et al. 2009; Tammam et al. 2011; Roach and Krieger-Liszkay 2014; Çakmak et al. 2015). Pour s'acclimater à ces stress abiotiques et protéger la cellule, il existe des mécanismes de régulation des ERO notamment par l'intervention du système antioxydant (Foyer and Noctor 2005a). Cela entraîne des modifications de l'activité antioxydante des microalgues qui sont spécifiques à chaque espèce, et qui dépendent du type de stress, de son intensité et de sa durée. Pour optimiser l'activité antioxydante il est donc important d'étudier les effets des paramètres de culture sur celle-ci.

Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés à l'impact des paramètres de culture sur l'activité antioxydante. Nous avons fait le choix d'étudier des paramètres relativement simples à contrôler dans des conditions de production en bassins extérieurs ouverts (raceways) afin d'anticiper une montée en échelle.

Les études ont porté sur deux des espèces jugées les plus intéressantes à l'issue du criblage de l'activité antioxydante :

- *Nephroselmis* sp. présente une activité de neutralisation des radicaux peroxydes importante (test ORAC) liée à sa concentration élevée en caroténoïdes, dont la siphonaxanthine un kétocaroténoïde d'intérêt et peu commun.

- *Tetraselmis* sp. a une forte capacité d'inhibition de la peroxydation des lipides (test TBARS). Par ailleurs, plusieurs essais de culture en raceways ont montré qu'elle était particulièrement facile à maintenir en culture extérieure.

Ainsi la première partie de ce chapitre est consacrée aux effets de la disponibilité en azote sur l'activité antioxydante et le contenu en caroténoïdes, de *Nephroselmis* sp.. Pour cette étude, *Nephroselmis* sp. a été cultivée en photobioréacteurs en utilisant deux modes de culture : la culture en batch et la culture en continu. Ces modes de culture permettent différents apports d'azote inorganique dissous : sans limitation (début de batch), avec limitation (culture continue) ou avec carence (fin de batch) au cours desquels des mesures de l'activité antioxydante avec le test ORAC et de la teneur en caroténoïdes ont été réalisées.

La deuxième partie de ce chapitre porte sur l'effet de l'acidification du milieu par injection de CO<sub>2</sub> sur l'activité antioxydante, la croissance et la photophysiology de *Tetraselmis* sp. cultivée selon deux modes de culture, batch ou continu. Deux valeurs de pH ont été testées, 6,5 et 8,5, sur des cultures menées en photobioréacteurs. Pour chaque valeur de pH et mode de culture, plusieurs mesures ont été réalisées : la croissance cellulaire, la composition élémentaire, l'activité antioxydante avec le test TBARS, et les paramètres photosynthétiques avec la fluorimétrie PAM (Pulse Amplitude Modulated).

## 2. Effects of nitrogen availability on antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp.

**Article publié :** Coulombier N, Nicolau E, Le Déan L, Barthelemy V, Schreiber N, Brun P, Lebouvier N, Jauffrais T. 2020. Effects of nitrogen availability on antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp. *Marine Drugs*. 18(9):453

### 2.1. Résumé

*Nephroselmis* sp. a été identifiée dans une précédente étude comme une espèce d'intérêt pour ses propriétés antioxydantes en raison de sa forte teneur en caroténoïdes. La disponibilité en azote inorganique dissous peut influencer la production de biomasse et de métabolites spécifiques par les microalgues. Afin d'optimiser la production d'antioxydants, *Nephroselmis* sp. a été cultivée en batch et en continu dans des photobioréacteurs avec différents apports d'azote inorganique dissous (pas de limitation en N, limitation en N, carence en N). L'objectif était de déterminer l'influence de la disponibilité en azote sur l'activité de neutralisation des radicaux peroxydes (test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)) et la teneur en caroténoïdes de *Nephroselmis* sp. L'analyse pigmentaire a révélé un appareil photosynthétique spécifique et inhabituel : les complexes antennaires contiennent de la siphonaxanthine, caractéristique des algues vertes primitives, mais également une forte concentration en lutéine et en pigments du cycle des xanthophylles (violaxanthine, anthéroxanthine et zéaxanthine) comme chez la plupart des chlorophytes plus évoluées. Les résultats indiquent que pour *Nephroselmis* sp., la biosynthèse des caroténoïdes est plus importante lorsqu'il n'y a pas de limitation en N, et est associée à une capacité antioxydante plus élevée. En effet, l'activité de neutralisation des radicaux peroxydes et la concentration en caroténoïdes totaux sont plus élevées lorsqu'il n'y a pas de limitation en N, et diminuent fortement lorsqu'il y a une limitation ou une carence en N. Si l'on s'intéresse aux différents caroténoïdes, la siphonaxanthine, la néoxanthine, les pigments du cycle des xanthophylles et le lycopène suivent les mêmes variations que les caroténoïdes totaux, tandis que le  $\beta$ -carotène et la lutéine restent stables quelle que soit la disponibilité en azote. La productivité en caroténoïdes est également plus élevée lorsqu'il n'y a pas de limitation en N. L'activité de neutralisation des radicaux peroxydes mesurée par le test ORAC (63,6 à 154,9  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW) et la teneur en lutéine (5,22 à 7,97  $\text{mg g}^{-1}$  DW) se situent dans la gamme supérieure des valeurs rapportées précédemment pour les microalgues. De plus, la concentration en siphonaxanthine est 6 à 20 % supérieure à celle des sources précédemment identifiées (algues vertes à structure siphonnée). Ces résultats mettent en

évidence le potentiel de *Nephroselmis* sp. comme source naturelle d'antioxydants et de pigments d'intérêt.

## 2.2. Abstract

*Nephroselmis* sp. was previously identified as a species of interest for its antioxidant properties owing to high carotenoid content. In addition, nitrogen availability can impact biomass and specific metabolites production of microalgae. To optimize parameters of antioxidant production, *Nephroselmis* sp. was cultivated in batch and continuous culture conditions in stirred closed photobioreactors under different nitrogen conditions (N-repletion, N-limitation and N-starvation). The aim was to determine the influence of nitrogen availability on peroxy radical scavenging activity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay) and carotenoid content of *Nephroselmis* sp.. Pigment analysis revealed a specific and unusual photosynthetic system with siphonaxanthin-type light harvesting complexes found in primitive green algae but also high lutein content and xanthophyll cycle pigments (i.e. violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin) as observed in most advanced chlorophytes. The results indicated that N-replete condition enhance carotenoids biosynthesis which would correspond to a higher antioxidant capacity measured in *Nephroselmis* sp.. Indeed, peroxy radical scavenging activity and total carotenoids were higher under N-replete condition, and decreased sharply under N-limitation or starvation conditions. Considering individual carotenoids, siphonaxanthin, neoxanthin, xanthophyll cycle pigments and lycopene followed the same trend than total carotenoids while  $\beta$ -carotene and lutein stayed stable regardless of nitrogen availability. Carotenoids productivities were also higher under N-replete treatment. Peroxy radical scavenging activity measured with ORAC assay (63.6 to 154.9  $\mu\text{mol TE g}^{-1}\text{ DW}$ ) and lutein content (5.22 to 7.97  $\text{mg g}^{-1}\text{ DW}$ ) were within the upper range of values reported previously for other microalgae. Furthermore, content of siphonaxanthin was 6 to 20% higher than in previous identified sources (siphonous green algae). These results highlight the potential of *Nephroselmis* sp. as a source of natural antioxidant and pigment of interest.

**Keywords:** lutein; natural products; nutrients; peroxy radical; siphonaxanthin

## 2.3. Introduction

Microalgae are recognized as a promising source of natural antioxidant products for nutraceuticals, pharmaceuticals and cosmetics industries (Guedes, Amaro, and Malcata 2011b; Mimouni et al. 2012; De Morais et al. 2015; Aklakur 2016; Sansone and Brunet 2019). Their



antioxidant properties are attributed to a large content and variety of molecules including ascorbic acid, tocopherols, phenolic acids, and carotenoids (Abalde et al. 1991; Durmaz 2007; Goiris et al. 2012; Cirulis et al. 2013; Safafar et al. 2015). Antioxidant activity of carotenoids is related to their photoprotective function against photo-oxidative damages caused by reactive oxygen species (ROS) that are continuously produced through photosynthesis and aerobic metabolism (Young and Lowe 2001; Sandmann 2019). Photoprotective carotenoids protect the cell against oxidative stress by several mechanisms including (i) dissipation of excess energy by heat through the xanthophyll cycle (Demmig-Adams and Adams 1996), (ii) peroxy radical scavenging (iii), singlet oxygen quenching and (iv) by preventing the formation of singlet oxygen by deactivating photosensitizers such as triplet-state chlorophyll (Edge et al. 1997; Stahl and Sies 2003; Patias et al. 2017). Carotenoids can be divided in two groups: (i) the primary carotenoids pertaining to the photosystems (PSs) with light harvesting and photoprotective function and (ii) the secondary carotenoids which are not pertaining to the PSs but still have a photoprotective function (Mulders et al. 2014). Generally, primary carotenoids are more abundant when conditions are favorable for growth while secondary carotenoids increase in response to stressors action (Mulders et al. 2014). Under stressful growth conditions such as excess of light, nutrient starvation, high salinity or extreme temperature, production of ROS is stimulated (Borowitzka 2018). As a defense response to ROS excess, antioxidant molecules, including secondary carotenoids, can accumulate in the cell of some microalgae (Shaish et al. 1993; Salguero et al. 2003; Solovchenko 2013; Paliwal et al. 2017). Thus, to enhance the production of antioxidants, modification of culture conditions can be implemented to mimic environmental stresses.

Nitrogen availability can impact production of biomass and specific metabolite. Indeed, as a major component of proteins, nucleic acids and chlorophylls, nitrogen (N) is one of the most important elements to influence biochemical content of microalgae. In addition, N-starvation is known to induce ROS generation in microalgae cells (Zhang et al. 2013; Çakmak et al. 2015; Chokshi et al. 2017). Indeed, several authors have shown an increase of hydrogen peroxide (Çakmak et al. 2015; Chokshi et al. 2017; Hamid and Sibi 2018) and an increase of lipid peroxidation (Zhang et al. 2013; Yilancioglu et al. 2014; Fan et al. 2014; Çakmak et al. 2015; Chokshi et al. 2017) in microalgae cells as a result of N-starvation. ROS increase leads to a deep variation of antioxidant content (Solovchenko et al. 2008; Lamers et al. 2012; Goiris, Van Colen, et al. 2015; Ruiz-Domínguez et al. 2015; Zhang et al. 2019), a well-known example being the massive accumulation of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella* spp. exposed to N-starvation combined with high light and high salinity (Ben-Amotz and Avron 1983; Salguero et al. 2003;

Lamers et al. 2012). However, the influence of nitrogen availability on antioxidant compound is species specific, and high antioxidant activity due to over-accumulation of secondary carotenoids under nutrient stress should not be generalized to all species. Indeed, only some chlorophytes species are able to accumulate secondary carotenoids (Mulders et al. 2014), whereas several studies describe a decrease of antioxidant activity and primary carotenoids with N-starvation (Aremu et al. 2015, 2016; Goiris, Van Colen, et al. 2015; Çakmak et al. 2015).

In this study, we focus on the effects of nitrogen availability on antioxidant activity and carotenoid content of *Nephroselmis* sp.. It is a chlorophyte species isolated in tropical lagoon of New Caledonia that was previously identified as a good source of natural antioxidant owing to its high carotenoid content (Coulombier et al. 2020). In addition, *Nephroselmis* sp. contains siphonaxanthin (Yoshii et al. 2005; Coulombier et al. 2020), an uncommon pigment of interest for biotechnological applications. Indeed, it was shown that this ketocarotenoid, mainly found in primitive green algae, has several bioactive properties, including antioxidant activity (Dambeck and Sandmann 2014) but also anti-angiogenic (Ganesan et al. 2010), anti-obesity (Li et al. 2015; Zheng et al. 2018, 2020), anti-inflammatory (Manabe et al. 2020) and apoptosis-inducing effect (Ganesan et al. 2011).

In a previous study, it was found that high light conditions induced an increase of carotenoid content, including siphonaxanthin, and peroxy radical scavenging activity on *Nephroselmis* sp. (Coulombier et al. 2020). However, the effects of other culture parameters (e.g. pH, temperature, nutrient) on antioxidant activity and carotenoids content, especially siphonaxanthin, have not yet been investigated in *Nephroselmis* sp.. Then, the aim of this study was to assess the effect of nitrogen availability, combined with high light intensity, on antioxidant activity and carotenoid content of *Nephroselmis* sp. to optimize their production.

## 2.4. Materials and methods

### 2.4.1. Strain

*Nephroselmis* sp. N3C46 (Prasinophytina, Chlorophyta, Annexe 3) was isolated in tropical seawater in the lagoon of New Caledonia (authorization n° 26960 delivered by the South Province of New Caledonia) (Coulombier et al. 2020). Inocula were grown 7 days in 1 L air bubbled Erlenmeyer flask in 0.2 µm filtered sterilized seawater enriched with 1 mL L<sup>-1</sup> of Walne's medium (Walne 1966). Continuous light intensity was set at 600 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> using a Li-cor quantum meter (LI-250A with a spherical probe US-SQS/L) and temperature was set at 26.5 °C.

### 2.4.2. *Nephroselmis* sp. molecular identification

Microalgal DNA was extracted using an optimized phenol-chloroform method (Sambrook et al. 1989). Briefly, cells were centrifuged (2000 g, 10 min, 4°C). The pellet was washed twice with TE-NaCl buffer (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.05 M, NaCl 0.1 M, pH 8.0). After overnight incubation with TE-NaCl, the pellet was pretreated with buffer lysis (1% SDS, 1% Sarkozyl, 400 µg mL<sup>-1</sup> Proteinase K) for 2 hours at 40°C. The extract was purified with equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (PCA, 25:24:1) and centrifuged (8600 g, 20 min, 4°C). The upper aqueous layer was further purified with an equal volume of chloroform and centrifuged (8600 g, 20 min, 4°C). The aqueous phase containing DNA was then pretreated by RNase (8 µg mL<sup>-1</sup>, 1 h, 60°C). After a second step of PCA extraction, DNA was precipitated and washed with isopropanol and 70% ethanol, respectively. Then, DNA pellet was solubilized in 100 µL of DNase-free water. The concentration and quality of the extracted genomic DNA was measured using a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). The amplification of the microalgal 18S rRNA was done using a universal primer pair 18S-F (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and 18S-R (5'-TCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'). The PCR reaction was performed in a final volume of 50 µL, which included: Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM); dNTPs (0.2 mM), GoTaq G2 (0.05 µg µL<sup>-1</sup>, Promega), primer forward (1 µM); primer reverse (1 µM) and extracted DNA (0.01 ng µL<sup>-1</sup>). The PCR amplification was then performed in a thermocycleur (Mycycler, BioRad). The PCR product was then examined in 1% agarose gel and subsequently cloned (band at 1800 bp) with TOPO TA cloning kit (Invitrogen ref: K457501). The clones were sequenced on Sanger ABI at Eurofins genomics (France). The DNA sequence was then compared with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, blast.ncbi.nlm.nih.gov; (Altschul et al. 1990)) for taxonomic identification. In addition, the *Nephroselmis* 18S rRNA sequence was placed with a representative selection of *Nephroselmis* spp. sequences taken from GenBank (similarly as in Jauffrais, LeKieffre, Schweizer, Geslin, et al. (2019) and Jauffrais, LeKieffre, Schweizer, Jesus, et al. (2019) with diatoms). The microalgal 18SrRNA sequence was deposited in GenBank (GenBank accession number: MT833289).

### 2.4.3. Culture conditions and experimental protocol

Experiments were carried out in two 10 L photobioreactors (PBRs) made of transparent polymethylmethacrylate. Temperature was kept constant at 26.5 °C ± 0.3, and pH was regulated at 7.75 ± 0.04 by automated CO<sub>2</sub> addition. Light was provided on one side of the PBRs using

seven adjustable fluorescent light tubes (OSRAM cool 109 daylight HO24W/965). Continuous light was set at  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  by measuring light intensity inside the PBRs. High light irradiance was used on the basis of previous results (Coulombier et al. 2020) that reported a better antioxidant activity of *Nephroselmis sp.* with high light intensity. A Rushton turbine at 60 rpm and 0.2  $\mu\text{m}$  filtered air bubbling were used to homogenize the culture. Before inoculation, PBRs were sterilized for 20 minutes with a 5‰ peroxyacetic acid solution and rinsed twice with 0.2  $\mu\text{m}$  filtered seawater. PBRs were inoculated with 1 L of inoculum and filled up to 9.5 L with 0.2  $\mu\text{m}$  filtered seawater enriched with 1  $\text{mL L}^{-1}$  of Walne's medium at 1.18 mM-N to reach an initial concentration of  $7 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$ .

The experiment was separated in 3 successive stages with various nitrogen conditions (Figure 29):

(1) a first batch culture period (day 0 to day 6) was applied to study the effect of N-replete to N-starvation condition. At the end of this period and owing to sample collections during this first batch culture, PBRs volumes were restored to 9.5 L (day 6) by adding filtered sea water (0.2  $\mu\text{m}$ ) enriched enriched with 1  $\text{mL L}^{-1}$  of Walne's medium at 1.18 mM-N to ensure that the temperature and pH probes remained submerged.

(2) The PBRs were then switched to a continuous mode of culture in chemostat to study the effect of N-limitation (day 7 to day 27). During this period, a dilution rate of  $0.3 \text{ day}^{-1}$  was applied. The culture medium was composed of filtered seawater (0.2  $\mu\text{m}$ ) enriched with 1  $\text{mL L}^{-1}$  of Walne's medium at 1.18 mM-N (Walne 1966). Light intensity was increased to  $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  on day 8 to ensure that there was no light limitation owing to very high cellular concentration ( $>25 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ ). Continuous culture was maintained until analyses at steady state (*i.e.*, at least 3 days with less than 10 % variation of cellular concentration and absorbance).

(3) Finally, the PBRs were switched back to a second batch culture period (day 28 to day 31) in N-starvation until beginning of senescence.

#### **2.4.4. Cell growth measurements**

Growth was followed using two methods and performed daily. Cells were counted using Malassez hemocytometer under an optical microscope and light absorbance was measured at 680 and 800 nm for chlorophyll *a* absorption and non-pigmented cell compounds absorption, respectively (see light absorbance at 680 nm over time in Annexe 4 and correlation analysis between cell concentration and light absorbance at 680 nm in Annexe 5).

#### **2.4.5. Particulate organic carbon and nitrogen and residual nitrate and phosphate**

Carbon and nitrogen cell content and residual nitrate and phosphate in the medium were determined daily. For C and N analysis, samples of 2 to 20 mL of culture were filtered through pre-combusted glass filters (1.2 µm, Whatman GF/C), and filters were dried at 70 °C for 24 h, and kept at -20 °C until analysis by CHN elemental analyzer (SERCON Integra 2). For residual nitrate and phosphate, 10 mL of culture medium was filtered through a 0.2 µm filter and filtrate was kept at -20 °C until analyses using continuous flow auto analyzer (AA3 Seal Analytical).

#### **2.4.6. Measure of antioxidant activity and pigments analysis**

##### **➤ Sampling**

In each PBR, samples of 1 L of culture were collected at different steps of the culture to determine dry weight, antioxidant activity and pigment composition. During the first batch culture, two samples were collected during exponential growth phase (days 2 and 3) and two sample were collected at stationary phase (days 4 and 6). During continuous culture, one sample was collected after the refill of PBRs (day 7), and two samples were collected and pooled at steady state (days 23 and 24). During the second batch culture, samples were collected daily until senescence (days 28, 29, 30, and 31).

For all samples, microalgae were harvested by centrifugation (4500 g, 10 minutes, 4 °C), freeze dried and kept at -80 °C until extraction. Dry weight (DW) was determined by weighing the total amount of harvested biomass that was freeze dried.

##### **➤ Antioxidant activity**

Extracts for antioxidant activity determination were obtained by maceration in ethanol. In the dark, at room temperature, 50 mg of freeze dried biomass was ground using a pestle and mortar and then suspended in 5 mL of ethanol. The solution was placed at -20 °C in a closed container during 30 minutes in darkness to limit oxidation. Then the extract was centrifuged (4500 g, 5 min, 4 °C). The supernatant was conserved and the pellet was resuspended in 2 mL of ethanol and centrifuged again. The procedure was repeated until the pellet remained colorless (two to three times). The supernatants of each extract were pooled, dried under a stream of nitrogen and stored under nitrogen atmosphere at -80 °C until analysis. On the basis of a previous study, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay was selected to determine antioxidant activity (Coulombier et al. 2020). ORAC assay measures the scavenging capacity of an antioxidant against peroxy radicals by hydrogen atom transfer. Thermal decomposition of 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) leads to the formation of peroxy radicals

that react with fluorescein (fluorescent probe). It causes a fluorescence loss that is measured over time (Prior et al. 2005). A method adapted from Watanabe et al. (2016) was applied on *Nephroselmis sp.* extracts (Coulombier et al. 2020). Extracts and trolox (standard) were first diluted in DMSO (5.7 mg mL<sup>-1</sup>). Then 10% of the extracts or trolox solutions were mixed with 90% (v/v) of a diluent solution made of 7% (w/v) of randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (RMCD) in 50% (v/v) acetone aqueous solution. Then, each extract and trolox were diluted again with DMSO/diluent solution (10:90 v/v) to obtain 3 different concentrations (50, 25 and 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and a trolox concentration range from 0.5 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to make a calibration curve. In 96 black wells plate, 35  $\mu\text{L}$  of each sample were placed in the wells. A blank was made with the same volume of DMSO/diluent solution (10:90 v/v). Fluorescein (115  $\mu\text{L}$ , 77.5 nM) was added to the wells, and the plate was incubated at 37 °C for 10 minutes with a 20 rpm agitation. Then, 50  $\mu\text{L}$  of AAPH (82.4 mM) was added and the fluorescence was measured for 300 minutes every 2 minutes at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 528 nm.

For each sample and the blank, Area Under the Curve (AUC) was calculated with the formula from Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, and Prior (2002) :

$$\text{AUC} = 0.5 + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0} + \dots + \frac{f_{298}}{f_0} + 0.5 \left( \frac{f_{300}}{f_0} \right) \quad (1)$$

where  $f_0$  is the initial fluorescence and  $f_i$  is the fluorescence at time  $i$ . Net AUC was obtained by subtracting AUC of the blank to the AUC of the sample. Antioxidant activity of the extracts was computed by linear regression on a trolox calibration curve obtained by plotting trolox concentration vs net AUC. The results are expressed as ORAC value in  $\mu\text{mol trolox equivalent g}^{-1}$  of dried weight biomass ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW).

#### ➤ Pigments analysis

For pigment analysis, extraction was performed on 40 mg of fresh dried biomass previously ground using a mortar and pestle to obtain a fine powder, and suspended in 4 mL of absolute ethanol. The mixture was homogenized using a vortex and 0.5 mL was immediately sampled and mixed with 100 mg of 150-400  $\mu\text{m}$  glass beads in a mixer miller (Retsch MM-400) for 10 minutes at a frequency of 30 Hz. After centrifugation (16000 g, 5 min, 6 °C), the supernatant was conserved and the pellet was resuspended using a vortex with 500  $\mu\text{L}$  of ethanol and centrifuged again. This procedure was repeated twice until the pellet remain colorless. The three supernatants were then pooled and filtered on a 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE filter prior HPLC analysis. The samples were analyzed following the method of Van Heukelem and Thomas (2001) by HPLC-UV-DAD (Agilent Technologies series 1200 HPLC-UV-DAD) using an Eclipse XDB-C8

reverse phase column (150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  particle size, Agilent). Pigment identification was done using a spectral library published in Serive et al. (2017). Quantification was carried out using external calibration against pigments standard (lutein, neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene, lycopene, fucoxanthine, chlorophylls a and b purchased from DHI, Denmark). Quantification of siphonaxanthin was done according to fucoxanthin standard as recommended by Roy et al (2013). Moreover, the type of siphonaxanthin has been identified by UV-vis spectrum in HPLC system and mass spectroscopy analysis in our previous study (Coulombier et al. 2020).

#### 2.4.7. Statistical analysis

Following an examination of homogeneity of variance and normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test), a one-way ANOVA was performed and differences were considered significant at  $P (\alpha = 0.05) < 0.05$ . A Fisher's least significant difference (LSD) test was then applied to determine which experimental conditions were significantly different. To study the correlation between carotenoids content and antioxidant activity, a Pearson correlation test was used. Statistical analyses were carried out using Statgraphics Centurion XV.I (StatPoint Technologies, Inc., USA).

## 2.5. Results

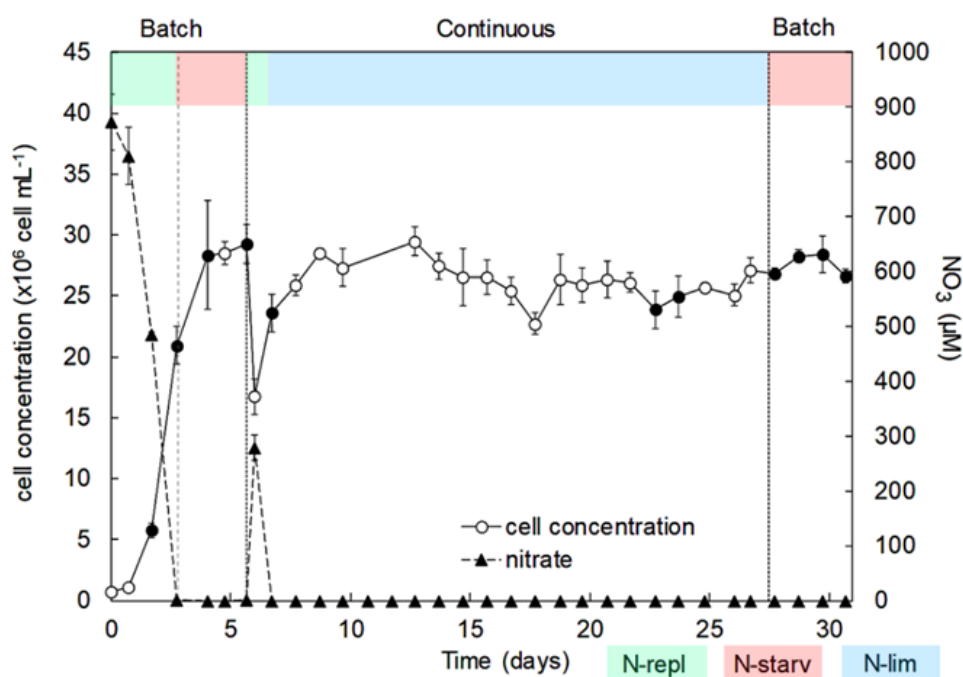
### 2.5.1. Identification, growth and elemental composition

The phylogenic analysis distributes the microalgal 18S rRNA sequence in the *Nephroselmis* genus (Annexe 6). The *Nephroselmis* sp. (N3C46) is closely related to *Nephroselmis rotunda* (M0932, (Marin and Melkonian 2010)) with 93% branch support (Annexe 6).

To evaluate the impact of nitrogen availability on growth and cellular elemental composition of *Nephroselmis* sp., the experiment was separated in 3 successive stages with various nitrogen conditions (Figure 29): (1) a first batch culture period successively in N-replete (N-repl) and N-starvation (N-starv) condition (Batch), (2) a continuous culture in chemostat with N-limitation (Continuous N-lim) and (3) a second batch culture period in N-starvation until senescence (Batch N-starv).

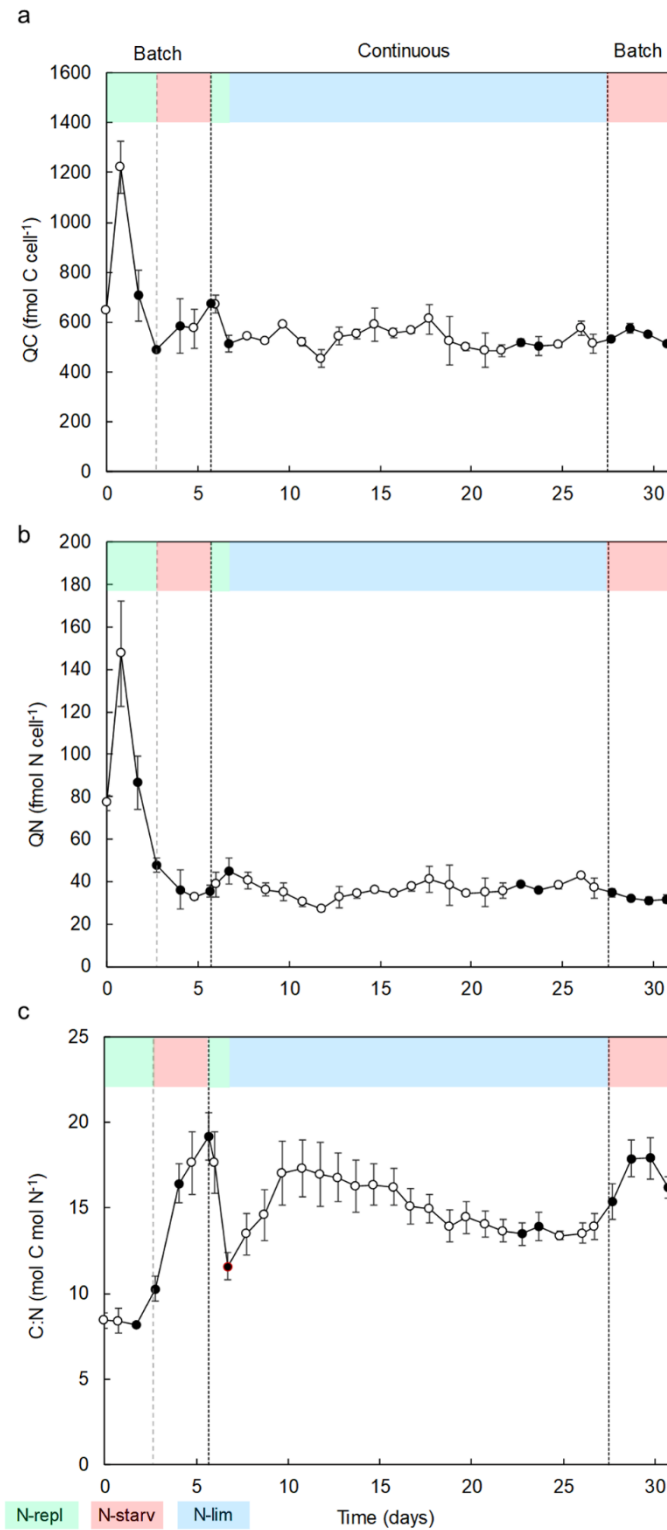
During the first batch culture period (day 0 to day 6), nitrate in culture medium was depleted in three days but cells kept dividing until day 4, reaching a maximum cell concentration of  $29 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  (Figure 29). N-starvation directly impacted carbon cellular content which increased by 38% from day 3 to day 6 (Figure 30a), *i.e.* cell division stopped but total biomass production (dry weight) still increased significantly until  $0.56 \text{ g L}^{-1}$  on day 6 (Figure

31). On the contrary, nitrogen cellular content decreased by 78% from day 1 to its lowest values at the end of the first batch culture period,  $\sim 32 \text{ fmol N cell}^{-1}$  (Figure 30b). The C:N (Carbon:Nitrogen) ratio, around 8 under N-replete condition, rise up to 19.2 under N-starvation conditions (Figure 30c). At day 7, the cultures were switched from batch to continuous mode. Then, the PBRs refill with culture medium led to culture dilution and nitrate resupply (Figure 29), which induced cell division, a decrease of cellular carbon content, an increase of cellular nitrogen content, and a drop of the C:N ratio (Figure 30). Steady state was reached at day 20 with a cell concentration of  $25 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$  and a production of biomass of  $0.35 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$  (Figure 31). Since the culture was N-limited, nitrogen cellular content remained lower ( $36 \pm 0.7 \text{ fmol N cell}^{-1}$ ) and the C:N ratio ( $14 \pm 0.2$ ) higher than in N-replete conditions. At day 28 the cultures were switched back to batch which induced a decrease of the nitrogen cellular content to its lowest values ( $\sim 32 \text{ fmol N cell}^{-1}$ ), whereas cell concentration, carbon content and biomass production increased at the beginning of the N-starvation. The growth and carbon content declined when the senescence phase began. Dissolved phosphate persisted in the medium throughout all experiments (Annexe 7), indicating no phosphate limitation.

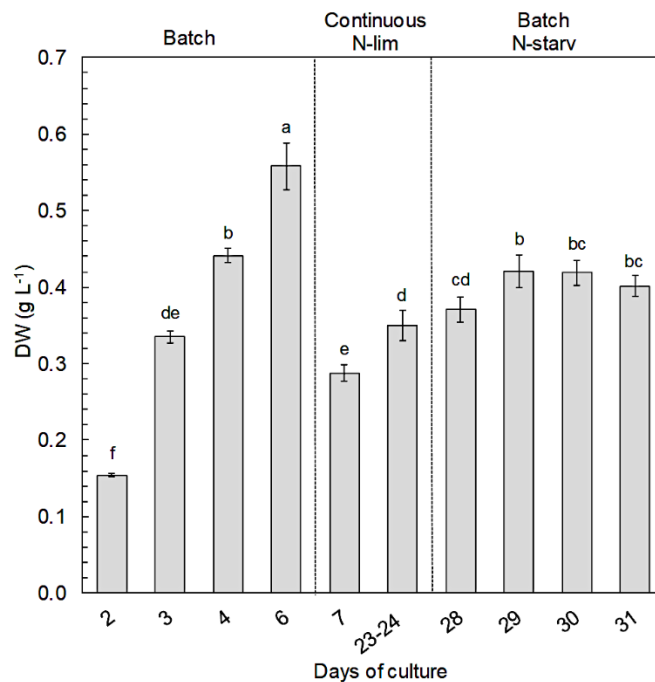


**Figure 29.** Cell concentration ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) and residual nitrate concentration ( $\mu\text{M}$ ) over time of *Nephroselmis* sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity and carotenoids analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 2$ ).





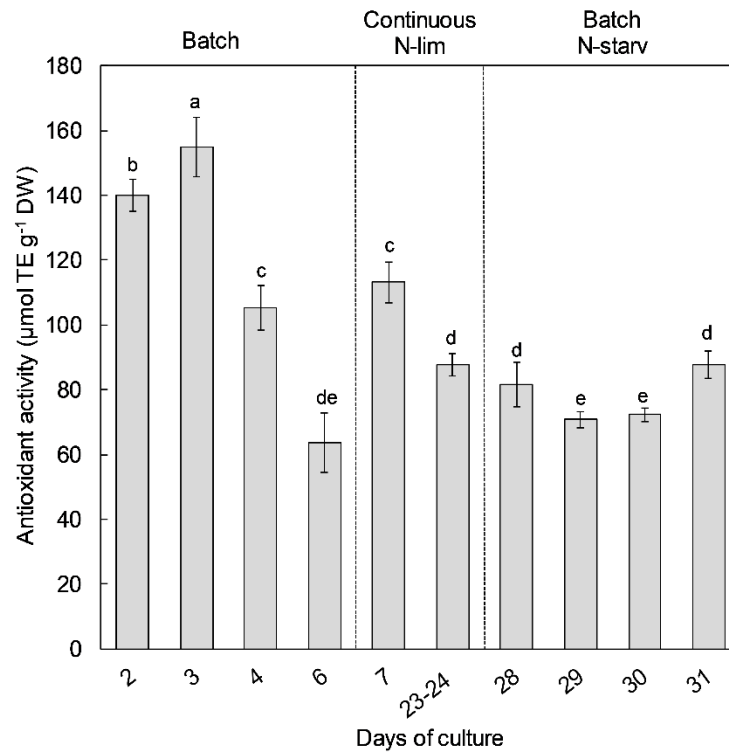
**Figure 30.** Carbon cell quota (fmol cell<sup>-1</sup>) QC (**a**), nitrogen cell quota QN (fmol cell<sup>-1</sup>) (**b**), C:N (Carbon:Nitrogen) ratio (**c**) over time for *Nephroselmis* sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity measure and carotenoids analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 2).



**Figure 31.** Dry weight (DW) of *Nephroselmis* sp. biomass (g L<sup>-1</sup>) at different times of the culture. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05)

### 2.5.2. Antioxidant activity

Antioxidant activity of *Nephroselmis* sp. was measured with ORAC assay at different times of the culture. Antioxidant activity ranged from 63.6 to 154.9 μmol TE g<sup>-1</sup> DW (Figure 32). The highest antioxidant activities were found during the exponential growth phase of the first batch culture period, at days 2 and 3. The highest value (154.9 μmol TE g<sup>-1</sup> DW) reached at day 3 was concomitant to the first day of the nitrate starvation in the culture medium. In all conditions with N-limitation or starvation (*i.e.* steady state in continuous mode or the stationary phases in batch) antioxidant activity was more than 2-time lower than in N-replete cultures. After nutrient resupply on day 7, antioxidant activity increased by 47%, but maximal antioxidant activity observed on day 3 was not restored.



**Figure 32.** Antioxidant activity measured with ORAC assay ( $\mu\text{mol trolox equivalent g}^{-1} \text{ DW}$ ) of *Nephroselmis* sp. at different times of the culture. Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 2$ )

### 2.5.3. Pigment content and composition

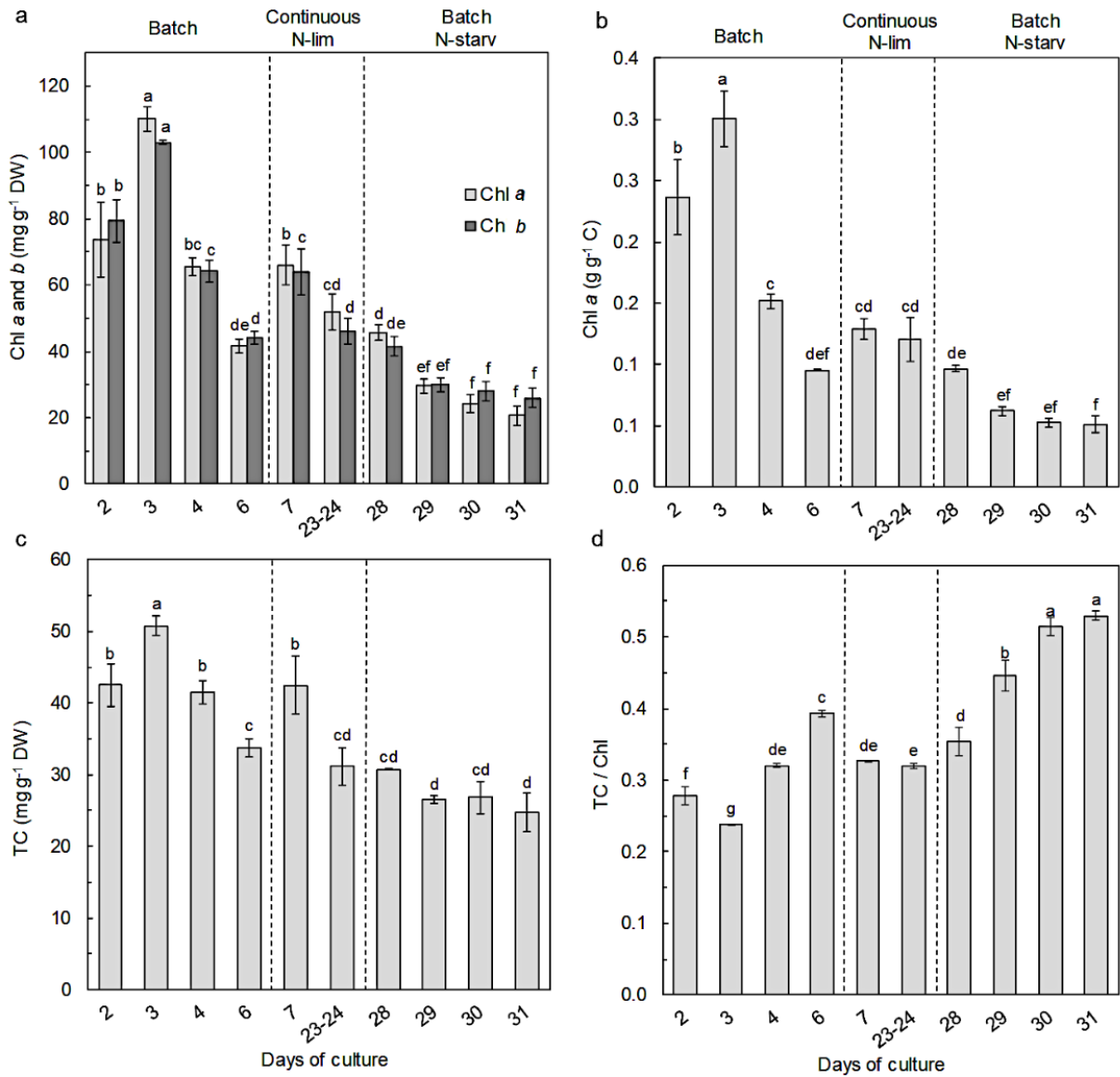
Pigment profile and content composition were measured at different experimental stages during the culture. The pigments of *Nephroselmis* sp. include chlorophyll *a* (chl *a*), chlorophyll *b* (chl *b*),  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, all-*trans*-neoxanthin, *cis*-neoxanthin and siphonaxanthin (see HPLC chromatogram in **Annexe 8**). Chlorophyll *a* (express on dry weight basis or on carbon content basis), chlorophyll *b* and total carotenoid (TC) content (Figure 33a, b and c) followed similar variations. During the first batch culture period, their content increased throughout the exponential growth phase and reached the highest concentration on day 3 (chl *a*  $110.1 \pm 3.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , chl *b*  $103.0 \pm 0.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , TC  $50.7 \pm 1.3 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) when nitrate was depleted in the culture medium. Once nitrate was depleted, chlorophyll and total carotenoid content quickly decreased from day 3 to day 6, by a factor 2 and by a factor 1.5 respectively. After nutrient resupply (day 7), chlorophyll and total carotenoid increased by 59% and 26% and then decreased by 22% and 26% at steady state. During the second batch period, the pigment content decreased along with the N-starvation reaching its lowest values (chl *a*  $20.69 \pm 2.93 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , chl *b*  $26.03 \pm 2.87 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , TC

$24.72 \pm 2.78 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) at the end of the experiment. TC/Chl ratio (Figure 33d) followed opposite variations: during the first batch period, TC/Chl ratio slightly decreased in the exponential growth phase (day 2 to day 3) and started to increase from  $0.24 \pm 0.00$  to  $0.39 \pm 0.00$  after nitrate starvation. After nutrient resupply, TC/Chl ratio decreased and reached a similar value than at steady state ( $\sim 0.33$ ). During the second batch period (day 28), the TC/Chl ratio increased until reaching its highest value at day 31 ( $0.53 \pm 0.01$ ).

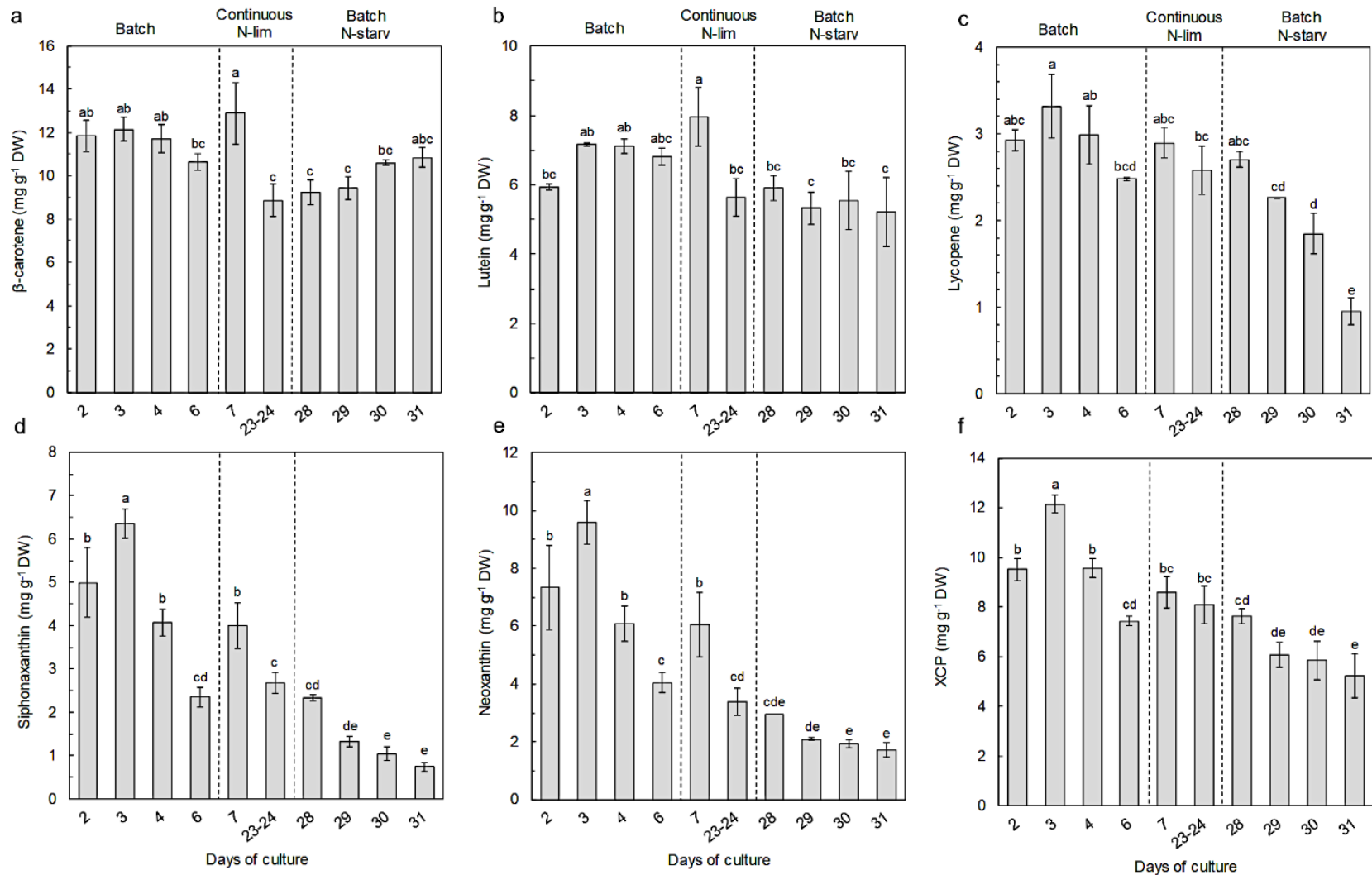
Regarding individual carotenoids (Figure 34, Annexe 9),  $\beta$ -carotene was the major carotenoid, representing 24 % to 44% of total carotenoids followed by lutein that represented 14 to 21% of total carotenoids. Their concentration was stable throughout the experiment from  $8.86 \pm 0.74$  to  $12.9 \pm 1.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  for  $\beta$ -carotene and from  $5.22 \pm 1.00$  to  $7.97 \pm 0.84 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  for lutein.

The other carotenoids were present in smaller concentrations. Siphonaxanthin and neoxanthin varied concomitantly with chlorophyll. Their highest concentration was measured on day 3 ( $6.36 \pm 0.33$  and  $9.58 \pm 0.75 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  respectively) and similarly to chlorophyll, siphonaxanthin and neoxanthin drastically declined along with N-starvation reaching values of  $0.74 \pm 0.12$  and  $1.72 \pm 0.25 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  respectively on day 31. The xanthophyll cycle pigments (*i.e.* violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin) and lycopene followed the same trend than siphonaxanthin and neoxanthin but with less variations of concentration. Their concentration varied respectively from  $12.14 \pm 0.35 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  and  $3.32 \pm 0.37 \text{ mg g}^{-1}$  on day 3 to  $5.24 \pm 0.88 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  and  $0.95 \pm 0.16 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  on day 31.

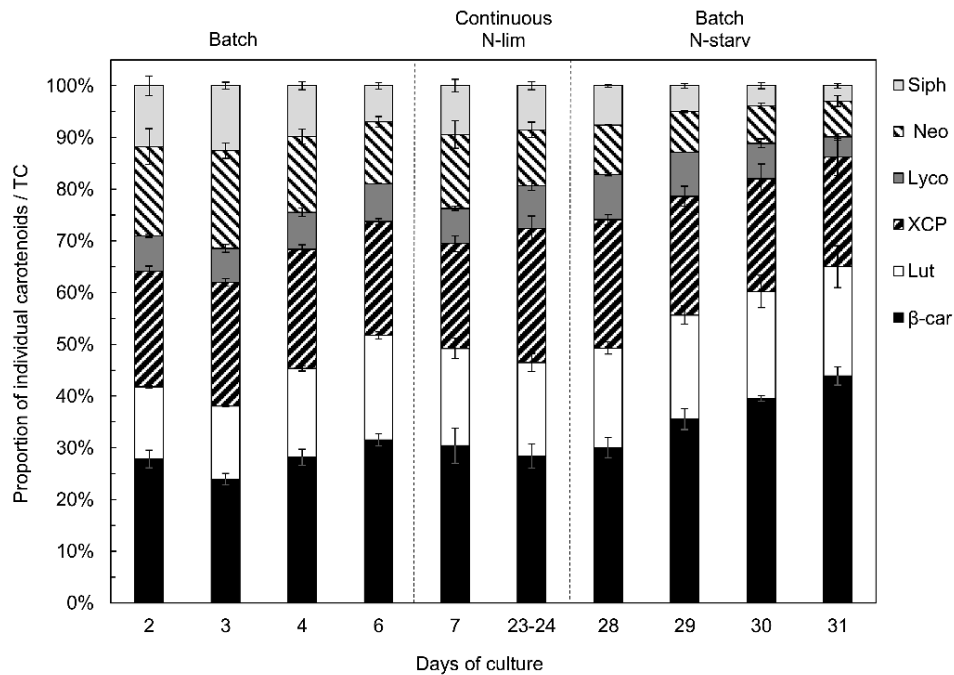
If we consider the proportion of the different carotenoids against total carotenoids (Figure 35), xanthophyll cycle pigments and lycopene proportion stayed stable, around 23 and 7% respectively, throughout the experiment. However,  $\beta$ -carotene and lutein proportion increased along with N-starvation, while siphonaxanthin and neoxanthin proportion decreased sharply. At the end of the experiment,  $\beta$ -carotene and lutein reached up 65% of total carotenoids while siphonaxanthin and neoxanthin represented almost 10%.



**Figure 33.** Variation of pigment contents in *Nephroselmis* sp. at different times of the culture. Chlorophyll a and b content ( $\text{mg g}^{-1}$  DW) (a), chlorophyll a content ( $\text{g g}^{-1}$  carbon) (b), total carotenoids (TC) content ( $\text{mg g}^{-1}$  DW) (c), total carotenoids / chlorophyll (d). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 2$ ). Different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ )



**Figure 34.** Variation of carotenoids (mg g<sup>-1</sup> DW) in *Nephroselmis* sp. at different times of the culture,  $\beta$ -carotene (a), lutein (b), lycopene (c), siphonaxanthin (d), neoxanthin (*trans* and *cis*) (e), xanthophyll cycle pigments (XCP: violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin) (f). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p < 0.05)



**Figure 35.** Variation of carotenoids proportion against total carotenoids in *Nephroselmis* sp. at different times of the culture. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin (*trans* and *cis*); Lyco, lycopene; XCP, Xanthophyll Cycle Pigments: violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin; Lut, lutein; β-Car, β-carotene. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2)

#### 2.5.4. Correlation between antioxidant activity and carotenoid content

A correlation analysis was performed to assess a potential relationship between carotenoid content and peroxy scavenging activity (Table 10). A good correlation was observed between total carotenoid content and antioxidant activity (Pearson's correlation coefficient of 0.80). The adjusted  $R^2$  indicates that the total carotenoids content explains 62% of the variability of the antioxidant activity measured in *Nephroselmis* sp. extracts. A closer look to individual carotenoids showed that they all contributed to the correlation with antioxidant activity with different strength: a strong relationship was observed with siphonaxanthin, neoxanthin and xanthophyll cycle pigments contents, while the relationship was weaker for lutein, lycopene and β-carotene contents. A good correlation between chlorophyll and antioxidant activity was also found (correlation coefficient of 0.83 and  $R^2$  of 0.68) but it was attributed to the concomitant variation of chlorophyll with siphonaxanthin and neoxanthin.

**Table 10.** Pearson correlation test between carotenoid content (mg g<sup>-1</sup> DW) and antioxidant activity measured with ORAC assay (µg trolox equivalent mg<sup>-1</sup> DW) in *Nephroselmis* sp. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin (*trans* and *cis*); XCP, Xanthophyll Cycle Pigments: violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin; Lut, lutein; Lyco, lycopene; β-Car, β-carotene.

	Antioxidant activity	
	Correlation coefficient	adjusted R <sup>2</sup>
Siph	0.82**	0.66
Neo	0.82**	0.66
XCP	0.75**	0.55
Lut	0.51*	0.22
Lyco	0.65**	0.40
β-car	0.60*	0.33
Total carotenoids	0.80**	0.62

\*: p<0.05, \*\*: p<0.001, n=22

### 2.5.5. Biomass and carotenoid productivities

Biomass and carotenoid productivities were calculated during the first batch culture period (day 2 to 6) and at steady state of the continuous culture (Table 11). The highest biomass productivities were obtained on day 3 ( $120.8 \pm 1.5$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) and in continuous mode at steady state with 0.3 day<sup>-1</sup> of renewal ( $110.6 \pm 5.7$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). The highest productivities for all individual pigment and total carotenoid were also measured on day 3 (siphonaxanthin,  $0.77 \pm 0.05$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; neoxanthin,  $1.16 \pm 0.08$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; xanthophyll cycle pigments,  $1.47 \pm 0.06$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; lutein,  $0.87 \pm 0.00$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; lycopene,  $0.40 \pm 0.04$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; β-carotene,  $1.47 \pm 0.08$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>; total carotenoids,  $6.13 \pm 0.24$  mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>).

**Table 11.** Biomass and carotenoids productivity (mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) of *Nephroselmis* sp. during first batch culture and at steady state of continuous culture. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin (*trans* and *cis*); XCP, Xanthophyll Cycle Pigments (violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin); Lut, lutein; Lyco, lycopene; β-Car, β-carotene; TC, total carotenoid. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05).

	Biomass	Siph	Neo	XCP	Lut	Lyco	β-car	TC	
Batch	Day 2	89.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.53 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.07 <sup>bc</sup>	3.82 ± 0.30 <sup>bc</sup>
	Day 3	120.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.13 ± 0.24 <sup>a</sup>
	Day 4	108.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.08 <sup>ab</sup>	4.50 ± 0.22 <sup>b</sup>
	Day 6	95.5 ± 2.6 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.71 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.07 <sup>bc</sup>	3.22 ± 0.21 <sup>c</sup>
Continuous at steady state (Days 23-24)	110.6 ± 5.7 <sup>ab</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.88 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.61 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.06 <sup>c</sup>	3.40 ± 0.34 <sup>c</sup>	



## 2.6. Discussion

Nitrogen availability had significant influence on growth and elemental composition of *Nephroselmis sp.*. After the first nitrate starvation (during the first batch period), cell concentration of *Nephroselmis sp.* still increased for one day (Figure 29) as reported in earlier studies (Young and Beardall 2003; De La Rocha et al. 2010). The sustained growth during early stage of N-starvation is explained by a redistribution of endogenous pool of nitrogen (*i.e.* amino acids, proteins, chlorophyll, free nitrate) for synthesis of nitrogen compounds that are essential to maintain cell division and survival (Dortch et al. 1984; De La Rocha et al. 2010; Hockin et al. 2012). However, a prolonged starvation period results in growth inhibition and ultimately cell death if nitrogen is not resupplied, as observed during the second batch period at the end of the experiment. Although growth was inhibited with N-starvation during the first batch culture, biomass production of *Nephroselmis sp.* still increased (Figure 31) which is probably linked to the increase of carbon cellular content (Figure 30). The C:N ratio under N-replete condition ( $8.3 \pm 0.1$ ) exceeds Redfield ratio that is assumed to be around 6.6 (Redfield 1958). However, Geider and La Roche (Geider and La Roche 2002) showed that C:N ratio of N-replete microalgae culture would rather be between 6.8 and 8.7 and increase under N-limited conditions. In batch culture, cells adjust their metabolism to acclimate to N-starvation but steady state cannot be reached if stress conditions persist, while in continuous culture, even if nitrogen limits growth, cells are able to acclimate to the low nitrogen concentration and steady state is reached. Thus, the physiological state of N-starved and N-limited cells are different which is reflected by the elemental composition (Cullen et al. 1992; MacIntyre and Cullen 2005). The C:N ratio of *Nephroselmis sp.* rises up to 19.2 under N-starved conditions while it stabilized at 14 in N-limited condition. The increase of C:N ratio in N-starved cells was driven by both decrease of nitrogen cellular content by 32% and an increase of carbon cellular content by 38%, while under N-limited conditions at steady state, carbon cellular content did not increase and nitrogen cellular content was higher than under N-starved condition resulting in a lower C:N ratio. The increase of carbon cell content is a common response of microalgae to N-starvation. Photosynthetic carbon fixation usually decreases, which generates an excess in carbon stored in nitrogen free compounds, mostly neutral lipids and carbohydrates (Jiang et al. 2012; Breuer et al. 2012; Jerez et al. 2016; Chen, Zheng, et al. 2017). At steady state in continuous culture, carbon is used for cell growth and do not accumulate in the cells (Hu et al. 2008; Breuer et al. 2012).

As for growth and elemental composition, nitrogen variation also induced adjustments of pigment content and composition of *Nephroselmis* sp.. Indeed, during first batch period, chlorophylls and total carotenoid content increased along with exponential cell growth and started to decrease once nitrogen was depleted in the culture medium. Both increased again when nitrate was resupplied (day 7) (Figure 33a and c). Nitrogen availability is known to impact photosynthetic apparatus; in microalgae, N-limitation induces a reduction of protein synthesis, resulting to a preferential loss of chloroplastic proteins and thus PSs proteins (Coleman et al. 1988; Berges et al. 1996; Young and Beardall 2003; Liefer et al. 2018). As a consequence, chlorophyll and carotenoids which are associated to the PSs, decreased as well, which is consistent with the results observed for *Nephroselmis* sp.. However, as a N-rich compound, chlorophylls of *Nephroselmis* sp. were more impacted by nitrogen availability, leading to an increase of TC/Chl ratio under N-deprivation (Figure 33d). It is consistent with previous reports on other green microalgae (Geider et al. 1998; Young and Beardall 2003; Solovchenko et al. 2008; Goiris, Van Colen, et al. 2015).

High light intensity and N-starvation are known to have cumulative effects on pigment content. Under N-starvation, chlorophyll and primary carotenoids usually decrease further with high light intensity, while secondary carotenoids production is stimulated, such as  $\beta$ -carotene in *Dunaliella* spp. (Ben-Amotz 1987; Solovchenko et al. 2008; Kim et al. 2013). In our experiment, nitrogen availability is the main factor that drives pigment variation. The shift of light intensity from 600 to 1100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  prior steady state measurements (day 8) was implemented to avoid light limitation during continuous culture. Pigment content of *Nephroselmis* sp. was not significantly impacted since their values were similar at day 6 and day 28 under identical nitrogen availability and culture method. N-limitation and an important self-shading effect owing to the high biomass that reduces the impact of light availability might explain this absence of difference in pigment content.

*Nephroselmis* sp., similarly to the majority of microalgae species, reacted to nitrogen starvation or limitation by reducing its photosynthetic activity. As a result, the pool of photosynthetic pigments decreased. Siphonaxanthin, neoxanthin, lycopene and xanthophyll cycle pigments followed similar variation than chlorophyll content in response to nitrogen availability owing to their implication in the PSs. The biological role of siphonaxanthin was not clearly described in green microalgae, but its functions were described in previous studies on siphonous green algae. This ketocarotenoid, firstly described by Yokohama (Yokohama et al. 1977), acted as an accessory light harvesting pigment absorbing blue-green light (Anderson 1983; Chen et al. 2008; Wang et al. 2013). Chen et al. (Chen et al. 2008) and Wang et al. (Wang et al. 2013)

showed in *Bryopsis corticulans* that siphonaxanthin was associated to PSI with chlorophyll *a* and *b* in a siphonaxanthin-chlorophyll *ab*-protein complex, and to light harvesting complex (LHC) of PSII with chlorophyll *a* and *b*, neoxanthin, and siphonaxanthin esters. The light harvesting complexes with siphonaxanthin would be ancestral LHCs that evolved by replacing siphonaxanthin by lutein and xanthophyll cycle pigments in higher plants to adapt to high light environment (Yoshii 2006). The strong correlation between siphonaxanthin and neoxanthin content and chlorophyll content observed for *Nephroselmis* sp. ( $R^2 = 0.98$ ,  $p < 0.001$  for siphonaxanthin and  $R^2 = 0.97$ ,  $p < 0.001$  for neoxanthin) suggests that LHCs of *Nephroselmis* sp. might be similar to LHCs of *Bryopsis corticulans*. However, unlike *Bryopsis*, *Nephroselmis* sp. contains also xanthophyll cycle pigments and a high concentration of lutein; this species might thus be at the intermediate stage between primitive chlorophytes with siphonaxanthin-type LHCs and higher plants (Yoshii et al. 2005; Yoshii 2006).

Yoshii et al. (2005) classified species of *Nephroselmis* into five distinct types according to their carotenoid composition, especially siphonaxanthin and its derivatives. Indeed, siphonaxanthin derivatives were found among all the *Nephroselmis* species studied by Yoshii et al. (2005) such as siphonaxanthin esters or methoxy siphonaxanthin. However, we did not find any siphonaxanthin derivatives for any culture condition in our strain (present study and Coulombier et al. (2020)), and we cannot classified it according to Yoshii et al. classification (2005). Thus, we suggest that this species could belong to a sixth type that contain only siphonaxanthin and no siphonaxanthin derivatives.

As the siphonaxanthin and neoxanthin content, the xanthophyll cycle pigments and lycopene content were higher in *Nephroselmis* sp. under N-replete condition (Figure 34). Information about lycopene are scarce since it is usually undetected in microalgae (Mulders et al. 2014), but it represented around 7% of total carotenoids in *Nephroselmis* sp. (Figure 35). Lycopene is a precursor of  $\alpha$  and  $\beta$ -carotene, but several studies have demonstrated its antioxidant properties as one of the most efficient quencher of singlet oxygen (Di Mascio et al. 1989; Sies and Stahl 1995; Miller et al. 1996; Takeoka et al. 2001; Muzandu et al. 2006) suggesting a photoprotective function. On the contrary, response of xanthophyll cycle pigments content to nitrogen availability has been well studied and our results are consistent with previous reports (Geider et al. 1998; Kim et al. 2013; Goiris, Van Colen, et al. 2015; Ram et al. 2019).

Unlike the other carotenoids (neoxanthin, siphonaxanthin, lycopene and the xanthophyll cycle pigments),  $\beta$ -carotene and lutein content did not follow the same variation than chlorophyll content.  $\beta$ -carotene and lutein are known to act as primary carotenoids with photoprotective functions (Telfer 2002; Jahns and Holzwarth 2012; Mulders et al. 2014). Therefore, for most

chlorophytes species, N-starvation induces a decrease of lutein (Geider et al. 1998; Del Campo et al. 2000; Solovchenko et al. 2008; Xie et al. 2013; Ho et al. 2015) and  $\beta$ -carotene content (Solovchenko et al. 2014; Ruiz-Domínguez et al. 2015) along with chlorophyll. Unexpected results were obtained for *Nephroselmis* sp. since lutein content remained stable regardless of nitrogen availability suggesting that this pigment is not associated to the PSs (Figure 34). Some chlorophytes species (*i.e.* *Dunaliella salina*, or *Parietochloris incisa*) are known to have the ability to accumulate  $\beta$ -carotene in extra-thylakoid lipid droplets when subjected to N-starvation along with other stressors such as high light intensity (Solovchenko et al. 2008; Ben-Amotz et al. 2009; Mulders et al. 2014). It could explain the stability of  $\beta$ -carotene content in *Nephroselmis* sp. under stressful condition, however to the best of our knowledge there is no report of extra-thylakoid lutein accumulation. Additional investigations are necessary to clarify the localization and the physiological role of lutein in *Nephroselmis* sp..

As for growth and pigment content, nitrogen availability strongly impacted antioxidant activity (peroxyl radical scavenging activity) of *Nephroselmis* sp. extract. Indeed, *Nephroselmis* sp. extract was twice more active under N-replete condition than under N-limited or starved conditions (Figure 32). Those results are in agreement with the few studies that evaluate the effects of N-limitation on antioxidant activities (Aremu et al. 2015, 2016; Goiris, Van Colen, et al. 2015; Çakmak et al. 2015). Çakmak et al. (2015) and Aremu et al. (2015, 2016) showed a negative impact of N-starvation on antioxidant activity of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* strains respectively. Goiris, Van Colen, et al. (2015) found an overall antioxidant activity 3 to 10 times higher in N-replete cultures than in the N-starved cultures of 3 microalgae species (*Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis suecica* and *Phaeodactylum tricorutum*). As phenolic and carotenoid contents showed similar responses to nitrogen level, it suggests that these compounds were the main contributors to the antioxidant activity. Our results showed a clear correlation between peroxyl radical scavenging activity of *Nephroselmis* sp. extract and total carotenoid content (Table 10), in agreement with our previous report (Coulombier et al. 2020). Peroxyl radical scavenging is essential to protect cellular membrane against oxidative damage since peroxyl radical can start lipid peroxidation chain reaction (Stahl and Sies 2003). All carotenoids seem to contribute to the peroxyl scavenging activity of *Nephroselmis* sp. extract which is consistent with several reports that have shown peroxyl scavenging activity of a variety of carotenoids (Naguib 2000; Müller et al. 2011; Rodrigues et al. 2012). However, the strongest correlation was measured with siphonaxanthin and neoxanthin suggesting that these two carotenoids had a higher activity, or at least one of them since they followed the same variations. The efficiency of each carotenoid toward peroxyl radical is known to be related to their specific

structure, such as the number of conjugated double bond, the type of terminal group, the presence of oxygen substituents or the *cis-trans* isomer configuration (Müller et al. 2011; Rodrigues et al. 2012). Despite some conflicting results due to the use of different protocols, all studies agreed that ketocarotenoids are among the most efficient carotenoids against peroxy radical, while hydroxycarotenoids and  $\beta$ -ionone carotenes are less active (Naguib 2000; Müller et al. 2011; Rodrigues et al. 2012). In addition, Dambeck and Sandmann (2014) have shown that siphonaxanthin exerts an efficient effect against radical formation and lipid peroxidation and our previous results on *Nephroselmis* sp. showed high peroxy radical scavenging activity although neoxanthin was not detected in the methanol/dichloromethane extracts (Coulombier et al. 2020). These results suggest a higher implication of siphonaxanthin than neoxanthin in peroxy scavenging activity of *Nephroselmis* sp. extract, but it needs to be confirmed by measures of peroxy radical scavenging activity of purified siphonaxanthin and neoxanthin. The other carotenoids appeared less efficient to scavenge peroxy radical; however, they are known to be implied in the cell's protection against oxidative stress by other mechanisms. Xanthophyll cycle pigments are able to quench singlet excited chlorophyll and dissipate by heat the excess of energy, lutein and  $\beta$ -carotene can deactivate triplet excited chlorophyll to prevent formation of ROS, and all carotenoids are able to quench ROS directly, especially singlet oxygen with different efficiency depending on the number of conjugated double bonds (Telfer et al. 2008; Jahns and Holzwarth 2012; Mulders et al. 2014).

In order to estimate the best nitrogen supply condition for carotenoids production, the biomass and carotenoid productivities in *Nephroselmis* sp. were determined (Table 11). The highest biomass productivities were obtained in the late exponential phase of the first batch culture (day 3) ( $120,8 \pm 1.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) and in continuous culture at steady state ( $110,6 \pm 5.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ). However, as carotenoid content was 62.5% much higher in the first batch culture than at steady state, the total carotenoid productivity increased by 80% between the two conditions. The best productivity was also achieved on day 3 for all individual carotenoids. Thus cultivation under N-replete condition is essential to obtain the highest carotenoid productivity and radical peroxy scavenging activity in *Nephroselmis* sp..

The high total carotenoid content, up to 5% of the cell's dry weight, with pigment of interest such as lutein and siphonaxanthin and high antioxidant activity make *Nephroselmis* sp. a species of interest. Indeed, the peroxy radical scavenging activity of *Nephroselmis* sp., between 63.6 to  $154.9 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ DW}$ , was among the highest values reported previously with ORAC assay in microalgae crude extract. Banskota et al. (2018) found ORAC values between 6.69 and  $52.98 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ DW}$  in methanol extracts of nine microalgae species (*Nannochloropsis*

*granulata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis chui*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella sorokiniana*, *Neochloris oleoabundans*, *Porphyridium aerugineum*, *Scenedesmus obliquus*, and *Scenedesmus* sp.). An anti-peroxyl radical activity of 61.53  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW was reported in 50% water acetone extract of *Phormidium autumnale* (Do Nascimento et al. 2020), and ORAC values of 31,21 and 12.2  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW were measured in 50% water ethanolic extracts of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* respectively (Agregán et al. 2018). Ahmed et al. (2014) found values in the same range than *Nephroselmis* sp. (45 to 288  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW) in hexane extracts of eleven microalgae species (*Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri*, *Pavlova salina*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, and *Dunaliella tertiolecta*), however peroxyl radical scavenging activity was higher in water (60 to 350  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW) and ethyl acetate extracts (169 to 577  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW). Furthermore, lutein content of *Nephroselmis* sp., up to  $7.97 \pm 0.84$  mg  $\text{g}^{-1}$  DW, was within the upper range values reported for lutein producing strains that range between 0.5 and 9.6 mg  $\text{g}^{-1}$  DW (Del Campo et al. 2000; Xie et al. 2013; Ho et al. 2015; Lin et al. 2015; Schüller et al. 2020; Loganathan et al. 2020). However, further work on culture conditions is necessary to improve biomass productivity, and thus lutein productivity to reach those reported in previous studies (up to 4.9 mg  $\text{L}^{-1}$  day $^{-1}$ ) (Sánchez et al. 2008; Casal et al. 2011; Xie et al. 2013; Ho et al. 2014, 2015). In addition to antioxidant activity, siphonaxanthin has interesting bioactive properties including induction of apoptosis of human leukemia cells (Ganesan et al. 2011), anti-angiogenic (Ganesan et al. 2010), anti-obesity (Li et al. 2015; Zheng et al. 2018, 2020) and anti-inflammatory effects (Manabe et al. 2020). Siphonaxanthin content in *Nephroselmis* sp. was 6 to 20% higher than content reported in green algae (Sugawara et al. 2014) pointing *Nephroselmis* sp. as a species of interest for siphonaxanthin production.

## 2.7. Conclusions

Pigment analysis of *Nephroselmis* sp. revealed a specific composition of the photosynthetic system at the crossroads of primitive green algae and higher plants. Correlation of siphonaxanthin and neoxanthin with chlorophylls suggests the presence of siphonaxanthin-type LHCs as in primitive green algae. However, the results showed the presence of xanthophyll cycle pigments and lycopene, which are also implied in the PSs, and the presence of a large amount of lutein as in most advanced chlorophytes. Surprisingly, lutein did not seem to be associated to the PSs.

Our results with *Nephroselmis* sp. highlight that N-replete condition leads to high peroxy radical scavenging activity, primary carotenoid contents and productivities with *Nephroselmis* sp.. Indeed, a 3-fold increase was found for primary carotenoid content and productivity, and a 2.4-fold increase for antioxidant activity under N-replete condition. Lutein and  $\beta$ -carotene contents were not influenced by nitrogen availability, but their productivities, which followed biomass productivity, were also higher under N-replete condition. In addition, the results showed high peroxy radical scavenging capacity that was linked to the carotenoid content of *Nephroselmis* sp., in particular to the siphonaxanthin and/or neoxanthin content. This high antioxidant activity owing to high carotenoid content makes *Nephroselmis* sp. a species of interest for carotenoids production as natural antioxidant especially lutein and siphonaxanthin. The impact of other culture parameters such as pH or temperature have not been investigated yet, but it would be interesting to study their effect to further improve carotenoid content and productivity of *Nephroselmis* sp.

## **2.8. Acknowledgments**

The authors acknowledge the Province Nord, the Province Sud, the Government of New Caledonia and the Comité Interministériel de l'Outre-Mer (CIOM) for financial support through the AMICAL (Aquaculture of Microalgae in New CAledonie) 1 and 2 research programs. The authors would also like to thanks Liet Chim from LPBA (Ifremer) for his help in the experiments design and manuscript improvement, and Anne Desnues and Philippe Gérard from the LAMA (LABoratoire des Moyens Analytiques) (IRD, Nouméa) for the elemental and nutrient analyses.

### **3. The effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification on *Tetraselmis* biomass production, photophysiology and antioxidant activity: a comparison using batch and continuous culture**

**Article accepté dans Journal of Biotechnology :** Coulombier N, Blanchier P, Le Déan L, Barthelemy V, Lebouvier N, Jauffrais T. The effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification on *Tetraselmis* biomass production, photophysiology and antioxidant activity: a comparison using batch and continuous culture

#### **3.1. Résumé**

Une espèce de *Tetraselmis* a été sélectionnée pour son activité antioxydante liée à sa grande capacité d'inhibition de la peroxydation des lipides. Afin d'optimiser l'activité antioxydante par le contrôle des conditions de culture, les effets d'une acidification contrôlée par injection de CO<sub>2</sub> ont été évalués sur la croissance de *Tetraselmis*, sa composition élémentaire, les paramètres photosynthétiques et l'activité antioxydante. Deux valeurs de pH ont été testées (6,5 et 8,5) sur des cultures en batch et en continu en photobioréacteurs. L'acidification a entraîné une amélioration de la croissance quel que soit le mode de culture. Cependant, les microalgues étaient dans un meilleur état physiologique à pH 8,5 qu'à pH 6,5. En effet, les paramètres photosynthétiques mesurés avec la fluorimétrie PAM (Pulse Amplitude Modulated) ont montré une baisse de l'efficacité du photosystème II (PSII) à pH 6,5 en batch. Cependant, à l'exception de la capacité de récupération du PSII, les paramètres photosynthétiques étaient similaires en culture continue pour les deux pH. Ces résultats suggèrent que la baisse du pH par ajout de CO<sub>2</sub> peut induire une conversion plus faible de la lumière en énergie chimique, en particulier lorsqu'elle est couplée à une limitation en azote et/ou pour des conditions de culture non équilibrées. L'activité antioxydante la plus élevée a été mesurée en culture continue à pH 6,5 avec une IC<sub>50</sub> de  $3,44 \pm 0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ce qui est proche de l'IC<sub>50</sub> des composés de référence (trolox et  $\alpha$ -tocophérol). De plus, l'analyse en composantes principales a révélé un lien étroit entre l'activité antioxydante et la méthode de culture, l'état photophysologique, le quota d'azote des cellules et le rapport C:N de *Tetraselmis* sp. Ces résultats mettent en évidence le potentiel de *Tetraselmis* sp. pour la production d'antioxydants naturels et le potentiel de la fluorimétrie PAM pour suivre une culture ayant pour but de produire de la biomasse avec une forte activité antioxydante.



### 3.2. Abstract

A *Tetraselmis* sp. was selected for its antioxidant activity owing to its high lipid peroxidation inhibition capacity. With the aim to monitor culture conditions to improve antioxidant activity, effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification on *Tetraselmis* growth, elemental composition, photosynthetic parameters and antioxidant activity were determined. Two pH values were tested (6.5 and 8.5) in batch and continuous cultures in photobioreactors. Acidification enhanced cell growth under both culture methods. However, the microalgae physiological state was healthier at pH 8.5 than at pH 6.5. Indeed, photosynthetic parameters measured with pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry showed a decrease in the photosystem II (PSII) efficiency at pH 6.5 in batch culture. Yet, with the exception of the PSII recovering capacity, photosynthetic parameters were similar in continuous culture at both pH. These results suggest that lowering pH through CO<sub>2</sub>-induced acidification may induce a lower conversion of light to chemical energy especially when coupled with N-limitation and/or under un-balanced culture conditions. The highest antioxidant activity was measured in continuous culture at pH 6.5 with an IC<sub>50</sub> of  $3.44 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , which is close to the IC<sub>50</sub> of reference compounds (trolox and  $\alpha$ -tocopherol). In addition, the principal component analysis revealed a strong link between the antioxidant activity and the culture method, the photophysiological state and the nitrogen cell quota and C:N ratio of *Tetraselmis* sp.. These results highlight *Tetraselmis* sp. as a species of interest for natural antioxidant production and the potential of PAM fluorometry to monitor culture for production of biomass with a high antioxidant activity.

**Keywords** : phytoplankton; chlorophyll *a* fluorescence; non photochemical quenching; photosystem II efficiency; TBARS assay

### 3.3. Introduction

Many natural products isolated from microalgae have attracted attention owing to their broad spectrum of biological activities with health promoting effects. Microalgae produce specific metabolites that can be used in cosmetics and pharmaceuticals; they have bioactive compounds with anti-UV, antibacterial, antifungal, anticancer, anti-inflammatory and/or antioxidant activities (Abad et al. 2008; Yuan et al. 2011; Talero et al. 2015; Safafar et al. 2015; Assunção et al. 2016; Sathasivam and Ki 2018). In addition, PUFAs (e.g., the omega-3 or -6 fatty acids), pigments (e.g., carotenoids), vitamins, sterols and polysaccharides from microalgae origin are

key molecules to develop dietary supplements in human nutrition and to improve animal feed (Plaza et al. 2008; Guedes, Amaro, and Malcata 2011a, b; Aklakur 2016).

Microalgae are currently studied as a potential source of natural antioxidant (Goiris et al. 2012; Assunção et al. 2016), as they could replace synthetic antioxidants in the food industry (Goiris, Muylaert, et al. 2015; Batista et al. 2017, 2019), and in the cosmetic, pharmaceutical and nutraceutical industries (Guedes, Amaro, and Malcata 2011b; Sansone and Brunet 2019). In addition, microalgae biodiversity, productivity and controlled culture conditions offer great potentials to produce a sustainable source of natural antioxidants (Wijffels et al. 2010; Guedes, Amaro, and Malcata 2011b; Mimouni et al. 2012).

Recent screening showed that the antioxidant capacity of microalgae is species specific (Custódio et al. 2012; Goiris et al. 2012; Assunção et al. 2016; Coulombier et al. 2020). A *Tetraselmis* sp. isolated in New Caledonia was identified as a promising species for antioxidant production (Coulombier et al. 2020) owing to its high capacity to inhibit lipid peroxidation, growth rate, and ease of culture. In addition, *Tetraselmis* spp. were also identified for their antioxidant potentials in other screening (Custódio et al. 2012; Goiris et al. 2012; Assunção et al. 2016). This genus is cosmopolitan and can be found in different types of ecosystems, from oceanic to freshwater and hypersaline habitats (Worden et al. 2004; Fon-Sing and Borowitzka 2016). Many *Tetraselmis* species have a high growth rate and dietary value of interest (e.g., polyunsaturated fatty acids, vitamins) for aquafeed formulation, fish, live feed, and shellfish nutrition (Thin et al. 1999; Ponis et al. 2003; Hemaiswarya et al. 2011; Cerezuela et al. 2012) thus it is a genus exploited in aquaculture (e.g., *T. chui*, *T. suecica*). Concerning biotechnological applications, this genus is known to have a high content of bioactive compounds with antioxidant properties such as carotenoids (Ahmed et al. 2014), polyunsaturated fatty acids (Custódio et al. 2012), water soluble polysaccharides (Dogra et al. 2017), phenolic compounds (Farahin et al. 2016; Gam et al. 2020) and vitamins (Brown et al. 1999). Depending on abiotic stressors, microalgae can induce the production of antioxidant molecules to protect its organelles against ROS. This ability can then be used to enhance the production of specific metabolites of interest (Chen, Zheng, et al. 2017; Paliwal et al. 2017). Indeed, nutrient availability (Goiris, Van Colen, et al. 2015), light condition (Coulombier et al. 2020), pH and temperature (Guedes, Amaro, Pereira, et al. 2011) are abiotic factors that influence the antioxidant activity and productivity of microalgae. However, few studies assessed the effect of pH or CO<sub>2</sub>-induced acidification on microalgae antioxidant activity (Guedes, Amaro, Pereira, et al. 2011; Xia et al. 2018). Yet, pH and CO<sub>2</sub>-induced acidification affects dissolved inorganic carbon availability, intracellular acid base balance, structural

rearrangement of pigment systems, and therefore, may influence growth, carbon assimilation, energy demand to maintain the membrane electrochemical potential and enzyme activity, and intracellular oxidative stress (Goss and Garab 2001; Kramer et al. 2003; Milligan et al. 2009; Xia et al. 2018). Changes in carbon fixation will also modify the cellular concentration of ATP and NADPH, which in turn may modify photochemical processes and energy dissipation pathways (Takahashi and Murata 2005). To monitor these photochemical processes (mainly PSII), PAM fluorometry is a commonly used technique based on chlorophyll fluorescence which offers the advantage to be non-invasive (Krause and Weis 1991; Schreiber et al. 1995) and suitable in microalgal biotechnology to follow large scale culture fitness (Masojídek et al. 2010). This technique measure the light energy emitted from the light harvesting pigments associated with the process of photosynthesis. Briefly light energy absorbed by chlorophyll is either used by the photochemistry (photosynthesis), dissipated as heat (excess of energy) or re-emitted (fluorescence); consequently, by measuring the yield of fluorescence, information about the fitness of the PSII can be estimated (reviewed in Maxwell and Johnson 2000; Consalvey et al. 2005).

Culture conditions are modulating factors to which microalgae cell will respond by adjusting their physiology inducing modifications in growth, photosynthetic parameters, biomass composition and consequently antioxidant activity (Coulombier et al. 2020). In this study, we focus on the effects of pH using CO<sub>2</sub>-induced acidification on antioxidant activity and physiological responses of a tropical strain of *Tetraselmis* sp. produced in stirred closed photobioreactor operated in batch and in continuous culture. The overall objectives were to assess the effect of pH and culture mode on growth, photosynthetic parameters, and elemental composition to suggest marker processes of antioxidant activity of *Tetraselmis* sp. and to optimize production of biomass with high antioxidant activity.

### **3.4. Materials and methods**

#### **3.4.1. Microalgae culture**

The microalgae *Tetraselmis* sp. was isolated from tropical coastal seawater (New Caledonia) (Coulombier et al. 2020). The inoculum was cultured in a 250 mL Erlenmeyer flask with filtered seawater (salinity 35; 0.2 µm) enriched in Conway medium (Walne 1966). The cultures were exposed to a continuous light intensity of 190 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, aerated, and gently homogenized daily for 11 days.

### 3.4.2. Experimental culture conditions

Continuous and batch cultures were carried out in six 2.5 L stirred closed PBRs made of transparent polymethylmethacrylate (Jauffrais et al. 2013) and operated under the following conditions. The pH was regulated at 8.5 or 6.5 using automated CO<sub>2</sub> addition and the temperature was kept constant at 25°C. Temperature and pH conditions were set on an Arduino electronic card and followed with a Raspberry PI computer. The light was continuously provided on one side of the PBR using neon light tubes at 280 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A Rushton turbine was used to homogenize the culture medium at 80 rpm min<sup>-1</sup> and aeration was done by bubbling the culture with 0.2 μm filtered air (1 L min<sup>-1</sup>) administered using stainless steel tube. Prior inoculation, photobioreactors were sterilized with peroxyacetic acid at 5 ppm for 20 min and rinsed twice with filtered seawater (0.2 μm). The photobioreactors were then inoculated with 125 mL of *Tetraselmis* sp. in filtered seawater enriched with 1 mL L<sup>-1</sup> of Conway medium (Walne 1966) to reach an initial concentration of ~1.5 x 10<sup>5</sup> cell mL<sup>-1</sup>. The dilution rate of continuous cultures was fixed and maintained at 0.5 day<sup>-1</sup> after the fourth day of culture.

### 3.4.3. Photosynthetic parameters

Maximum PSII quantum efficiency (Fv/Fm), rapid light curves (RLC) and Non-Photochemical Quenching (NPQ) were measured daily to provide an overview of the physiological state of *Tetraselmis* sp..

Photosynthetic parameters were measured with a PAM fluorometer (AquaPen-C AP 110-C of Photon Systems Instruments, Czech Republic) with a blue light at 455 nm. A dark adaptation of 1 hour was performed before all the measurements. Fv/Fm was measured with a saturating pulse (3000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and according to the equation 1 (Schreiber et al. 1995):

$$\frac{Fv}{Fm} = \frac{Fm - F0}{Fm}, \quad (1)$$

where Fv is variable fluorescence, Fm is maximum fluorescence and F0 is the dark-adapted minimum fluorescence yield.

The rapid light curves were performed with seven incremental irradiances steps (10; 20; 50; 100; 300; 500 and 1000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) of 60 s. The phytoplankton physiological parameters were estimated by adjusting the model by Platt et al. (1981) to the experimental data:

$$rETR(I) = rETR_{max} \times \left( 1 - e^{\left( -\alpha \times \frac{I}{rETR_{max}} \right)} \right), \quad (2)$$

where  $rETR_{max}$  (AU) is the maximum relative electron transport rate,  $\alpha$  the initial slope of the RLC at limiting irradiance and  $E_k$  the light saturation index ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $E_k = rETR_{max} / \alpha$ ).

NPQ induced by the rapid light curve was calculated according to the Stern Volner NPQ (Williamson et al. 2018) and according to the following equation:

$$NPQ_{induc} = \frac{F_m - F_m'}{F_m'} \quad (3)$$

where  $F_m$  is the maximum fluorescent yield and  $F_m'$  the maximum fluorescent yield in actinic light measured at the final RLC step.

NPQ was also measured to assess the recovery of *Tetraselmis* sp. reaction centers to 5 successive light pulses of 60 s with a saturating light of 3 000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 3 dark recovery phases of 88 s.

Using the acquired data, the relative quantum efficiency (Williamson et al. 2018) was calculated to allow comparison and assess recovery dynamics between the two pH conditions:

$$RQE = \frac{F_q' + F_m'}{F_v + F_m} \times 100 \quad (4)$$

where  $F_q'$  is the fluorescence quenched in actinic light ( $F_q' = F_m' / F'$ ),  $F'$  is the fluorescent yield in actinic light.

#### 3.4.4. Cell growth measurements

Cell growth was followed daily by optical density at 680 nm to measure pigment absorption (chlorophyll *a*), at 800 nm for cell compounds absorption and by counting cells using Malassez hemocytometer under a Leica DM750 microscope (x20) (Leica Microsystems, Germany).

For the batch cultures, using the growth kinetics, a Gompertz model (Equation 5) was fitted to the data (Jauffrais et al. 2017) to assess the maximum growth rate ( $\mu_{max}$  in  $\text{day}^{-1}$ ), the maximum cell concentration ( $\alpha$  expressed in  $\ln(C_t/C_0)$  with  $C_t$  and  $C_0$  in  $\text{cell mL}^{-1}$ ) and the latency time ( $\lambda$  in day, if present) using MatLab software:

$$F(t) = \alpha \times \exp(-\exp(\mu_{max} \times \exp(1)/\alpha \times (\lambda - t) + 1)) \quad (5)$$

#### 3.4.5. Sampling for elemental composition, nutrient and antioxidant analyses

For the batch cultures, approximately 500 mL of culture medium at the beginning of the stationary phase (day 6), and the 2 liters left in late stationary phase (day 18) were collected in each PBR for analyses.

For the continuous cultures, in each PBR and at steady states (i.e., less than 10 % variation of cellular concentration and absorbance during at least three days) 1.25 L was collected daily and over three days for analyses at pH 8.5 and 6.5 respectively.

➤ **Elemental analysis**

All the equipment used for handling was placed in a furnace at 400 °C for 4 hours to avoid carbon or nitrogen contamination. Aliquots (3, 4 or 5 mL) of culture medium were filtered through pre-combusted glass fiber filters (1.2 µm, Whatman GF/C), dried at 70 °C for 24 h, placed in pre-combusted glass tubes and kept at -20 °C until analysis. The samples were analyzed using an elemental analyzer (SERCON Integra 2, United Kingdom). C:N ratio was calculated by dividing cell carbon content (QC) by cell nitrogen content (QN) to assess nitrogen and carbon status of *Tetraselmis*.

➤ **Residual NO<sub>x</sub> and PO<sub>4</sub> analysis**

Approximatively 10 mL of the culture medium were filtered through 0.22 µm syringe filters in a 15 mL falcon tubes and kept at -20 °C until NO<sub>x</sub> (NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>) and PO<sub>4</sub> analysis. The nutrients were analyzed using a continuous-flow auto-analyzer (AA3 Seal Analytical, United Kingdom).

➤ **Antioxidant activity analysis**

The leftover of culture was collected by centrifugation (4500 rpm, 5 min, 4°C), lyophilized and kept at -80°C until extraction. Freeze dried biomass of each sample (50 mg) was first grounded using a pestle and a mortar in the dark at room temperature and suspended in 5 mL of methanol/dichloromethane mixture (50:50 v/v). Then, the extracts were submitted to ultrasound for 10 minutes in an ice bath, and were filtered. This process was repeated until the biomass became colorless, then the extracts were pooled, dried under a steam of nitrogen, and stored at -80°C until antioxidant analysis using lipid peroxidation inhibition assay (TBARS assay). The method adapted from Ahmed et al. (2015) was applied on *Tetraselmis* sp. extracts (Coulombier et al. 2020). Briefly, Fe-ascorbate system was used for oxidation catalysis and linoleic acid as unsaturated fatty acid. Linoleic acid (0.2 mL) was emulsified with Tween 20 (0.4 mL) and phosphate buffer (19.4 mL, 20 mM, pH 7.4). Microalgae dried extracts (1.25 to 200 µg mL<sup>-1</sup>) or standards (0.03 to 5 µg mL<sup>-1</sup>) were resuspended in 0.5 mL of ethanol. Then phosphate buffer (0.6 mL), ascorbic acid (0.2 mL, 0.01%), FeSO<sub>4</sub> (0.2 mL, 0.01%), and linoleic emulsion (0.5 mL) were added successively and the mixture was incubated at 37°C for 24 h. Subsequently, the oxidation was stopped by mixing 0.4 mL of the extract with butylated hydroxytoluene (BHT) (0.04 mL, 0.4%) and then 0.44 mL of a solution of thiobarbituric acid

(TBA, 0.8%) and trichloroacetic acid (TCA, 4%) was added. The samples were then placed at 100°C for 30 minutes, cooled and centrifuged. The absorbance of the supernatant was then measured at 534 nm. The percentage of inhibition of linoleic acid peroxidation and inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) values were finally calculated (Coulombier et al. 2020).

### 3.4.6. Data analysis

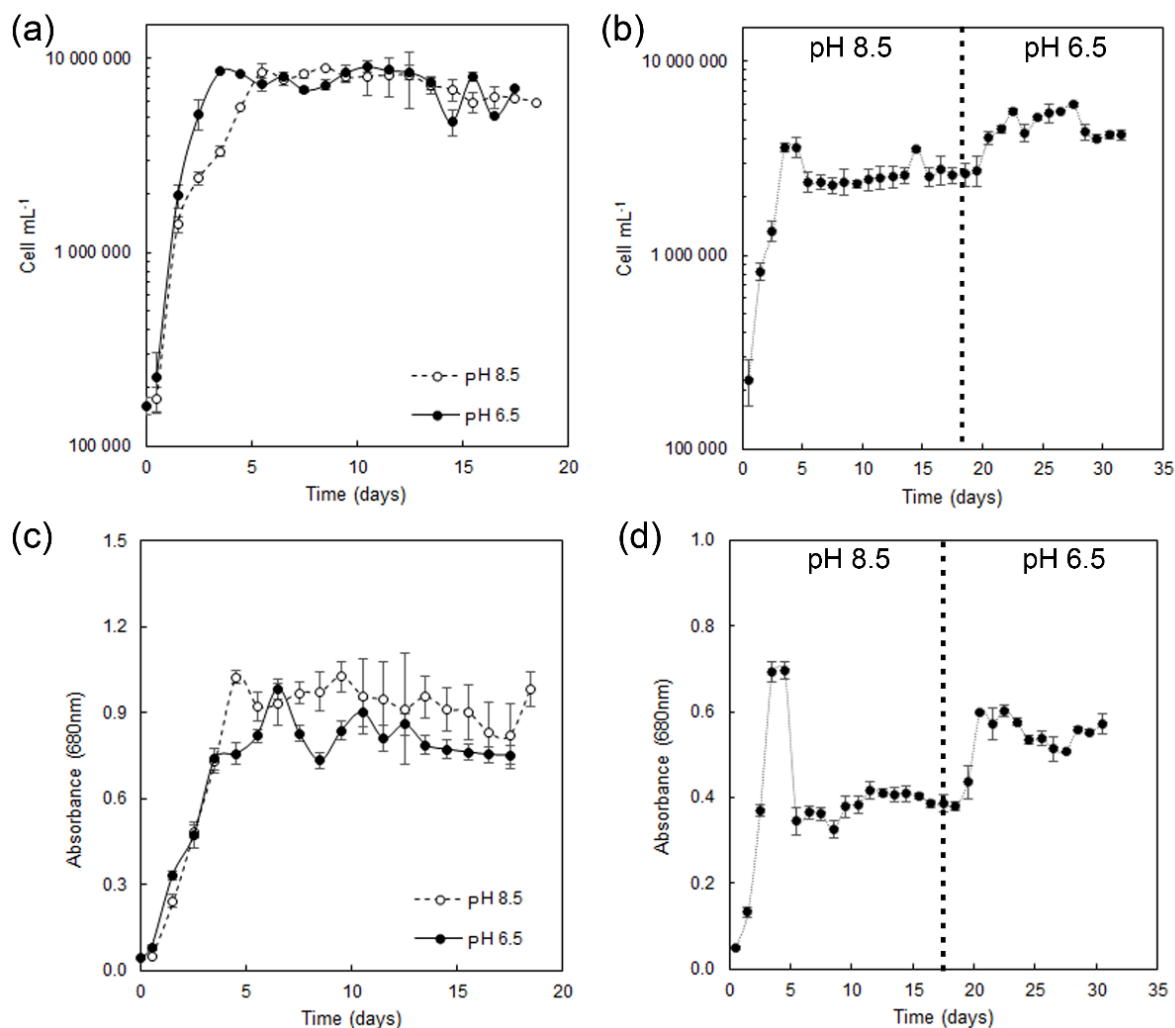
Data are expressed as mean ± standard error (SE). After testing for homogeneity of variance and normality (test Kolmogorov-Smirnov), statistical analyses to assess differences among treatments consisted of a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's LSD test, or of Kruskal–Wallis tests. A general linear model was also used to assess differences between treatments, sampling days, and time points generated by repeated NPQ measurement during the NPQ induction by actinic light and dark recovery period. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

Additionally, to analyze the potential influence of experimental factors (pH, mode of culture), photophysiological state, nutrients and elemental quota on antioxidant activity (IC<sub>50</sub>), a Principal Component Analysis (PCA) was performed. All statistical data analyses were carried out using Statgraphics Centurion XV.I (StatPoint Technologies, Inc., United States).

## 3.5. Results

### 3.5.1. Growth performances

Low pH had a significant influence on the growth ( $\mu_{max}$ , Table 12) of *Tetraselmis* sp. cultured in batch as  $\mu_{max}$  increased from  $1.48 \pm 0.16 \text{ day}^{-1}$  at pH 8.5 to  $2.45 \pm 0.18 \text{ day}^{-1}$  at pH 6.5, but the latency time ( $\lambda$ ) was slightly higher at low pH ( $0.44 \pm 0.04 \text{ day}$ ) than at 8.5 ( $0.18 \pm 0.03 \text{ day}$ , Table 12). However, the maximum concentration ( $C_{max}$ ) was similar between the two conditions,  $7.10 \pm 0.02 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  at pH 8.5 and  $7.52 \pm 0.02 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  at pH 6.5 (Table 12 and Figure 36a and c). In continuous culture at pH 8.5, the steady state was maintained from day 6 to 19 at a cell concentration around  $2.3\text{-}2.8 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ . The cell concentration quickly raised to  $4.0\text{-}5.5 \text{ cells mL}^{-1}$  at pH 6.5 but cell concentration and absorbance at steady state were less stable than at pH 8.5 (Figure 36b and d).



**Figure 36.** Cell concentration in  $\text{Cell mL}^{-1}$  (a), (b), absorbance at 680 nm (c), (d) of *Tetraselmis* sp. cultured in batch (left panels) and continuous (right panels) cultures in PBRs at pH 8.5 and 6.5 over time (days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3)

**Table 12.** Cell growth parameters, maximum growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ), latency time ( $\lambda$ ) and maximum cell concentration ( $C_{\text{max}}$ ) of *Tetraselmis* sp. cultured in PBRs in batch culture at pH 8.5 and 6.5. Data are calculated using a Gompertz model and expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3). Differences were considered significant at  $p < 0.05$

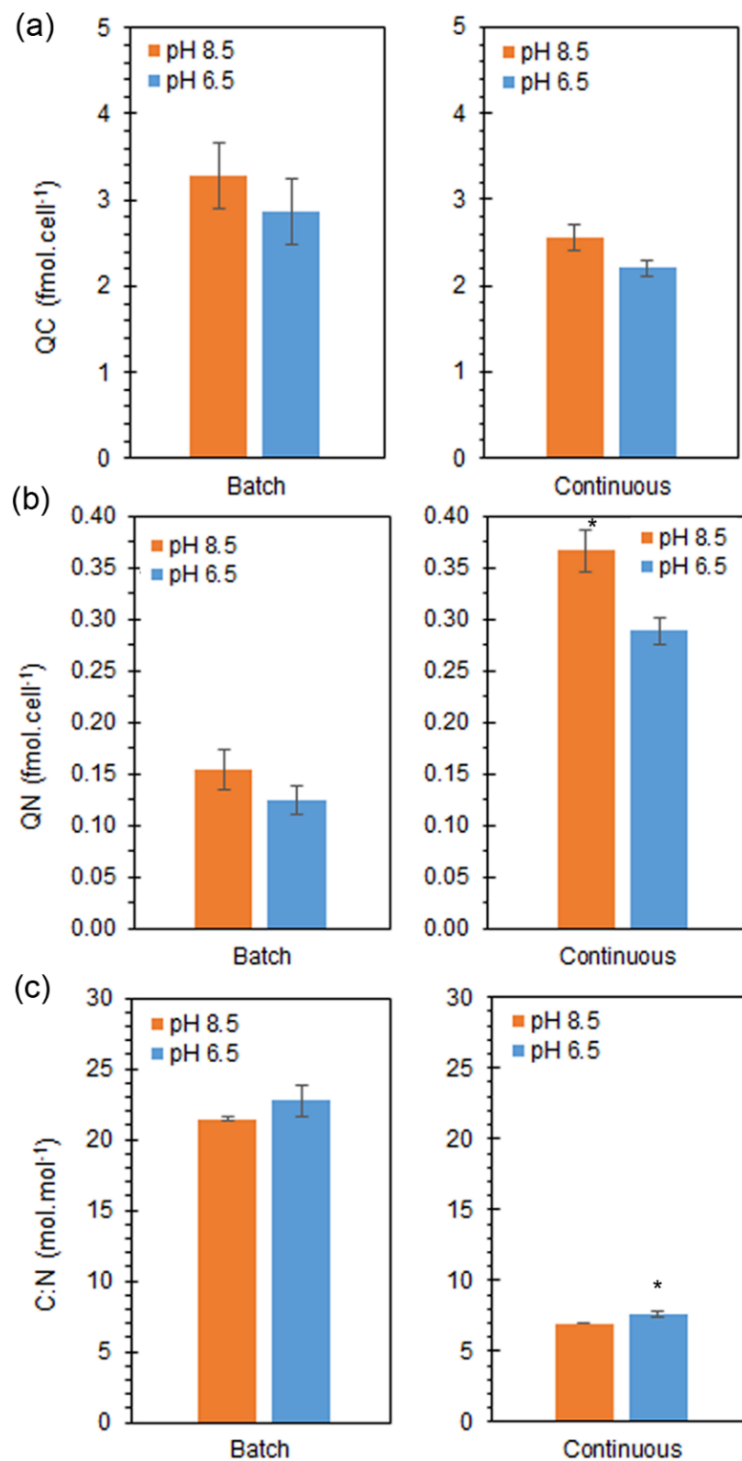
Batch culture	pH 8.5	pH 6.5	F-ratio	P ( $\alpha=0.05$ )
$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{day}^{-1}$ )	$1.48 \pm 0.16$	$2.45 \pm 0.18$	15.74	<b>0.02</b>
Lambda (day)	$0.18 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.04$	22.57	<b>0.01</b>
$C_{\text{max}}$ ( $\times 10^6$ cells $\text{mL}^{-1}$ )	$7.10 \pm 0.83$	$7.51 \pm 0.21$	2.11	0.22
Adjusted $R^2$	$0.97 \pm 0.01$	$0.97 \pm 0.01$	-	-



### 3.5.2. Elemental and residual nutrient analyses

The cell carbon content (QC) was not significantly affected by pH ( $F_{1,25}=2.16$ ,  $P=0.16$ ); whereas, the mode of culture (batch *vs* continuous culture) had a significant effect on the carbon cell quota ( $F_{1,25}=6.97$ ,  $P=0.015$ ), with lower QC in continuous culture at steady state than in batch culture at stationary phase (Figure 37a). The cell nitrogen content (QN) was affected by both pH ( $F_{1,25}=6.96$ ,  $P=0.015$ ) and the mode of culture ( $F_{1,25}=86.91$ ,  $P < 0.001$ ), with higher QN in continuous culture and particularly at pH 8.5 ( $0.37 \pm 0.6$  fmol cell<sup>-1</sup>, Figure 37b). The C:N ratio (Figure 37c) was thus significantly lower in continuous culture compared to batch culture ( $F_{1,25}=670$ ,  $P < 0.001$ ), but significant differences between pH were only observed in continuous culture ( $F_{1,16}=7.26$ ,  $P=0.017$ ).

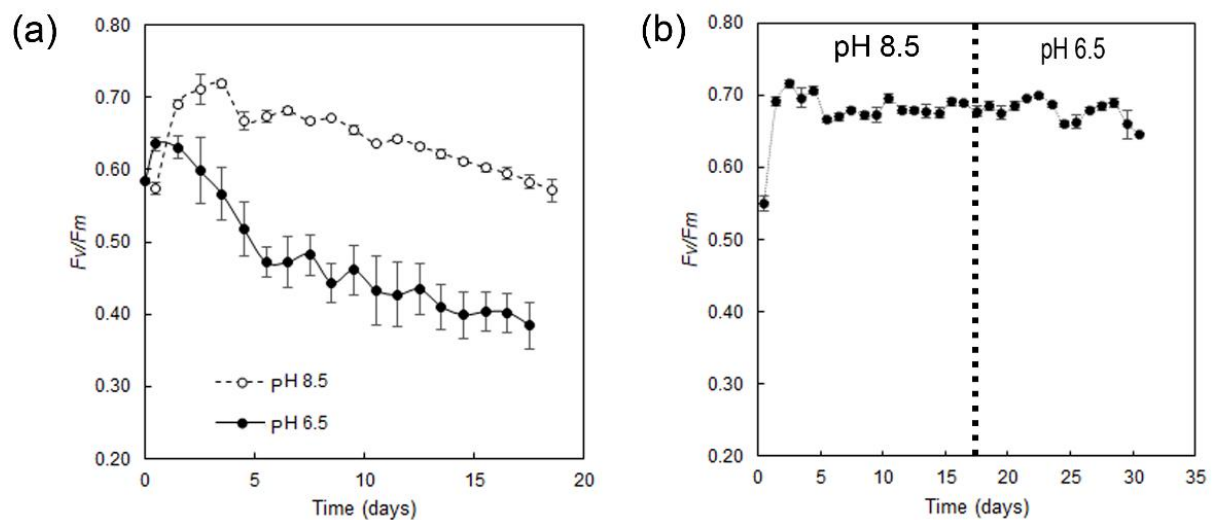
Dissolved NO<sub>x</sub> and phosphate persisted in the medium throughout all experiments, but NO<sub>x</sub> concentration was low ( $0.60 \pm 0.07$  μmol L<sup>-1</sup>) indicating N-limitation; whereas, phosphate was always higher than NO<sub>x</sub> indicating no P-limitation ( $1.98 \pm 0.72$  μmol L<sup>-1</sup>).



**Figure 37.** Carbon cell quota (fmol cell<sup>-1</sup>) QC (a), nitrogen cell quota QN (fmol cell<sup>-1</sup>) (b), C:N (Carbon:Nitrogen) ratio (c) of *Tetraselmis* sp. in batch culture at stationary phase and in continuous culture at steady state at pH 8.5 and 6.5. \* indicates significant differences between conditions (P-value<0.05). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 6 in batch and 12 in continuous culture).

### 3.5.3. Photosynthetic parameters calculated from RLCs

The Maximum PSII quantum efficiency ( $F_v/F_m$ , Figure 38a) in batch cultures started at  $0.57 \pm 0.01$  and quickly reached its highest value after one day of culture at pH 6.5 ( $0.63 \pm 0.02$ ), and after three days of culture at pH 8.5 ( $0.72 \pm 0.00$ ). Then  $F_v/F_m$  decreased regularly until the end of the experiment; however, a faster decrease was observed at pH 6.5 ( $0.38 \pm 0.03$  at the end) than at pH 8.5 ( $0.57 \pm 0.02$ ). In continuous culture, no differences were observed between the two conditions, once steady state was reached,  $F_v/F_m$  remained stable around 0.66 from day 5 to the end of the experiment (Figure 38b).



**Figure 38.** Maximum quantum light utilization efficiency of photosystem II (PSII,  $F_v/F_m$ ) of *Tetraselmis* sp. in batch (a) and continuous (b) cultures in PBRs at pH 8.5 and 6.5 over time (days). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 3$ ).

Four other photosynthetic parameters were followed over time and calculated from the RLCs:  $rETR_{max}$  (relative maximum electron transport rate),  $E_k$  (light saturation coefficient in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $\alpha$  (maximum light utilisation coefficient for photosystem II), and NPQ induc (Non-Photochemical Quenching induced during the RLC).

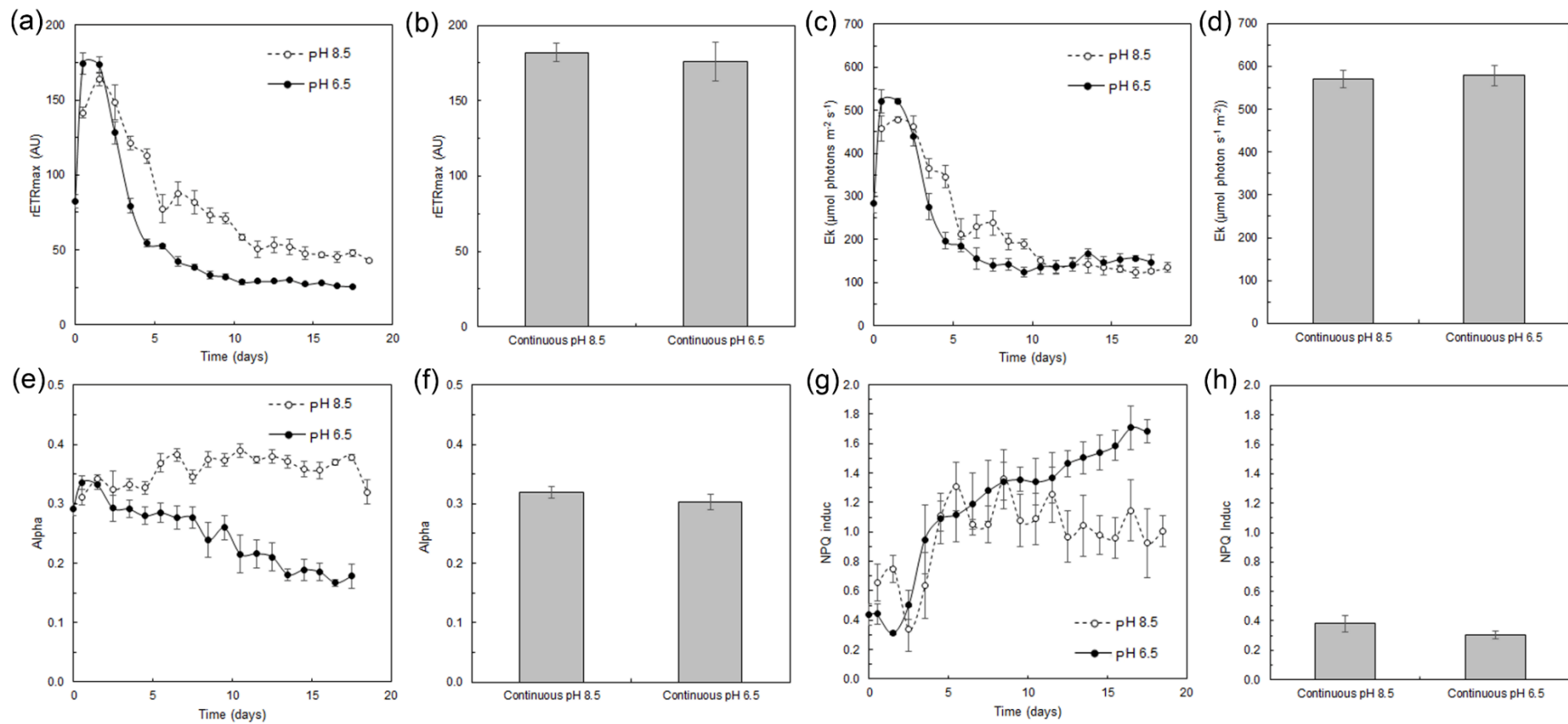
In batch culture, the highest  $rETR_{max}$  ( $174.4 \pm 7.2$  AU) was measured at pH 6.5, during the exponential growth phase (Figure 39a). At pH 8.5 a lower  $rETR_{max}$  was found ( $163.8 \pm 4.1$  AU) but a similar trend was observed. In both conditions,  $rETR_{max}$  declined sharply during the linear growth phase and slightly at the stationary phase. Moreover, the decline was significantly steeper at low pH than at pH 8.5 (Figure 39a and Table 13). In continuous culture,  $rETR_{max}$  was stable and comparable under both conditions and reached values that were

similar to the highest one measured in batch culture,  $181.9 \pm 6.2$  and  $176.0 \pm 12.8$  AU at pH 8.5 and 6.5, respectively (Figure 39b).

In batch culture,  $E_k$  increased quickly to reach a maximum during the exponential growth phase followed by bi-phasic decrease, a sharp one during the linear growth phase that slowly stabilized reaching the stationary phase (Figure 39c). The highest value was reached at day 2 at pH 6.5 ( $521.7 \pm 5.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and at day 3 at pH 8.5 ( $478.5 \pm 5.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). During the stationary phase  $E_k$  decreased to  $147.5 \pm 16.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and  $134.5 \pm 11.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at pH 6.5 and 8.5, respectively. Contrary to the batch culture, in continuous culture,  $E_k$  stayed stable and similar over time and between conditions, at  $570\text{-}578 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figure 39d).

Concerning the maximum light utilization coefficient ( $\alpha$ , Figure 39e), it fluctuated between  $0.31 \pm 0.01$  to  $0.39 \pm 0.01$  at pH 8.5, while it declined until  $0.18 \pm 0.02$  from the end of exponential growth phase to the end of the experience at pH 6.5. Similar  $\alpha$  (0.32-0.30) were calculated in continuous culture at pH 8.5 and 6.5 (Figure 39f).

Non-Photochemical Quenching induced by the RLCs (NPQ induc, Figure 39g) was variable during both growth phases but kept increasing at pH 6.5 from day 2 to the end of the experiment ( $1.68 \pm 0.08$  on day 18), whereas at pH 8.5, once the stationary phase was reached, the NPQ induc stabilized between  $0.92 \pm 0.23$  -  $1.31 \pm 0.17$ . Similarly, to the other calculated photophysiological parameters, no differences were found in continuous culture (0.38-0.31, Figure 39h).



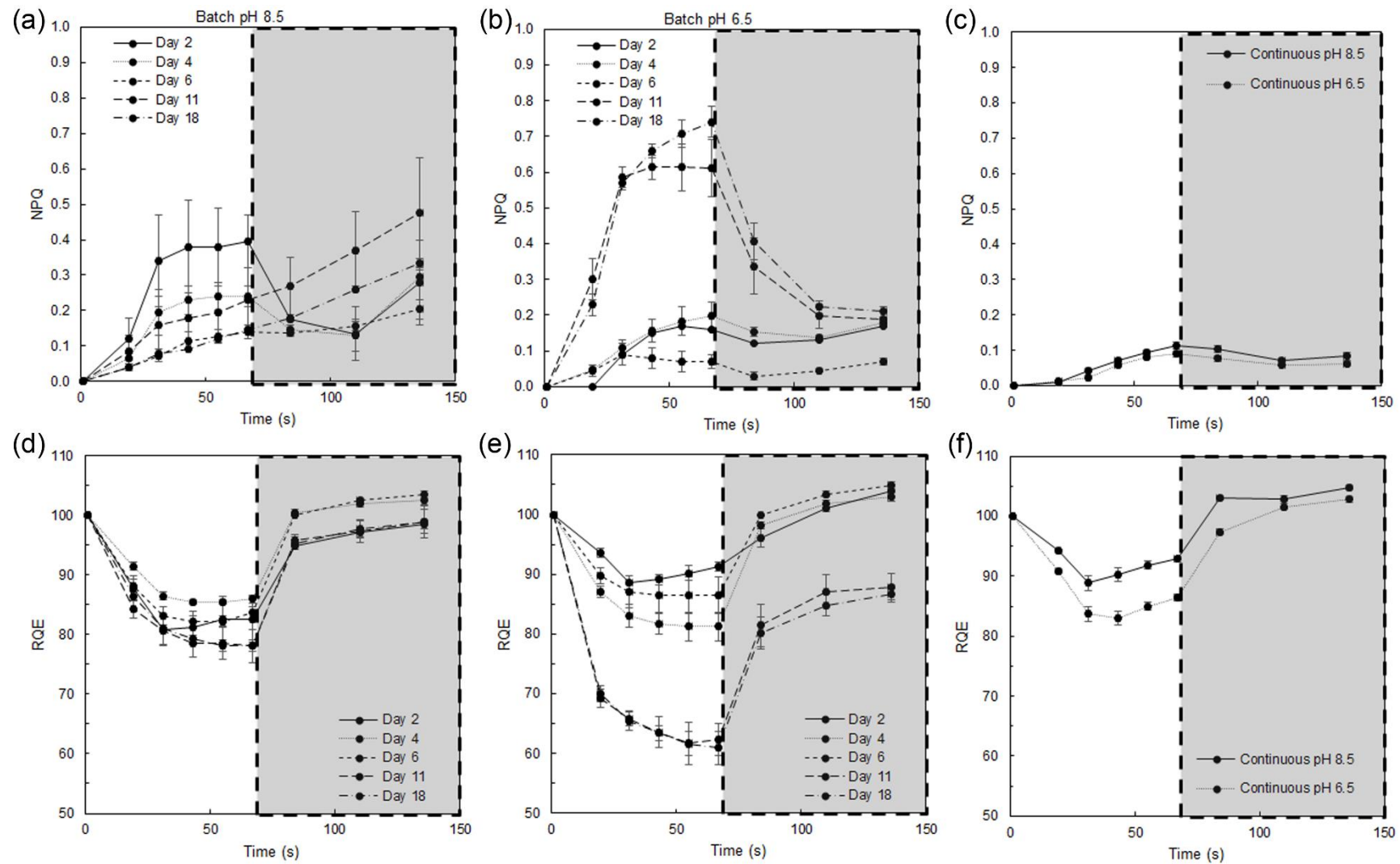
**Figure 39.** Photosynthetic parameters obtained from rapid light curves carried out on *Tetraselmis* sp. in batch (a, c, e, g) and continuous (b, d, f, h) cultures in PBRs at pH 8.5 and 6.5. Maximum electron transport rate rETRmax in AU (a), (b), light saturation coefficient Ek in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (c), (d), maximum light utilization coefficient for photosystem II A (e), (f), Non-Photochemical Quenching induced during RLC NPQ induc. (g), (h). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE, n = 3)

**Table 13.** Results of the statistical analysis on photosynthetic parameters obtained from rapid light curves carried out on *Tetraselmis* sp. in batch (General linear model) and continuous cultures (Kruskal Wallis test) in PBRs at pH 8.5 and 6.5. Fv/Fm, Maximum quantum light utilization efficiency of Photosystem II (PSII); rETRmax, maximum electron transport rate in AU; Ek, light saturation coefficient in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Alpha, maximum light utilisation coefficient for photosystem II; NPQ induc, Non-Photochemical Quenching induced during RLC. Values are significantly different when  $P < 0.05$ .

Batch culture	pH F-ratio	pH P-value	Time F-ratio	Time P-value
Fv/Fm	283.84	<0.001	6.63	<0.001
rETRmax	99.23	<0.001	61.30	<0.001
alpha	171.3	<0.001	1.47	0.11
Ek	6.44	<0.05	50.30	<0.001
NPQ induc	16.11	<0.001	6.87	<0.001
Continuous culture	pH 8.5	pH 6.5	P-value	
Fv/Fm	$0.71 \pm 0.01$	$0.67 \pm 0.03$	<0.05	
rETRmax	$181.90 \pm 6.20$	$176.02 \pm 12.80$	0.56	
alpha	$0.32 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.01$	0.56	
Ek	$570.62 \pm 19.83$	$578.62 \pm 24.47$	0.70	
NPQ induc	$0.38 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.03$	0.72	

#### 3.5.4. Photosynthetic parameters calculated from NPQ data

In batch culture, five days were monitored (Figure 40) to assess photosynthetic recovery over time. Relative Quantum Efficiency (RQE) was calculated from Non-Photochemical Quenching (NPQ) data measured during the exponential growth phase (day 2), the linear growth phase (day 4) and during early to late stationary phase (days 6, 11, 18). The NPQ and RQE showed significant differences owing to pH, sampling day and time (Figure 40a, b, d and e and Table 14). However, the magnitude of NPQ induction and recovery was greater at pH 6.5 during stationary phase (day 11 and 18). Furthermore, the RQE decrease was clearly enhanced over the induction period at pH 6.5 at day 11 and 18 (e.g.,  $60.9 \pm 2.8$  on day 18,  $86.5 \pm 3.0$  on day 6; Figure 40e) with an incomplete recovery during the dark recovery period compared to the other condition and sampling days. Interestingly, in continuous culture, NPQ and RQE curves showed similar trends during the induction and dark recovery periods but significant differences were observed (Table 14). The NPQ and RQE had lower values at pH 6.5 than at pH 8.5 (Figure 40c and f), and the magnitude of the RQE decrease during the induction period was higher and with a slower recovery at pH 6.5.



**Figure 40.** Non-Photochemical Quenching (NPQ) over the induction (white background) and dark recovery (grey background) **(a), (b), (c)**, Relative Quantum Efficiency (RQE) **(d), (e), (f)** of *Tetraselmis* sp. in batch (days 2, 4, 6, 11, 18) and continuous cultures (the two steady states) in PBRs at pH 6.5 and 8.5. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 3$ )

**Table 14.** Results of the general linear model analysis on Non-Photochemical Quenching (NPQ) and Relative Quantum Efficiency (RQE) of *Tetraselmis* sp. in batch (sampling day 2, 4, 6, 11 and 18) and continuous cultures (steady states) in PBRs at pH 6.5 and 8.5 over the induction and dark recovery (Time). Values are significantly different when  $P < 0.05$

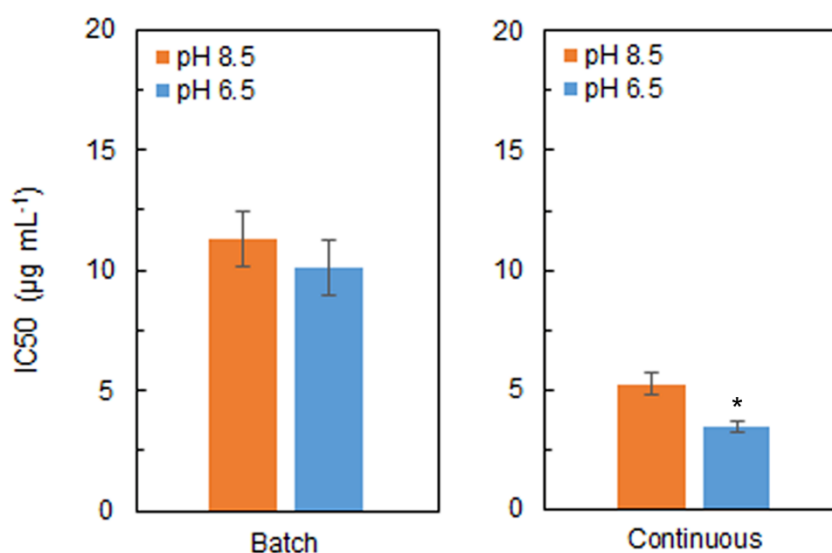
Batch culture	NPQ		RQE	
	F-ratio	P-value	F-ratio	P-value
A: pH	8.41	<0.01	27.57	<0.001
B: Sampling Day	31.1	<0.001	42.37	<0.001
C: Time	19.17	<0.001	60.62	<0.001
A*B	27.95	<0.001	22.66	<0.001
A*C	5.38	<0.001	0.58	0.79
A*B*C	3.26	<0.001	0.48	0.97

Continuous culture	NPQ		RQE	
	F-ratio	P-value	F-ratio	P-value
A: pH	17.3	<0.01	22.91	<0.01
B: Time	47.68	<0.001	28.98	<0.001

### 3.5.5. Antioxidant activity and elemental and residual nutrient analyses

TBARS assay measures the capacity of *Tetraselmis* sp. extracts to inhibit the chain reaction of lipid peroxidation initiated by the ferrous-ascorbate system. In batch culture, no differences were observed between both pH conditions, but a higher inhibition of lipid peroxidation was observed at low pH in continuous culture. In addition, differences were observed between batch and continuous culture. The best  $IC_{50}$  were obtained in continuous culture at pH 6.5, ( $3.44 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Figure 41 and Table 15).



**Figure 41.** Evolution of the antioxidant activities ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of *Tetraselmis* sp. extracts in batch culture at stationary phase and in continuous culture at steady state at pH 8.5 and 6.5. \* indicates significant differences between conditions ( $P < 0.05$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 6$  in batch and 12 in continuous culture). Reference compounds trolox ( $IC_{50} = 0.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and  $\alpha$ -tocopherol ( $IC_{50} = 1.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ )



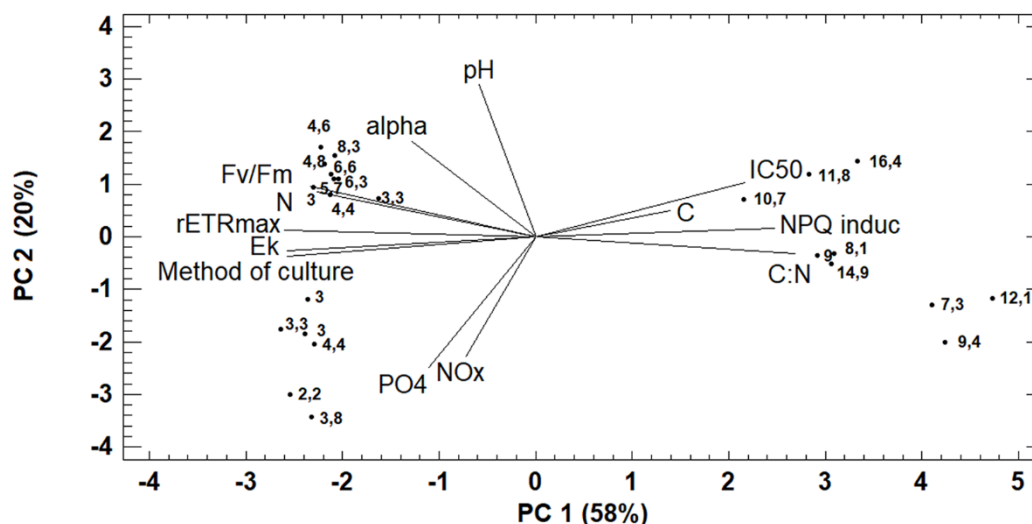
**Table 15.** Results of the multifactorial and single ANOVAs to assess the effect of pH, sampling day (early and late stationary phase), and culture systems (batch vs continuous cultures) on antioxidant activities ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of *Tetraselmis* sp.. Values are significantly different when  $P < 0.05$

$IC_{50}$		
Batch culture	F-ratio	P-value
A: Sampling Day	0.53	0.49
B: pH	0.52	0.49
A*B	1.8	0.22
$IC_{50}$		
Continuous culture	F-ratio	P-value
pH	6.65	0.02
$IC_{50}$		
Batch vs continuous culture	F-ratio	P-value
A: Culture system	58.62	<0.001
B: pH	3.4	0.08
A*B	0.21	0.65

### 3.5.6. PCA

Biotic and abiotic factors influencing antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) in all samples collected in batch and continuous culture at pH 6.5 and 8.5 were further analyzed through PCA (Figure 42). The first and second components accounted for 78% (58% and 20% respectively) of the variability amongst all samples.

The first component, with an Eigen value of 7,5, distinguished high and low  $IC_{50}$  values mainly based on the culture method (batch vs continuous) and on the photophysiological state of the PSII ( $F_v/F_m$ ,  $rETR_{max}$ , EK, NPQ induc) and elemental composition (QN and C:N ratio). The second component, with an Eigen value of 2.6, clearly distinguished  $IC_{50}$  values owing to the effect of pH, nutrient availability and of the capacity of the PSII to cope with low light (Alpha).



**Figure 42.** Results of the first and second component analysis influencing the antioxidant activity ( $IC_{50}$ , black dot with their associated values) of *Tetraselmis* sp.. Fv/Fm (Maximum quantum light utilization efficiency of Photosystem II), rETRmax (relative maximum electron transport rate), Ek (light saturation coefficient in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), alpha (maximum light utilisation coefficient for photosystem II), NPQ induc (Non-Photochemical Quenching induced during RLC), NOx (nitrate + nitrite) at sampling time, N and C (nitrogen and carbon quotas), C:N (carbon:nitrogen ratio).

## 3.6. Discussion

### 3.6.1. Growth performances and fitness

Responses of microalgae to  $\text{CO}_2$ -induced acidification are likely to be species specific, with potential “winners” and “losers” (Hinga 2002). *Tetraselmis* F. Stein (1878) is a cosmopolitan genus known to live in a wide variety of habitats (Worden et al. 2004; Fon-Sing and Borowitzka 2016). The species studied in this paper came from a coastal and transitional environment and is thus naturally exposed to sudden changes in pH (Wu et al. 2015). In culture, the effect of pH on a *Tetraselmis* sp. growth was studied in batch culture between pH 5.5 and 9.5 by Khatoun et al. (2014). This strain was found to grow in this large range of pH and was thus considered resistant to acidification of its culture medium. However, its optimum for growth, protein, lipid and carbohydrate content was situated between pH 7.5 and 8.5 in batch culture (Khatoun et al. 2014).

In the present study, we studied a *Tetraselmis* sp. cultured under two pH conditions, 6.5 and 8.5, and using two different modes of culture (batch and continuous) to assess the effect of  $\text{CO}_2$  acidification on biomass production and fitness, in addition to antioxidant activity. Low pH had a significant influence on growth in batch culture as the acidification of the culture medium enhanced *Tetraselmis* sp. specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) by a factor of 1.65. However, the

difference of pH only had a negligible effect on the latency time ( $\lambda$ ) and maximum concentration ( $C_{max}$ ), as small or no differences were observed for these parameters. Similarly, in continuous culture the switch from pH 8.5 to 6.5 significantly increased cell concentration by a factor of 1.6; however, looking at the data, the stability (cell concentration, DO) of the culture at steady state showed more variation at pH 6.5 than at pH 8.5. In the present study, the acidification was  $CO_2$ -induced. Even though  $pCO_2$  and dissolved inorganic carbon (DIC) were not monitored, chemical changes in seawater carbonate systems are known to occur through  $CO_2$  acidification including higher  $CO_2:HCO_3^-$  ratio and increase of DIC (Hinga 2002); the stimulated growth at pH 6.5 could be explained in two ways : (i) the increase in DIC provided more carbon for *Tetraselmis* for photosynthesis (Wu et al. 2010; Mackey et al. 2015) (ii) the downregulation of energetic cost  $CO_2$  concentrating mechanisms (CCMs) saved energy that may be allocated to support growth (Xiang et al. 2001; Hu et al. 2017). Indeed, marine microalgae assimilate inorganic carbon through the carboxylating enzyme Rubisco, which can only use  $CO_2$  as substrate. However, Rubisco have low affinity to  $CO_2$ , and growth can be limited at high pH where dissolved inorganic carbon is mostly find as  $HCO_3^-$  and  $CO_3^{2-}$ . Therefore, microalgae have developed CCMs to increase  $CO_2$  concentration in the proximity of Rubisco that require energetic investment (Giordano et al. 2005).

Microalgae biochemical composition is influenced by these physico-chemical variations of their culture medium, which is then reflected by their physiological state (Brown et al. 1997). This study clearly established that QC of *Tetraselmis* sp. was mainly affected by the mode of culture (batch vs continuous). Even if QC was always higher at pH 8.5 than at pH 6.5, this difference was not significant, whereas QN was affected by both pH decrease by  $CO_2$  acidification and mode of culture, as it was 3-times fold higher in continuous culture than in batch culture, and 1.3-times fold higher in culture at pH 8.5 than at pH 6.5. The C:N ratio was therefore 3.1-times lower in continuous culture compared to batch culture, and a significant difference between pH was only observed in continuous culture. The standard elemental stoichiometry is generally assumed to be 106 C: 16 N: 1 P (Redfield 1958); however, microalgae in culture have a wide flexibility in their C:N:P ratios depending on which nutrient was limited (Geider and La Roche 2002). In our study, this ratio was mainly affected by the mode of culture (batch vs continuous), as a higher carbon and a lower nitrogen quotas were observed in batch culture compared to continuous culture. Although nitrate concentration in the culture medium was comparable between stationary phase of the batch culture and steady state of the continuous culture, the continuous supply in nitrate (and other nutrients) in continuous

culture induced a higher QN and consequently a lower C:N. It results in typical C:N ratios of N-limited microalgae (>15) in batch culture and N-non limited microalgae (<10) in continuous culture (Rios et al. 1998). This effect on C:N ratio is a common observation owing to nitrate deficiency: a decrease in N products, such as chlorophyll and proteins (up to 25%), and an increase of carbon storage products, such as carbohydrates and eventually lipids (up to 50-60% AFDW for both) (Li et al. 2011; Jiang et al. 2012).

The responses to CO<sub>2</sub>-induced acidification also lead to different photophysiological fitness. The observations can be modulated depending on the mode of culture used to produce *Tetraselmis* sp.. Indeed, differences due to CO<sub>2</sub> acidification were enhanced in batch culture compared to continuous culture. Under both pH conditions in the batch culture, Fv/Fm increased during the exponential growth phase to stabilize and decrease once the stationary phase was reached. The Fv/Fm values are similar to those previously measured for eukaryotic microalgae cultivated in similar culture conditions (Barnett et al. 2015; Goiris, Van Colen, et al. 2015; Jauffrais et al. 2016; Menguy et al. 2020). Yet, Fv/Fm reached a lower maximum value and decreased faster at pH 6.5 compared to pH 8.5. However, this difference between quantum yields was not observed in continuous culture, where Fv/Fm remained stable over time independently of pH. The maximum quantum efficiency of the PSII reflects photochemical processes that depend upon chloroplast reactions that use ATP and reductants provided by photosynthesis. It may therefore be sensitive to cell energy metabolism and interactions between carbon and nitrogen assimilation. However, the use of Fv/Fm to monitor a photophysiological stress may be controversial, e.g., to monitor nutrient stress in balanced systems (Napoleon et al. 2013). Nevertheless, Fv/Fm is still a useful indicator of environmental or nutritional stress of microalgae grown in batch cultures (Gordillo et al. 2001; Beardall et al. 2001; Jauffrais et al. 2016) and is commonly used as an indicator to assess pH and/or CO<sub>2</sub> effect on photochemical processes of phytoplankton (Wu et al. 2015; Touloupakis et al. 2016). Our study seems to confirm these differences between balanced and unbalanced modes of culture. However, it also highlights that over time and under stable and balanced conditions (e.g., nutrients), *Tetraselmis* sp. is able to adapt and maintain its maximum quantum yield under CO<sub>2</sub>-acidified culture medium.

Similarly to Fv/Fm, the photosynthetic parameters calculated from the RLCs (rETR<sub>max</sub>, Ek, Alpha and NPQ induc) highlight differences between the two-pH conditions only in batch culture whereas no difference was observed in continuous culture. At pH 6.5 in batch culture, the lower Fv/Fm, rETR<sub>max</sub> and alpha, and the higher NPQ induc reflect an increased photo-

stress and corresponding suppression of photochemistry. This photo-stress might be related, in batch culture, to low pH stress coupled with N-limitation. Indeed, it is known that N-limitation gradually causes a decrease in photosynthetic pigments (Geider et al. 1993) the decline of PSII maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) (Cleveland and Perry 1987; Berges et al. 1996; Jauffrais et al. 2016) and the gradual inactivation of the protein D1 in PSII reaction centers owing to the reduced amount of N compounds to synthesize it. Protein D1 is an essential component in the electron transport chain and its turnover rate is frequently the limiting factor in PSII repair rates (reviewed in Campbell and Tyystjarvi (2012). In addition, N-limitation may reduce internal pH regulation mechanisms, to balance the external pH decrease, inducing acidification of intracellular compartments such as cytoplasm and chloroplast's stroma that could exerts numerous effects, in particular Rubisco inhibition (Miyachi et al. 2003; Solovchenko and Khozin-Goldberg 2013). It could explain the greater  $F_v/F_m$ ,  $rETR_{max}$  and  $\alpha$  decrease and the NPQ induc increase at pH 6.5 compared to pH 8.5 (Ptushenko and Solovchenko 2016).

Microalgae modulate their NPQ to tolerate and prevent long-lasting damage to photosynthetic components, owing to high or fluctuating levels of light, by dissipating the excess absorbed energy as heat (Lavaud and Kroth 2006; Lavaud et al. 2007; Wu, Roy, et al. 2012). However, excessive irradiance, either long or sudden, can reduce NPQ efficiency, leading to damage of the protein D1, decline in photosynthetic efficiency, chronic photoinhibition and production of ROS (Franklin and Forster 1997). The studied species was isolated in a costal and tropical area (New Caledonia) where photosynthetic active radiations are often above  $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In addition, this strain is not known to be highly sensitive to high light intensity (Coulombier et al. 2020). However,  $\text{CO}_2$ -induced acidification is known to influence NPQ and particularly to increase NPQ at high light level (Gao et al. 2012). NPQ and the relative quantum efficiency (RQE, e.i. the quantum efficiency as a proportion of  $F_v/F_m$ ) were thus monitored under actinic light induction and dark recovery phases to allow comparison of induction and recovery dynamics between the two pH conditions and culture modes (Williamson et al. 2018). In batch culture, both NPQ and RQE showed significant differences owing to pH, sampling day and time. However, the magnitude of NPQ induction and recovery was greater at pH 6.5 during stationary phase and the RQE decrease was clearly enhanced over the induction period with an incomplete recovery during the dark recovery period. These results in batch confirm the photo-stress triggered by both low pH and N-limitation.

In continuous culture, NPQ and RQE curves showed similar trends during the induction and dark recovery periods but significant differences were observed. The magnitude of the RQE decrease during the induction period was higher and with a slower recovery at pH 6.5. It

highlights that independently of N-limitation and culture mode, the CO<sub>2</sub>-induced acidification to pH 6.5 induced a higher sensitivity to photo-stress in *Tetraselmis* sp.. At pH 6.5, there is more dissolved CO<sub>2</sub> in the medium which may induce an intracellular acidification due to entry of CO<sub>2</sub> into the cell. Low internal pH is known to provoke inhibition of Rubisco which reduces consumption of NADPH and ATP and decrease electron sink from the photosynthetic electron transport chain (Miyachi et al. 2003; Ptushenko and Solovchenko 2016). In addition, NPQ (xanthophyll cycle and protonation of PsbS protein) is known to be triggered by acidification of the thylakoid lumen when chloroplasts are illuminated (Goss and Garab 2001; Kramer et al. 2003). It could explain the negative impact of CO<sub>2</sub> acidification on photophysiological parameters.

### 3.6.2. Antioxidant activity

All aerobic organisms have to deal with ROS. Furthermore, microalgae possess chloroplasts where ROS are formed via energy transfer from chlorophyll or via electron transfer. Indeed, ROS concentration controls the PSII activity and therefore photosynthesis and photoprotective responses (Foyer and Shigeoka 2011; Smerilli et al. 2017, 2019). Environmental stress, such as CO<sub>2</sub>-induced acidification (Bautista-Chamizo et al. 2018) or N-starvation (Zhang et al. 2013; Çakmak et al. 2015; Chokshi et al. 2017) are known to induce additional ROS production. An efficient intracellular network composed of enzymes and antioxidant molecules is thus required to balance and adjust intracellular ROS concentration (Mittler 2002; Foyer and Noctor 2005b). In addition, recent works on microalgae showed that a strong link exists between antioxidant molecules and photo-protective mechanisms (xanthophyll cycle and NPQ) in response to light (Cartaxana et al. 2013; Smerilli et al. 2017, 2019). In light of this data, we analyzed the effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification and mode of culture on antioxidant activity of *Tetraselmis*.

The bio-complexity of antioxidant molecules in microalgae requires the use of specific antioxidant assays with different mechanisms of action to evaluate their right antioxidant potential (Prior et al. 2005; Rodriguez-Amaya 2010; Carocho and Ferreira 2013; Coulombier et al. 2020). Different tests (e.g., TBARS, ORAC, DPPH and ABTS) were used in our previous study (Coulombier et al. 2020), with variable sensitiveness to different antioxidant compounds (e.g., PUFAs, carotenoids, phenolic compounds). We found that the TBARS assay, which measures the capacity of an antioxidant to inhibit the chain reaction of lipid peroxidation, was the best assay to assess the antioxidant activity of *Tetraselmis* sp. extracts (Coulombier et al. 2020). In this study, the best IC<sub>50</sub> were obtained with reference compounds trolox (0.24 µg mL<sup>-1</sup>) and α-tocopherol (1.30 µg mL<sup>-1</sup>); however, the IC<sub>50</sub> found in continuous culture at low pH

( $3.44 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was close to the  $\text{IC}_{50}$  of these reference compounds. In addition, antioxidant activity was improved by a factor of 4.5 compared to our previous results where  $\text{IC}_{50}$  of *Tetraselmis* sp. extracts were equal to 15.43 and  $22.77 \mu\text{g mL}^{-1}$  under low and high light respectively. Furthermore, the capacity of *Tetraselmis* sp. extracts to inhibit lipid peroxidation was more than seven times higher than other microalgal extracts, e.g., *Nitzschia* sp. ( $24.63 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and *Nephroselmis* sp. ( $31.40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Coulombier et al. 2020).

Considering TBARS assay, our previous results showed that carotenoids did not contribute to the antioxidant activity measured (Coulombier et al. 2020). Lipid peroxidation is known to be inhibited by phenolic compounds (Salah et al. 1995; Cho et al. 2003; Niki et al. 2005),  $\alpha$ -tocopherol, fatty acid compounds (Henry et al. 2002; Richard et al. 2008) and sterols (Gordon and Magos 1983; Yoshida and Niki 2003). However, phenolic compounds and  $\alpha$ -tocopherol are probably not the molecules involved in *Tetraselmis* sp. extract as no activities were found using DPPH and ABTS assays (Coulombier et al. 2020). Since *Tetraselmis* is a genus known for its high content in PUFAs (Brown et al. 1997) and sterols (Patterson et al. 1993) and as we used a mixture of MeOH/DCM similar to the one used for lipid extraction (Cequier-Sánchez et al. 2008), a high concentration of sterols or PUFAs in the extracts could explain our results on antioxidant activities (Custódio et al. 2012; Lv et al. 2015; Coulombier et al. 2020). However, it needs to be confirmed by a bio-guided fractionation of the extracts to identify antioxidant compound(s). Nevertheless, microalgae whole biomass or crude extract are often used for nutraceuticals or aquaculture preparations, thus it is necessary to optimize global antioxidant activity of the biomass instead of a specific antioxidant molecule.

We analyzed the potential influence of experimental factors (pH, mode of culture), photophysiological state, nutrients and elemental quota on antioxidant activity ( $\text{IC}_{50}$ ) with a PCA, the objective being to improve and monitor culture conditions for producing biomass with high antioxidant activity. The first component distinguished high and low  $\text{IC}_{50}$  values mainly based on the culture method (batch vs continuous) and on the photophysiological state of the PSII (Fv/Fm, rETR<sub>max</sub>, EK, and NPQ) and elemental composition (high QN and low C:N ratio); whereas, the second component clearly distinguished  $\text{IC}_{50}$  values owing to the effect of pH, of nutrient availability and of the capacity of the PSII to cope with low light (Alpha).

In addition to pH and culture mode, results revealed a strong link between the state of the PSII and the antioxidant activity of *Tetraselmis* sp.. The availability in dissolved N and P is also a key factor to improve antioxidant activity of *Tetraselmis* sp..

To sum up, a higher antioxidant activity (low  $\text{IC}_{50}$ ) is observed in continuous culture where nutrients availability is balanced and where the microalgae are in great photophysiological state.

However, these conclusions need to be taken with some care and further studies are necessary to clearly link PSII state with antioxidant molecules and activities to improve the use of PAM fluorometry to monitor microalgae for producing biomass with high antioxidant activity.

### **3.7. Conclusions**

This study provides evidence of the interactive effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification and nutrient availability on growth, photophysiological state of the PSII and antioxidant activity of *Tetraselmis* sp.. It also highlights the great potential of *Tetraselmis* sp. as an alternative source of natural antioxidant, as well as on the role of pH and nutrients as effective tools to enhance the production of biomass with high antioxidant activity. In addition, it suggests that PAM fluorometry might be used to monitor microalgae culture for antioxidant-rich biomass production.

### **3.8. Acknowledgments**

We would like to thanks Anne Desnues and Philippe Gérard from the LAMA (LABoratoire des Moyens Analytiques) (IRD, Nouméa) for the elemental and nutrient analyses.



---

## **Conclusions et perspectives**

---



Afin d'évaluer le potentiel des microalgues calédoniennes comme source d'antioxydants, cette thèse a poursuivi deux grands objectifs : (i) le criblage de l'activité antioxydante de microalgues isolées en Nouvelle-Calédonie et l'identification des métabolites responsables de l'activité et (ii) l'étude de l'influence des facteurs environnementaux sur l'activité antioxydante d'une sélection d'espèces afin d'optimiser la production d'antioxydants.

Une première étape de bio-prospection et d'isolement de microalgues locales par une méthode de « dilution-exclusion » a permis de constituer une souchothèque de microalgues à fort potentiel de croissance et adaptées aux conditions environnementales de la Nouvelle-Calédonie. Douze souches, appartenant à différents groupes taxonomiques et parmi les plus faciles à cultiver, ont ensuite été choisies dans cette souchothèque afin d'évaluer leurs propriétés antioxydantes.

## 1. Evaluation de l'activité antioxydante

Le criblage de l'activité antioxydante des microalgues présenté dans le chapitre 3 met en évidence quatre souches d'intérêt : l'extrait de *Chaetoceros* sp. présente une bonne capacité de neutralisation du radical peroxy (valeur ORAC de 190.3  $\mu\text{g}$  trolox équivalent  $\text{mg}^{-1}$ ) alors que l'extrait de *Tetraselmis* sp. permet d'inhiber efficacement la peroxydation des lipides ( $\text{IC}_{50}$  de 15.4  $\mu\text{g}$   $\text{mg}^{-1}$  avec le test TBARS). Les extraits de *Nephroselmis* sp. et *Nitzschia* sp. A sont actifs avec ces deux tests antioxydants (respectivement valeur ORAC de 188.3 et 179.7  $\mu\text{g}$  trolox équivalent  $\text{mg}^{-1}$  et  $\text{IC}_{50}$  de 31.4 et 24.6  $\mu\text{g}$   $\text{mg}^{-1}$  avec le test TBARS). Ainsi, un tiers des espèces testées lors de ce criblage ont montré une bonne activité antioxydante. Il serait donc intéressant d'évaluer l'activité antioxydante des autres espèces de la souchothèque AMICAL pour éventuellement identifier d'autres souches d'intérêt et peut-être discriminer des groupes phylogénétiques plus propices à exprimer des concentrations élevées en métabolites antioxydants.

Parmi les quatre souches présentant de fortes activités, deux d'entre elles paraissent plus prometteuses pour la production d'antioxydant : *Nephroselmis* sp. en raison de la présence de siphonaxanthine, un caroténoïde peu commun et présentant un intérêt en biotechnologie compte tenu de ses propriétés bioactives, et *Tetraselmis* sp. en raison des possibilités de montée en échelle, des essais de production pilote en raceway ayant montré sa facilité de culture en conditions extérieures. Ces souches ont donc été choisies pour étudier l'impact des paramètres de culture sur l'activité antioxydante. Les mesures d'activités antioxydantes réalisées ensuite (chapitre 4) ont conforté ce choix puisque la forte activité de neutralisation du radical peroxy

a été confirmée pour *Nephroselmis* sp., et l'activité d'inhibition de la peroxydation des lipides a été multipliée par quatre pour *Tetraselmis* sp..

Les résultats du criblage de l'activité antioxydante soulignent également la nécessité d'utiliser plusieurs tests avec différents mécanismes d'action pour prendre en compte la diversité des molécules impliquées dans l'activité antioxydante des microalgues. En effet, aucune des espèces testées dans cette étude n'a montré d'activité anti-radicalaire vis-à-vis des radicaux DPPH et ABTS et sans les résultats obtenus avec les tests ORAC et TBARS nous aurions pu conclure à une absence d'activité chez les douze microalgues testées.

Cependant, l'utilisation de méthodes chimiques *in vitro* pour la recherche d'activité antioxydante est une première étape nécessaire, mais qui devra être approfondie pour mieux connaître les mécanismes mis en jeu. En effet, ces méthodes sont basées sur la mise en évidence d'une réactivité chimique, mais ne prennent pas en compte les processus biologiques. Il sera donc essentiel de compléter les résultats obtenus avec des méthodes chimiques par des mesures utilisant des méthodes biologiques *in vitro* puis *in vivo*. L'activité antioxydante pourrait par exemple être évaluée sur un modèle cellulaire. Il existe différents tests antioxydants cellulaires qui peuvent se décliner sur plusieurs types de cellules selon l'application ciblée. Par exemple, des cellules de peau telles que les kératinocytes ou les fibroblastes sont souvent utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de produits destinés à des applications cosmétiques (Ratz-Lyko et al. 2012) tandis que des cellules humaines hépatiques, de côlon ou des érythrocytes sont utilisés pour des applications en santé humaine (Amorati and Valgimigli 2015). De plus, si l'activité biologique est confirmée, il faudra également valider l'absence de toxicité.

## 2. Identification des métabolites antioxydants

L'analyse pigmentaire des extraits lors du criblage de l'activité antioxydante met en évidence un lien entre l'activité de neutralisation du radical peroxy (test ORAC) et le contenu en caroténoïdes, plus particulièrement le contenu en xanthophylles. Ce lien a été confirmé pour *Nephroselmis* sp. dans le chapitre 4 où il a été montré que l'ensemble des caroténoïdes contribuait, de manière plus ou moins forte, à l'activité antioxydante de cette microalgue. La siphonaxanthine et/ou la néoxanthine semblent être les caroténoïdes qui contribuent le plus fortement à l'activité anti-radical peroxy. Une mesure de l'activité des pigments purs devrait permettre de déterminer si ces deux pigments contribuent de manière équivalente à l'activité de neutralisation du radical peroxy. Pour cela, il sera nécessaire de purifier la siphonaxanthine à partir de biomasse de *Nephroselmis* sp. car ce pigment n'est pas disponible sur le marché. Cette

souche constitue d'ailleurs une source intéressante de siphonaxanthine, par sa teneur élevée en comparaison des sources identifiées jusqu'à présent (macroalgues vertes). Ce pigment présente, outre ses propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoire, anti-obésité, anti-angiogénique et apoptotique (Ganesan et al. 2011; Li et al. 2015; Zheng et al. 2018; Manabe et al. 2020) ouvrant d'autres perspectives de valorisation pour *Nephroselmis* sp..

Les métabolites responsables de l'inhibition de la peroxydation des lipides (test TBARS) n'ont pas encore été identifiés. Il a été montré dans le chapitre 3 que les caroténoïdes ne contribuent pas à l'activité mesurée. De plus, l'absence de résultats avec les tests DPPH et ABTS permet de penser que les composés phénoliques, connus pour stopper la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides, ne sont pas impliqués non plus. Nous avons émis l'hypothèse que des acides gras ou des stérols pouvaient être responsables de l'inhibition de la peroxydation des lipides, mais cela reste à déterminer. Les molécules impliquées, notamment pour *Tetraselmis* sp., pourront être caractérisées par une approche métabolomique en reliant le profil métabolique et l'activité antioxydante.

### 3. Effets des conditions de culture

Les résultats présentés dans les chapitres 3 et 4 montrent que l'activité antioxydante des microalgues étudiées était fortement influencée par les conditions de culture.

Lors du criblage sur les douze espèces, il a été mis en évidence que l'intensité lumineuse impacte fortement l'activité antioxydante des microalgues mais différemment selon les espèces et les tests antioxydants. En effet, l'activité de neutralisation du radical peroxyde (test ORAC) est jusqu'à 2,4 fois plus importante pour sept espèces cultivées à une forte intensité lumineuse, alors que trois autres espèces présentent une activité plus faible (jusqu'à 2,5 fois) dans les mêmes conditions. A l'inverse, la majorité des espèces montrent une meilleure capacité d'inhibition de la peroxydation des lipides (test TBARS) lorsqu'elles sont cultivées à faible intensité lumineuse. L'activité est alors jusqu'à quatre fois plus importante pour huit espèces cultivées à une faible intensité lumineuse, tandis que l'activité de deux espèces est favorisée par une forte intensité lumineuse (augmentation jusqu'à deux fois). L'intensité lumineuse est donc un paramètre important pour orienter la production d'antioxydant vers un type d'activité et donc un type de molécule. Cependant, ces résultats soulèvent des questions sur les mécanismes impliqués dans la réponse du système antioxydant à l'intensité lumineuse et des liens qui existent avec la photophysiology. Il serait donc intéressant de mesurer l'impact de l'intensité lumineuse sur les paramètres photophysiology de chaque espèce en lien avec l'activité antioxydante.

Plusieurs paramètres de culture, connus pour influencer la composition biochimique des microalgues, ont ensuite été étudiés sur *Nephroselmis* sp. et/ou *Tetraselmis* sp. : la disponibilité en azote inorganique dissous, le mode de culture et le pH régulé par injection de CO<sub>2</sub> dans le milieu.

Les résultats présentés dans le chapitre 4 montrent l'importance de la disponibilité en azote inorganique dissous pour optimiser l'activité antioxydante des deux microalgues étudiées. En effet, lorsque la culture de *Nephroselmis* sp. n'est pas limitée par l'azote, le contenu en caroténoïdes, en particulier la siphonaxanthine, la néoxanthine et les pigments du cycle des xanthophylles, est jusqu'à 2.7 fois plus élevé que dans une culture carencée en azote. L'activité antioxydante de *Nephroselmis* sp. étant liée au contenu en caroténoïdes, celle-ci est multipliée par plus de deux entre une culture carencée en azote et une culture non limitée. Par ailleurs, la croissance étant supérieure lorsque l'azote n'est pas limitant, la productivité en caroténoïdes est également meilleure lorsque les cellules ne sont pas soumises à un stress azoté.

De même, la capacité d'inhibition de la peroxydation des lipides de *Tetraselmis* sp. est deux fois supérieure pour une culture non carencée en azote (culture en continu) par rapport à une culture limitée en azote (batch en phase stationnaire). Il est donc essentiel de maintenir un niveau suffisant d'azote dans le milieu pour maximiser l'activité antioxydante de ces deux souches de microalgues. Des alternatives aux modes de cultures utilisés dans le chapitre 4 (batch et continu) pourraient être testées afin d'améliorer la productivité :

- Un mode semi-continu pour lequel une partie de la culture serait récoltée et remplacée par du milieu neuf avant la mise en place d'une carence en azote.
- Un mode continu avec des concentrations plus importantes en azote inorganique dans le milieu de culture neuf apporté et/ou différents taux de dilution.

La régulation du pH par injection de CO<sub>2</sub> est également un paramètre à considérer pour optimiser la production d'antioxydants par *Tetraselmis* sp.. La baisse du pH de 8,5 à 6,5 en culture continue permet une multiplication par 1,4 de la capacité d'inhibition de la peroxydation des lipides. Même si l'effet de l'acidification sur l'activité antioxydante est moins prononcé que l'effet de l'intensité lumineuse ou de la disponibilité en azote, l'impact important de ce paramètre sur la croissance (doublement de la concentration cellulaire entre les pH 8,5 et 6,5 en culture continue) pourrait permettre une augmentation conséquente de la productivité en molécules antioxydantes. Néanmoins, aucun effet du pH sur l'activité antioxydante n'est observé lorsque la culture était en batch en phase stationnaire.

De plus, les résultats obtenus avec *Tetraselmis* sp. montrent un lien entre l'activité antioxydante et l'état photophysologique du photosystème II mesuré par la fluorimétrie PAM. Ainsi, les activités antioxydantes les plus élevées sont associées à un bon état physiologique du PSII. Ces résultats mettent en évidence le potentiel de la fluorimétrie PAM qui pourrait être utilisée comme un outil pour suivre l'activité antioxydante des microalgues. Cependant, afin de mieux comprendre les liens entre l'état physiologique des cellules, le stress oxydant et la production de molécules antioxydantes, il paraît nécessaire de mesurer également la production des espèces réactives de l'oxygène et l'activité des enzymes antioxydantes.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence, pour les microalgues testées, les possibilités d'optimisation de la production d'antioxydants par l'application de paramètres de culture qui favorisent d'une part la production de molécules antioxydantes et d'autre part la croissance, ce qui peut permettre une meilleure productivité. D'autres paramètres de culture susceptibles d'affecter l'activité antioxydante pourront être étudiés tels que la température, l'exposition aux métaux et aux UV, la carence en autres nutriments, ou la salinité. De plus, il sera également important de réaliser des mesures de l'activité antioxydante, de croissance et de productivité sur des cultures pilotes en raceway situés en extérieur, où les paramètres de cultures sont moins contrôlés, pour vérifier la faisabilité technique et économique de la production d'antioxydants par les microalgues.

Cette étude a permis de montrer que les antioxydants des microalgues étudiées pourraient constituer une alternative sérieuse aux antioxydants synthétiques ou issus des végétaux supérieurs déjà présents sur le marché. En effet les activités antioxydantes mesurées au cours de cette thèse sont comparables à celles des végétaux supérieurs, mais les microalgues marines présentent plusieurs avantages pour la production d'antioxydants : leur plus grande productivité, leur plasticité, la possibilité d'intervenir sur les conditions de culture, l'absence de concurrence avec l'agriculture pour l'accès au foncier et la présence de molécules qui n'existent pas chez les végétaux supérieurs telles que la siphonaxanthine. La mise en évidence du potentiel antioxydant des microalgues étudiées pourrait également s'inscrire dans une démarche de co-valorisation pour d'autres propriétés biotechnologiques de ces espèces telles que la qualité nutritionnelle ou d'autres activités cosmétiques (anti-UV, cicatrisante, hydratante...). Les résultats de cette thèse offrent donc des perspectives encourageantes pour la valorisation des microalgues calédoniennes comme source d'antioxydants et s'inscrit

totalemment dans le cadre du projet de création d'une filière de production de microalgues en Nouvelle-Calédonie.



---

# **Valorisation scientifique**

---



## Publications dans des journaux à comité de lecture

- **Coulombier N**, Jauffrais T, Lebouvier N. Antioxidants from microalgae : a review. (en préparation)
- **Coulombier N**, Le Déan L, Malo F, Brun P, Lebouvier N, Jauffrais T. A dilution-exclusion approach using continuous culture in stirred closed photobioreactors to isolate microalgae strains from tropical coastal water. (soumise dans Methods X)
- **Coulombier N**, Nicolau E, Le Déan L, Barthelemy V, Schreiber N, Brun P, Lebouvier N, Jauffrais T. 2020. Effects of nitrogen availability on antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp. *Marine Drugs*. 18(9):453. <https://doi.org/10.3390/md18090453>
- **Coulombier N**, Blanchier P, Le Déan L, Barthelemy V, Lebouvier N, Jauffrais T. 2020. The effects of CO<sub>2</sub>-induced acidification on *Tetraselmis* biomass production, photophysiology and antioxidant activity: a comparison using batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.005>
- **Coulombier N**, Nicolau E, Le Déan L, Antheaume C, Jauffrais T, Lebouvier N. 2020. Impact of Light Intensity on Antioxidant Activity of Tropical Microalgae. *Marine Drugs*. 18(2):122 <https://doi.org/10.3390/md18020122>

## Publications dans des journaux à comité de lecture hors cadre de la thèse

- Menguy E, Dumontet V, **Coulombier N**, Meriot V, Le Déan L, Barthelemy V, Jauffrais T. 2020. A method to assess algicidal activity of microalgal extracts coupling microalgae produced in stirred closed photobioreactor operating in continuous with pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *MethodsX*. 7: 101037. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101037>
- Béchet Q, **Coulombier N**, Vasseur C, Lasserre T, Le Déan L, Bernard O. 2018. Full-scale validation of an algal productivity model including nitrogen limitation. *Algal Research*. 31:377–386. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.010>

## Présentations dans des conférences internationales

- **Coulombier N**, Lebouvier N, Le Déan L, Nicolau E, Picot L, Hnawia E, Chavance P, Nour M, Kaas R, Chim L (2018). Evaluation of antioxidant activity of microalgae selected in New Caledonia. CIPAM & Cos - Colloque international des plantes aromatiques, médicinales et cosmétopée : « Nature et culture : de la recherche à l'innovation, la valorisation et/ou la préservation ». 19-23 novembre 2018, Tahiti (poster, lauréate du prix « meilleurs posters »).
- **Coulombier N**, Lebouvier N, Chim L, Le Déan L, Nicolau E, Picot L, Hnawia E, Chavance P, Nour M, Kaas R (2018) Evaluation of microalgae selected in New Caledonia as a potential source of natural antioxidants - AlgalBBB The 8th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. 11-13 juin 2018, Seattle (USA) (présentation)

- **Coulombier N**, Lebouvier N, Le Déan L, Chim L, Nicolau E, Picot L, Hnawia E, Chavance P, Nour M, Kaas R (2017). Evaluation of microalgae selected in New Caledonia as a potential source of natural antioxidants - ISAP 6<sup>th</sup> congress of the International Society for Applied Phycology. 18-23 juin 2017, Nantes (poster)
- Chim L, **Coulombier N**, Le Déan L, Brun P, Morezzi N, Nakagawa K, Malo F, Charrier A, Chavance P (2017). R&D programming of the AMICAL project to establish a microalgae industry in New-Caledonia, first results and outlook - ISAP 6<sup>th</sup> congress of the International Society for Applied Phycology. 18-23 juin 2017, Nantes (présentation)
- **Coulombier N**, Chim L, Le Déan L, Morezzi N, Brun P, Malo F, Nakagawa K, Ducrocq M, Rivaton A, Colin F (2016). Aquaculture of microalgae in New-Caledonia. AMICAL. AE2016 - Aquaculture Europe 2016, IUCN session, September 23 2016, Edinburgh, Scotland (poster)

### Présentations dans des conférences internationales hors cadre de la thèse

- Vallier B, **Coulombier N**, Wabete N, Brun P, Godfrin Y, Le Déan L, Chim L (2018). Oxygen balance in photobioreactor culture of picochlorum sp: risks of hypoxia and hyperoxia. AQUA 2018 - World Aquaculture Society Meetings. August 25-29 2018, Montpellier, France (poster)
- Nakagawa K, **Coulombier N**, Le Dean L, Brun P, Chim L (2016). Aquaculture of Microalgae in New-Caledonia (AMICAL): development of a CO<sub>2</sub> supply device for intensive microalgae culture. assessment of the device with carbon budget of cultures in microcosm. AE2016 - Aquaculture Europe 2016, IUCN session, September 23 2016, Edinburgh, Scotland (poster)

### Communications de vulgarisation scientifique

- **Coulombier N** (2018). Orientation métabolique pour stimuler la biosynthèse de molécules anti-oxydantes par une microalgue sélectionnée en Nouvelle-Calédonie. Doctoriales de l'Ecole doctorale du pacifique. 2&3 août 2018, Nouméa, Nouvelle Calédonie (présentation)
- **Coulombier N** (2018). Evaluation de microalgues sélectionnées en Nouvelle-Calédonie comme source potentielle d'antioxydants naturels. Doctoriales de l'Ecole doctorale du pacifique à Tahiti. 2-4 mai 2018, Punaauia, Tahiti (présentation)
- **Coulombier N** (2017). Evaluation de microalgues sélectionnées en Nouvelle-Calédonie comme source potentielle d'antioxydants naturels. Doctoriales de l'Ecole doctorale du pacifique. 3&4 août 2017, Nouméa, Nouvelle Calédonie (présentation, lauréate du prix de la thèse présentant les meilleures perspectives de valorisation)
- **Coulombier N** (2016). Evaluation de microalgues sélectionnées en Nouvelle-Calédonie comme source potentielle d'antioxydants naturels. Doctoriales de l'Ecole doctorale du pacifique. 4& 5 août 2016, Nouméa, Nouvelle Calédonie (poster)

---

## Références

---



- Abad MJ, Bedoya LM, Bermejo P (2008) Natural marine anti-inflammatory products. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8(8): 740–754, doi: 10.2174/138955708784912148
- Abalde J, Fabregas J, Herrero C (1991)  $\beta$ -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology* 38(2): 121–125, doi: 10.1016/0960-8524(91)90142-7
- Affan A, Karawita R, Jeon YJ, Kim BY, Lee JB (2006) Growth Characteristics, Bio-chemical Composition and Antioxidant Activities of Benthic Diatom *Grammatophora marina* from Jeju Coast, Korea. *ALGAE* 21(1): 141–148, doi: 10.4490/ALGAE.2006.21.1.141
- Agregán R, Munekata PES, Franco D, Carballo J, Barba FJ, Lorenzo JM (2018) Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) Assisted by Ultrasound. *Medicines* 5(2): 33, doi: 10.3390/medicines5020033
- Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenk PM (2014) Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry* 165: 300–306, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.107
- Ahmed IA, Mikail MA, Ibrahim M bin, Hazali N bin, Rasad MSBA, Ghani RA, Wahab RA, Arief SJ, Yahya MNA (2015) Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. *Food Chemistry* 172: 778–787, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.122
- Aklakur M (2016) Natural antioxidants from sea: a potential industrial perspective in aquafeed formulation. *Reviews in Aquaculture* 10: 385–399, doi: 10.1111/raq.12167
- Alam MdA, Xu JL, Wang Z (eds) (2020) *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer Singapore, Singapore, 483 pp, doi: 10.1007/978-981-15-0169-2
- Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine* 330(15): 1029–1035, doi: 10.1056/NEJM199404143301501
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403–410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Amaro HM, Fernandes F, Valentão P, Andrade PB, Sousa-Pinto I, Malcata FX, Guedes AC (2015) Effect of Solvent System on Extractability of Lipidic Components of *Scenedesmus obliquus* (M2-1) and *Gloeothece* sp. on Antioxidant Scavenging Capacity Thereof. *Marine Drugs* 13(10): 6453–6471, doi: 10.3390/md13106453
- Amini Khoeyi Z, Seyfabadi J, Ramezanpour Z (2012) Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International* 20(1): 41–49, doi: 10.1007/s10499-011-9440-1
- Amorati R, Valgimigli L (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research* 49(5): 633–649, doi: 10.3109/10715762.2014.996146
- Andersen RA, Kawachi M (2005) Traditional microalgae isolation techniques. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, Burlington, USA, pp 83–100
- Anderson JM (1983) Chlorophyll-protein complexes of a *Codium* species, including a light-harvesting siphonaxanthin-Chlorophylla ab-protein complex, an evolutionary relic of some Chlorophyta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 724(3): 370–380, doi: 10.1016/0005-2728(83)90096-8
- Andreassi M, Andreassi L (2003) Antioxidants in dermocosmetology: from the laboratory to clinical application. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2(3–4): 153–160, doi: 10.1111/j.1473-2130.2004.00075.x

- Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 85(5)De Gruyter, : 957–998, doi: 10.1351/PAC-REP-12-07-15
- Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373–399, doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J (2011) Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – From physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72(8): 681–688, doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.025
- Aremu AO, Masondo NA, Molnár Z, Stirk WA, Ördög V, Van S (2016) Changes in phytochemical content and pharmacological activities of three *Chlorella* strains grown in different nitrogen conditions. *Journal of Applied Phycology* 28(1): 149–159, doi: 10.1007/s10811-015-0568-7
- Aremu AO, Masondo NA, Stirk WA, Ördög V, Staden JV (2014) Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 407–415, doi: 10.1007/s10811-013-0144-y
- Aremu AO, Neményi M, Stirk WA, Ördög V, van S (2015) Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. *Journal of Phycology* 51(4): 659–669, doi: 10.1111/jpy.12308
- Asada K (2004) Radical Production and Scavenging in the Chloroplasts. In: Baker NR (ed), *Photosynthesis and the Environment. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 123–150, doi: 10.1007/0-306-48135-9\_5
- Assunção MFG, Amaral R, Martins CB, Ferreira JD, Ressurreição S, Santos SD, Varejão JMTB, Santos LMA (2016) Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology* : 1–13, doi: 10.1007/s10811-016-0980-7
- Augustyniak A, Bartosz G, Čipak A, Duburs G, Horáková L, Łuczaj W, Majekova M, Odysseos AD, Rackova L, Skrzydlewska E, Stefek M, Štrosová M, Tirzitis G, Venskutonis PR, Viskupicova J, Vranka PS, Žarković N (2010) Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radical Research* 44(10): 1216–1262, doi: 10.3109/10715762.2010.508495
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117(4): 426–436, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Balavigneswaran CK, Sujin Jeba Kumar T, Moses Packiaraj R, Veeraraj A, Prakash S (2013) Anti-oxidant activity of polysaccharides extracted from *Isochrysis galbana* using RSM optimized conditions. *International Journal of Biological Macromolecules* 60: 100–108, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.014
- Banskota AH, Sperker S, Stefanova R, McGinn PJ, O’Leary SJB (2018) Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology* : 1–10, doi: 10.1007/s10811-018-1523-1
- Barnett A, Méléder V, Blommaert L, Lepetit B, Gaudin P, Vyverman W, Sabbe K, Dupuy C, Lavaud J (2015) Growth form defines physiological photoprotective capacity in intertidal benthic diatoms. *The ISME Journal* 9(1): 32–45, doi: 10.1038/ismej.2014.105
- Baroukh C, Muñoz-Tamayo R, Steyer JP, Bernard O (2015) A state of the art of metabolic networks of unicellular microalgae and cyanobacteria for biofuel production. *Metabolic Engineering* 30: 49–60, doi: 10.1016/j.ymben.2015.03.019



- Barra L, Chandrasekaran R, Corato F, Brunet C (2014) The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. *Marine Drugs* 12(3): 1641–1675, doi: 10.3390/md12031641
- Batista AP, Niccolai A, Bursic I, Sousa I, Raymundo A, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR (2019) Microalgae as functional ingredients in savory food products: Application to wheat crackers. *Foods* 8(12): 611, doi: <https://doi.org/10.3390/foods8120611>
- Batista AP, Niccolai A, Fradinho P, Fragoso S, Bursic I, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR, Sousa I, Raymundo A (2017) Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Research* 26: 161–171, doi: 10.1016/j.algal.2017.07.017
- Bauer LM, Costa JAV, da R, Santos LO (2017) Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. *Bioresource Technology* 244: 1425–1432, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.036
- Bautista-Chamizo E, Borrero-Santiago AR, De Orte MR, DelValls Á, Riba I (2018) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on two microalgae species: A toxicity approach using consecutive generations. *Chemosphere* 213: 84–91, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.001
- Bayen T, Mairet F (2014) Optimization of the separation of two species in a chemostat. *Automatica* 50(4): 1243–1248, doi: 10.1016/j.automatica.2014.02.024
- Beardall J, Young E, Roberts S (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation: *Aquatic Sciences* 63(1): 44–69, doi: 10.1007/PL00001344
- Ben-Amotz A (1987) Effect of Irradiance and Nutrient Deficiency on the Chemical Composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *Journal of Plant Physiology* 131(5): 479–487, doi: 10.1016/S0176-1617(87)80290-0
- Ben-Amotz A, Avron M (1983) On the Factors Which Determine Massive  $\beta$ -Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 72(3): 593–597, doi: 10.1104/pp.72.3.593
- Ben-Amotz A, Polle JEW, Subba Rao DV (eds) (2009) The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology, 1st ed. ed. Science Publishers, Enfield, NH, 555 pp
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70–76, doi: 10.1006/abio.1996.0292
- Berges JA, Charlebois DO, Mauzerall DC, Falkowski PG (1996) Differential Effects of Nitrogen Limitation on Photosynthetic Efficiency of Photosystems I and II in Microalgae. *Plant Physiology* 110(2): 689–696, doi: 10.1104/pp.110.2.689
- Bidle KD (2016) Programmed Cell Death in Unicellular Phytoplankton. *Current biology* 26(13): R594–R607, doi: 10.1016/j.cub.2016.05.056
- Boelen P, Dijk R van, Sinninghe Damsté JS, Rijpstra WIC, Buma AG (2013) On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. *AMB Express* 3(1): 26, doi: 10.1186/2191-0855-3-26
- Bonnie TYP, Choo YM (1999) Oxidation and Thermal Degradation of Carotenoids. *Journal of Oil Palm Research* 11(1): 62–78
- Borowitzka MA (2018) The ‘stress’ concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology* 30(5): 2815–2825, doi: 10.1007/s10811-018-1399-0
- Boussiba S, Vonshak A (1991) Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology* 32(7): 1077–1082, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171

- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28: 25–30, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH (2012) The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology* 124: 217–226, doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.003
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151(1–4): 315–331, doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3)
- Brown MR, Mular M, Miller I, Farmer C, Trenerry C (1999) The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3(11): 247–255, doi: 10.1023/A:1008075903578
- Bulut O, Akın D, Sönmez Ç, Öktem A, Yücel M, Öktem HA (2019) Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology* 31(3): 1675–1683, doi: 10.1007/s10811-018-1726-5
- Buono S, Langellotti AL, Martello A, Bimonte M, Tito A, Carola A, Apone F, Colucci G, Fogliano V (2012) Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. *Archives of Dermatological Research* 304(9): 755–764, doi: 10.1007/s00403-012-1250-4
- Cacciapuoti F (2016) Oxidative Stress as “Mother” of Many Human Diseases at Strong Clinical Impact. *Journal of Cardiovascular Medicine and Cardiology* : 1–6, doi: 10.17352/2455-2976.000020
- Cadoret JP, Bougaran G, Bérard JB, Carrier G, Charrier A, Coulombier N, Garnier M, Kaas R, Déan LL, Lukomska E, Nicolau E, Rouxel C, Saint-Jean B, Schreiber N (2014) Microalgae and Biotechnology. Development of Marine Resources. John Wiley & Sons, Ltd, pp 57–115, doi: 10.1002/9781119007760.ch2
- Çakmak ZE, Ölmez TT, Çakmak T, Menemen Y, Tekinay T (2015) Antioxidant response of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under different element regimes. *Phycological Research* 63(3): 202–211, doi: 10.1111/pre.12096
- Calvani M, Pasha A, Favre C (2020) Nutraceutical Boom in Cancer: Inside the Labyrinth of Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences* 21(6): 1936, doi: 10.3390/ijms21061936
- Campbell DA, Tyystjarvi E (2012) Parameterization of photosystem II photoinactivation and repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(1): 258–265, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.010>
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14(3): 303–311, doi: 10.1016/0891-5849(93)90027-R
- Cardoso C, Pereira H, Franca J, Matos J, Monteiro I, Pousão-Ferreira P, Gomes A, Barreira L, Varela J, Neng N, Nogueira JM, Afonso C, Bandarra NM (2020) Lipid composition and some bioactivities of 3 newly isolated microalgae (*Tetraselmis* sp. IMP3, *Tetraselmis* sp. CTP4, and *Skeletonema* sp.). *Aquaculture International* 28(2): 711–727, doi: 10.1007/s10499-019-00489-w
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15–25, doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021

- Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR (2017) Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, doi: 10.1016/j.tifs.2017.11.008
- Cartaxana P, Domingues N, Cruz S, Jesus B, Laviale M, Serôdio J, Da Silva JM (2013) Photoinhibition in benthic diatom assemblages under light stress. *Aquatic Microbial Ecology* 70: 87–92, doi: <https://doi.org/10.3354/ame01648>
- Casal C, Cuaresma M, Vega JM, Vilchez C (2011) Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea. *Marine Drugs* 9(1): 29–42, doi: 10.3390/md9010029
- Cequier-Sánchez E, Rodríguez C, Ravelo AG, Zárate R (2008) Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12): 4297–4303, doi: 10.1021/jf073471e
- Cerezuela R, Guardiola FA, Meseguer J, Esteban MA (2012) Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: effects on the immune system. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 1729–1739, doi: <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9670-9>
- CEVA (2019) Macroalgues et microalgues alimentaires - Statut réglementaire en France et en Europe. 2019, 15 pp
- Cezare-Gomes EA, Mejia-da-Silva L del C, Pérez-Mora LS, Matsudo MC, Ferreira-Camargo LS, Singh AK, Carvalho JCM de (2019) Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, doi: 10.1007/s12010-018-02945-4
- Chaudhuri D, Ghate NB, Deb S, Panja S, Sarkar R, Rout J, Mandal N (2014) Assessment of the phytochemical constituents and antioxidant activity of a bloom forming microalgae *Euglena tuba*. *Biological Research* 47: 24, doi: 10.1186/0717-6287-47-24
- Chauton MS, Reitan KI, Norsker NH, Tveterås R, Kleivdal HT (2015) A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture* 436: 95–103, doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.038
- Chen CL, Chang JS, Lee DJ (2015) Dewatering and Drying Methods for Microalgae. *Drying Technology* 33(4): 443–454, doi: 10.1080/07373937.2014.997881
- Chen G, Niu X, Chen X, Li L, Kuang T, Li S (2008) Characterization of chlorophyll–protein complexes isolated from a Siphonous green alga, *Bryopsis corticulans*. *Photosynthesis Research* 96(1): 75, doi: 10.1007/s11120-007-9286-6
- Chen B, Wan C, Mehmood MA, Chang JS, Bai F, Zhao X (2017) Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. *Bioresource Technology* 244: 1198–1206, doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.170
- Chen H, Zheng Y, Zhan J, He C, Wang Q (2017) Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. *Biotechnology for Biofuels* 10: 153, doi: 10.1186/s13068-017-0839-4
- Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim HY, Shibahara N, Park JC (2003) The Inhibitory Effects of 12 Medicinal Plants and Their Component Compounds on Lipid Peroxidation. *The American Journal of Chinese Medicine* 31(06): 907–917, doi: 10.1142/S0192415X03001648
- Chokshi K, Pancha I, Ghosh A, Mishra S (2017) Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels* 10(1): 60, doi: 10.1186/s13068-017-0747-7

- Choochote W, Suklampoo L, Ochaikul D (2014) Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 43–48, doi: 10.1007/s10811-013-0084-6
- Cillard J, Cillard P (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 13(1): 24–29, doi: 10.1051/ocl.2006.6666
- Cirulis JT, Scott JA, Ross GM (2013) Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 91(1): 15–21, doi: 10.1139/cjpp-2012-0249
- Cleveland JS, Perry MJ (1987) Quantum yield, relative specific absorption and fluorescence in nitrogen limited *Chaetoceros gracilis*. *Marine Biology* 94: 489–497, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00431395>
- Coleman LW, Rosen BH, Schwartzbach SD (1988) Preferential Loss of Chloroplast Proteins in Nitrogen Deficient *Euglena*. *Plant and Cell Physiology* 29(6): 1007–1014, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077580
- Consalvey M, Perkins RG, Paterson DM, Underwood GJC (2005) Pam Fluorescence: A Beginners Guide for Benthic Diatomists. *Diatom Research* 20(1): 1–22, doi: 10.1080/0269249X.2005.9705619
- Copia J, Gaete H, Zuniga G, Hidalgo M, Cabrera E (2012) Effect of ultraviolet B radiation on the production of polyphenols in the marine microalga *Chlorella* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research* 40(1): 113–123, doi: <https://doi.org/10.3856/vol40-issue1-fulltext-11>
- Coulombier N, Nicolau E, Le Déan L, Antheaume C, Jauffrais T, Lebouvier N (2020) Impact of Light Intensity on Antioxidant Activity of Tropical Microalgae. *Marine Drugs* 18(2): 122, doi: 10.3390/md18020122
- Croft MT, Warren MJ, Smith AG (2006) Algae Need Their Vitamins. *Eukaryotic Cell* 5(8): 1175–1183, doi: 10.1128/EC.00097-06
- Cullen JJ, Yang X, MacIntyre HL (1992) Nutrient Limitation of Marine Photosynthesis. In: Falkowski PG, Woodhead AD, Vivirito K (eds), Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea. Environmental Science Research. Springer US, Boston, MA, pp 69–88, doi: 10.1007/978-1-4899-0762-2\_5
- Custódio L, Justo T, Silvestre L, Barradas A, Duarte CV, Pereira H, Barreira L, Rauter AP, Alberício F, Varela J (2012) Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry* 131(1): 134–140, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.047
- Custódio L, Soares F, Pereira H, Barreira L, Vizetto-Duarte C, Rodrigues MJ, Rauter AP, Alberício F, Varela J (2014) Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 151–161, doi: 10.1007/s10811-013-0098-0
- Dai J, Mumfer RJ (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15(10): 7313–7352, doi: 10.3390/molecules15107313
- Dambeck M, Sandmann G (2014) Antioxidative Activities of Algal Keto Carotenoids Acting as Antioxidative Protectants in the Chloroplast. *Photochemistry and Photobiology* 90(4): 814–819, doi: 10.1111/php.12249
- De Farias Silva CE, Sforza E, Bertucco A (2019) Enhancing Carbohydrate Productivity in Photosynthetic Microorganism Production: A Comparison Between Cyanobacteria and Microalgae and the Effect of Cultivation Systems. *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts*. Elsevier, pp 37–67, doi: 10.1016/B978-0-12-817937-6.00003-5
- De La Rocha C, Terbrüggen A, Völker C, Hohn S (2010) Response to and recovery from nitrogen and silicon starvation in *Thalassiosira weissflogii*: growth rates, nutrient uptake

- and C, Si and N content per cell. *Marine Ecology Progress Series* 412: 57–68, doi: 10.3354/meps08701
- De Morais MG, Vaz B da S, Morais EG de, Costa JAV (2015) Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International* 2015: 1–15, doi: 10.1155/2015/835761
- De Rosbo GK, Bernard O (2014) Évaluation du gisement potentiel de ressources algales pour l'énergie et la chimie en France à horizon 2030. France, 2014, 111 pp
- Del Campo JA, Moreno J, Rodríguez H, Angeles Vargas M, Rivas J, Guerrero MG (2000) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology* 76(1): 51–59, doi: 10.1016/S0168-1656(99)00178-9
- Del Campo JA, Rodríguez H, Moreno J, Vargas MÁ, Rivas J, Guerrero MG (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(6): 848–854, doi: 10.1007/s00253-003-1510-5
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212–228, doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1(1): 21–26, doi: 10.1016/S1360-1385(96)80019-7
- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274(2): 532–538, doi: 10.1016/0003-9861(89)90467-0
- Djema W, Bernard O, Giraldi L (2020) Separating two species of microalgae in photobioreactors in minimal time. *Journal of Process Control* 87: 120–129, doi: 10.1016/j.jprocont.2020.01.003
- Do Nascimento TC, Nass PP, Fernandes AS, Vieira KR, Wagner R, Jacob-Lopes E, Zepka LQ (2020) Exploratory data of the microalgae compounds for food purposes. *Data in Brief* 29: 105182, doi: 10.1016/j.dib.2020.105182
- Dogra B, Amna S, Park YI, Park JK (2017) Biochemical properties of water soluble polysaccharides from photosynthetic marine microalgae *Tetraselmis* species. *Macromolecular Research* 25: 172–179, doi: <https://doi.org/10.1007/s13233-017-5016-x>
- Dortch Q, Clayton JR, Thoresen SS, Ahmed SI (1984) Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Marine Biology* 81(3): 237–250, doi: 10.1007/BF00393218
- Duarte TL, Lunec J (2005) When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research* 39(7): 671–686, doi: 10.1080/10715760500104025
- Durmaz Y (2007) Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272(1): 717–722, doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.07.213
- Duval B, Shetty K, Thomas WH (1999) Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology* 11(6): 559, doi: 10.1023/A:1008178208949
- Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG (1997) The carotenoids as anti-oxidants — a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41(3): 189–200, doi: 10.1016/S1011-1344(97)00092-4

- El-Agamey A, McGarvey DJ (2008) Carotenoid Radicals and Radical Ions. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), Carotenoids. Birkhäuser Basel, Basel, pp 119–154, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0\_7
- Elshobary ME, El-Shenody RA, Ashour M, Zabed HM, Qi X (2020) Antimicrobial and antioxidant characterization of bioactive components from *Chlorococcum minutum*. *Food Bioscience* : 100567, doi: 10.1016/j.fbio.2020.100567
- Eonseon J, Polle JEW, Lee HK, Hyun SM, Chang M (2003) Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(2): 165–174
- Esquivel-Hernández DA, Ibarra-Garza IP, Rodríguez-Rodríguez J, Cuéllar-Bermúdez SP, Rostro-Alanis M de J, Alemán-Nava GS, García-Pérez JS, Parra-Saldívar R (2017) Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 11(1): 215–231, doi: 10.1002/bbb.1735
- European Commission Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Food Supplements (Text with EEA Relevance) (2002). <http://data.europa.eu/eli/dir/2002/46/oj/eng> (Accessed 18 May 2020)
- European Commission Règlement (UE) n ° 68/2013 de la Commission du 16 janvier 2013 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE (2013). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A32013R0068> (Accessed 15 May 2020)
- European Commission Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n ° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n ° 258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n ° 1852/2001 de la Commission (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) (2015). <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/2283/oj/fra> (Accessed 15 May 2020)
- European Commission CosIng (2016). Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs - European Commission. <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/> (Accessed 15 May 2020)
- Ewing JF, Janero DR (1995) Microplate Superoxide Dismutase Assay Employing a Nonenzymatic Superoxide Generator. *Analytical Biochemistry* 232(2): 243–248, doi: 10.1006/abio.1995.0014
- Fan J, Cui Y, Wan M, Wang W, Li Y (2014) Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels* 7(1): 1–14, doi: 10.1186/1754-6834-7-17
- Farahin AW, Yusoff FM, Nagao N, Basri M, Shariff M (2016) Phenolic content and antioxidant activity of *Tetraselmis tetrathele* (West) Butcher 1959 cultured in annular photobioreactor. *Journal of Environmental Biology* 37(4): 631–639
- Fischer BB, Dayer R, Schwarzenbach Y, Lemaire SD, Behra R, Liedtke A, Eggen RIL (2009) Function and regulation of the glutathione peroxidase homologous gene GPXH/GPX5 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 71(6): 569–583, doi: 10.1007/s11103-009-9540-8
- Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(7): 1043–1048, doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008
- Fon-Sing S, Borowitzka MA (2016) Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of Applied Phycology* 28: 1–14, doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0560-2>

- Foo SC, Yusoff FM, Ismail M, Basri M, Khong NMH, Chan KW, Yau SK (2015) Efficient solvent extraction of antioxidant-rich extract from a tropical diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5(10): 834–840, doi: 10.1016/j.apjtb.2015.06.003
- Foo SC, Yusoff FMd, Ismail M, Basri M, Yau SK, Khong NMH, Chan KW, Ebrahimi M (2017) Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology* 241: 175–183, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.026
- Foyer CH, Noctor G (2005a) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28(8): 1056–1071, doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x
- Foyer CH, Noctor G (2005b) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875, doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155(1): 2–18, doi: 10.1104/pp.110.167569
- Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* 155: 93–100, doi: <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Frankel EN, Meyer AS (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(13): 1925–1941, doi: 10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4
- Franklin LA, Forster RM (1997) The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology* 32: 207–232, doi: <https://doi.org/10.1080/09670269710001737149>
- Galasso C, Corinaldesi C, Sansone C (2017) Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants* 6(4): 96, doi: 10.3390/antiox6040096
- Gam D, Kim SY, Kim JW (2020) Optimization of ultrasound-assisted extraction condition for phenolic compounds, antioxidant activity, and epigallocatechin gallate in lipid-extracted microalgae. *Molecules* 25(3): 454, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25030454>
- Gammone MA, Riccioni G, D’Orazio N (2015) Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health. *Marine Drugs* 13(10): 6226–6246, doi: 10.3390/md13106226
- Ganesan P, Matsubara K, Ohkubo T, Tanaka Y, Noda K, Sugawara T, Hirata T (2010) Anti-angiogenic effect of siphonaxanthin from green alga, *Codium fragile*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 17(14): 1140–1144, doi: 10.1016/j.phymed.2010.05.005
- Ganesan P, Noda K, Manabe Y, Ohkubo T, Tanaka Y, Maoka T, Sugawara T, Hirata T (2011) Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1810(5): 497–503, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.02.008
- Gao KS, Xu JT, Gao G, Li YH, Hutchins DA, Huang BQ, Wang L, Zheng Y, Jin P, Cai XN, Hader DP, Li W, Xu K, Liu NN, Riebesell U (2012) Rising CO<sub>2</sub> and increased light exposure synergistically reduce marine primary productivity. *Nature Climate Change* 2: 519–523, doi: <https://doi.org/10.1038/nclimate1507>

- Geider R, La Roche J (2002) Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37(1): 1–17, doi: 10.1017/S0967026201003456
- Geider RJ, Laroche J, Greene RM, Olaizola M (1993) Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *Journal of Phycology* 29(6): 755–766, doi: <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00755.x>
- Geider R, Macintyre, Graziano L, McKay RM (1998) Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European Journal of Phycology* 33(4): 315–332, doi: 10.1080/09670269810001736813
- Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao L, Grewell D, Wang T (2012) Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology* 125: 175–181, doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.110
- Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Prenzler PD (2017) Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry* 230(Supplement C): 195–207, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.127
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909–930, doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO<sub>2</sub> CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 56(1): 99–131, doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052
- Glazer AN (1994) Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology* 6(2): 105–112, doi: 10.1007/BF02186064
- Goh SH, Yusoff FM, Loh SP (2010) A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom, *Chaetoceros* sp. and a Green Microalga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science* 2(3): 123
- Goiris K, Muylaert K, De Cooman L (2015) Microalgae as a Novel Source of Antioxidants for Nutritional Applications. In: Kim SK (ed), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Boston, pp 269–280, doi: 10.1016/B978-0-12-800776-1.00017-0
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, Brabanter JD, Cooman LD (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24(6): 1477–1486, doi: 10.1007/s10811-012-9804-6
- Goiris K, Muylaert K, Voorspoels S, Noten B, Paepe DD, Baart GJE, Cooman LD (2014) Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology* 50(3): 483–492, doi: 10.1111/jpy.12180
- Goiris K, Van Colen W, Wilches I, León-Tamariz F, De Cooman L, Muylaert K (2015) Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research* 7: 51–57, doi: 10.1016/j.algal.2014.12.002
- Gómez I, López-Figueroa F, Ulloa N, Morales V, Lovengreen C, Huovinen P, Hess S (2004) Patterns of photosynthesis in 18 species of intertidal macroalgae from southern Chile. *Marine Ecology Progress Series* 270: 103–116, doi: 10.3354/meps270103
- Gómez-Loredo A, Benavides J, Rito-Palomares M (2016) Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions. *Journal of Applied Phycology* 28(2): 849–860, doi: 10.1007/s10811-015-0635-0
- González-Fernández C, Ballesteros M (2013) Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *Journal of Applied Phycology* 25(4): 991–999, doi: 10.1007/s10811-012-9957-3



- Gordillo FJL, Jimenez C, Chavarria J, Niell FX (2001) Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis*. *Photosynthesis Research* 68: 225–235, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1012969324756>
- Gordon MH (1990) The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. In: Hudson BJB (ed), *Food Antioxidants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 1–18, doi: 10.1007/978-94-009-0753-9\_1
- Gordon MH, Magos P (1983) The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chemistry* 10(2): 141–147, doi: 10.1016/0308-8146(83)90030-4
- Goss R, Garab G (2001) Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching and structural rearrangements induced by low pH in intact cells of *Chlorella fusca* (Chlorophyceae) and *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). *Photosynthesis Research* 67: 185–197, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1010681511105>
- Goss R, Jakob T (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research* 106(1): 103–122, doi: 10.1007/s11120-010-9536-x
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX (2011a) Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs* 9(4): 625–644, doi: 10.3390/md9040625
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX (2011b) Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnology Progress* 27(3): 597–613, doi: 10.1002/btpr.575
- Guedes AC, Amaro HM, Pereira RD, Malcata FX (2011) Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnology Progress* 27(5): 1218–1224, doi: 10.1002/btpr.649
- Guedes AC, Gião MS, Seabra R, Ferreira ACS, Tamagnini P, Moradas-Ferreira P, Malcata FX (2013) Evaluation of the Antioxidant Activity of Cell Extracts from Microalgae. *Marine Drugs* 11(4): 1256–1270, doi: 10.3390/md11041256
- Guihéneuf F, Mimouni V, Ulmann L, Tremblin G (2009) Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 369(2): 136–143, doi: 10.1016/j.jembe.2008.11.009
- Guiry MD (2012) How Many Species of Algae Are There? *Journal of Phycology* 48(5): 1057–1063, doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x
- Gulcin İ (2020) Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 94(3): 651–715, doi: 10.1007/s00204-020-02689-3
- Gürlek C, Yarkent Ç, Köse A, Tuğcu B, Gebeloğlu IK, Öncel SŞ, Elibol M (2020) Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. *Health and Technology* 10(1): 111–117, doi: 10.1007/s12553-019-00388-3
- Guzmán S, Gato A, Calleja JM (2001) Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research* 15(3): 224–230, doi: 10.1002/ptr.715
- Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Oveisi MR, Nafissi-Varcheh N (2010) Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22(1): 43–50, doi: 10.1007/s10811-009-9424-y
- Halliwell B (1995) How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia* 61: 73–101, doi: 10.1042/bss0610073
- Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35(Pt 5): 1147–1150, doi: 10.1042/BST0351147

- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57(5): 715S-725S, doi: 10.1093/ajcn/57.5.715S
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) Free radicals in biology and medicine., 5th edition ed. Oxford University Press, Oxford, UK, 906 pp
- Hamed SM, Selim S, Klöck G, AbdElgawad H (2017) Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144: 19–25, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.05.048
- Hamid S, Sibi G (2018) Antioxidant System Response in Green Microalga *Chlorococcopsis minuta* Against Nutrient Stress in Growth Media. *Asian Journal of Biological Science* 11(4): 210–216, doi: 10.3923/ajbs.2018.210.216
- Haoujar I, Cacciola F, Abrini J, Mangraviti D, Giuffrida D, Oulad El Majdoub Y, Kounoun A, Miceli N, Fernanda Taviano M, Mondello L, Rigano F, Skali Senhaji N (2019) The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules* 24(22): 4037, doi: 10.3390/molecules24224037
- He Q, Yang H, Wu L, Hu C (2015) Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology* 191: 219–228, doi: 10.1016/j.biortech.2015.05.021
- Hejazi MA, Wijffels RH (2003) Effect of light intensity on  $\beta$ -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomolecular Engineering* 20(4): 171–175, doi: 10.1016/S1389-0344(03)00046-7
- Hemaiswarya S, Raja R, Kumar RR, Ganesan V, Anbazhagan C (2011) Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1737–1746, doi: https://doi.org/10.1007/s11274-010-0632-z
- Henry GE, Momin RA, Nair MG, Dewitt DL (2002) Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(8): 2231–2234, doi: https://doi.org/10.1021/jf0114381
- Heo J, Shin DS, Cho K, Cho DH, Lee YJ, Kim HS (2018) Indigenous microalga *Parachlorella* sp. JD-076 as a potential source for lutein production: Optimization of lutein productivity via regulation of light intensity and carbon source. *Algal Research* 33: 1–7, doi: 10.1016/j.algal.2018.04.029
- Herrera E, Barbas C (2001) Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry* 57(1): 43–56, doi: 10.1007/BF03179812
- Herrero M, Jaime L, Martín-Alvarez PJ, Cifuentes A, Ibáñez E (2006) Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(15): 5597–5603, doi: 10.1021/jf060546q
- Hinga KR (2002) Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 238: 281–300, doi: https://doi.org/10.3354/meps238281
- Ho SH, Chan MC, Liu CC, Chen CY, Lee WL, Lee DJ, Chang JS (2014) Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource Technology* 152: 275–282, doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.031
- Ho SH, Xie Y, Chan MC, Liu CC, Chen CY, Lee DJ, Huang CC, Chang JS (2015) Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with *Scenedesmus obliquus* FSP-3. *Bioresource Technology* 184: 131–138, doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.062
- Hockin NL, Mock T, Mulholland F, Kopriva S, Malin G (2012) The Response of Diatom Central Carbon Metabolism to Nitrogen Starvation Is Different from That of Green

- Algae and Higher Plants. *Plant Physiology* 158(1): 299–312, doi: 10.1104/pp.111.184333
- Holzinger A, Lütz C (2006) Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37(3): 190–207, doi: 10.1016/j.micron.2005.10.015
- Honda M, Kageyama H, Hibino T, Zhang Y, Diono W, Kanda H, Yamaguchi R, Takemura R, Fukaya T, Goto M (2019) Improved Carotenoid Processing with Sustainable Solvents Utilizing Z-Isomerization-Induced Alteration in Physicochemical Properties: A Review and Future Directions. *Molecules* 24(11), doi: 10.3390/molecules24112149
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54(4): 621–639, doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- Hu S, Zhou B, Wang Y, Wang Y, Zhang X, Zhao Y, Zhao X, Tang X (2017) Effect of CO<sub>2</sub>-induced seawater acidification on growth, photosynthesis and inorganic carbon acquisition of the harmful bloom-forming marine microalga, *Karenia mikimotoi*. *PLOS ONE* 12(8): e0183289, doi: 10.1371/journal.pone.0183289
- Huang JJ, Lin S, Xu W, Cheung PCK (2017) Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances* 35(5): 597–618, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.001
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK (2002) Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(7): 1815–1821, doi: 10.1021/jf0113732
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(16): 4437–4444
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 1841–1856, doi: 10.1021/jf030723c
- Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro-Puyana M (2012) Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: Hayes M (ed), *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer US, Boston, MA, pp 55–98, doi: 10.1007/978-1-4614-1247-2\_2
- Işıl Berker K, Güçlü K, Demirata B, Apak R (2010) A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods* 2(11): 1770–1778, doi: 10.1039/C0AY00245C
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1817(1): 182–193, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.012
- Jaime L, Mendiola JA, Ibañez E, Martín-Álvarez PJ, Cifuentes A, Reglero G, Señoráns FJ (2007)  $\beta$ -Carotene Isomer Composition of Sub- and Supercritical Carbon Dioxide Extracts. Antioxidant Activity Measurement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26): 10585–10590, doi: 10.1021/jf0711789
- Jain N, Ramawat KG (2013) Nutraceuticals and Antioxidants in Prevention of Diseases. In: Ramawat KG, Mérillon JM (eds), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 2559–2580, doi: 10.1007/978-3-642-22144-6\_70
- Jakob G (2013) Surveying a Diverse Pool of Microalgae as a Bioresource for Future Biotechnological Applications. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* 04(05), doi: 10.4172/2157-7463.1000153

- Jaleel CA, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Inès J, Al-Juburi HJ, Chang-Xing Z, Hong-Bo S, Panneerselvam R (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum* 31(3): 427–436, doi: 10.1007/s11738-009-0275-6
- Janknegt PJ, Marco de Graaff C, Poll WH van de, Visser RJW, Rijstenbil JW, Buma AGJ (2009) Short-term antioxidative responses of 15 microalgae exposed to excessive irradiance including ultraviolet radiation. *European Journal of Phycology* 44(4): 525–539, doi: 10.1080/09670260902943273
- Jauffrais T, Agogué H, Gemin MP, Beaugeard L, Martin-Jézéquel V (2017) Effect of bacteria on growth and biochemical composition of two benthic diatoms *Halamphora coffeaeformis* and *Entomoneis paludosa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 495: 65–74, doi: 10.1016/j.jembe.2017.06.004
- Jauffrais T, Jesus B, Méléder V, Turpin V, Russo ADPG, Raimbault P, Jézéquel VM (2016) Physiological and photophysiological responses of the benthic diatom *Entomoneis paludosa* (Bacillariophyceae) to dissolved inorganic and organic nitrogen in culture. *Marine Biology* 163(5): 115, doi: 10.1007/s00227-016-2888-9
- Jauffrais T, LeKieffre C, Schweizer M, Geslin E, Metzger E, Bernhard JM, Jesus B, Filipsson HL, Maire O, Meibom A (2019) Kleptoplastidic benthic foraminifera from aphotic habitats: insights into assimilation of inorganic C, N and S studied with sub-cellular resolution. *Environmental Microbiology* 21(1): 125–141, doi: 10.1111/1462-2920.14433
- Jauffrais T, LeKieffre C, Schweizer M, Jesus B, Metzger E, Geslin E (2019) Response of a kleptoplastidic foraminifer to heterotrophic starvation: photosynthesis and lipid droplet biogenesis. *FEMS Microbiology Ecology* 95(5), doi: 10.1093/femsec/fiz046
- Jauffrais T, Séchet V, Herrenknecht C, Truquet P, Savar V, Tillmann U, Hess P (2013) Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate *Azadinium spinosum*. *Harmful Algae* 27: 138–148, doi: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.05.009>
- Jayshree A, Jayashree S, Thangaraju N (2016) *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Mediators. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 78(5): 575–581, doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000155
- Jerez CG, Malapascua JR, Sergejevová M, Figueroa FL, Masojídek J (2016) Effect of Nutrient Starvation under High Irradiance on Lipid and Starch Accumulation in *Chlorella fusca* (Chlorophyta). *Marine Biotechnology* 18(1): 24–36, doi: 10.1007/s10126-015-9664-6
- Jerez-Martel I, García-Poza S, Rodríguez-Martel G, Rico M, Afonso-Olivares C, Gómez-Pinchetti JL (2017) Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains. *Journal of Food Quality* 2017: 8, doi: <https://doi.org/10.1155/2017/2924508>
- Jiang Y, Yoshida T, Quigg A (2012) Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiology and Biochemistry* 54: 70–77, doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.012
- Juin C, Chérouvrier JR, Thiéry V, Gagez AL, Bérard JB, Joguet N, Kaas R, Cadoret JP, Picot L (2015) Microwave-Assisted Extraction of Phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(1): 1–15, doi: 10.1007/s12010-014-1250-2
- Kapoor RV, Butler TO, Pandhal J, Vaidyanathan S (2018) Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. *Biology* 7(1): 18, doi: 10.3390/biology7010018

- Keeling PJ, Burki F (2019) Progress towards the Tree of Eukaryotes. *Current Biology* 29(16): R808–R817, doi: 10.1016/j.cub.2019.07.031
- Kenny O, Brunton NP, Smyth TJ (2015) In Vitro Protocols for Measuring the Antioxidant Capacity of Algal Extracts. In: Stengel DB, Connan S (eds), *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, pp 375–402, doi: 10.1007/978-1-4939-2684-8\_24
- Khatoun H, Rahman NA, Banerjee S, Harun N, Suleiman SS, Zakaria NH, Lananan F, Hamid SHA, Endut A (2014) Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp and *Tetraselmis* sp isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95: 11–18, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.022>
- Kim SH, Liu KH, Lee SY, Hong SJ, Cho BK, Lee H, Lee CG, Choi HK (2013) Effects of Light Intensity and Nitrogen Starvation on Glycerolipid, Glycerophospholipid, and Carotenoid Composition in *Dunaliella tertiolecta* Culture. *PLOS ONE* 8(9): e72415, doi: 10.1371/journal.pone.0072415
- Klejdus B, Lojková L, Plaza M, Šnóblová M, Šterbová D (2010) Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(51): 7956–7965, doi: 10.1016/j.chroma.2010.07.020
- Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, Nagai S (1992) Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74(1): 61–63, doi: 10.1016/0922-338X(92)90271-U
- Koller M, Muhr A, BrauneGG G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6: 52–63, doi: 10.1016/j.algal.2014.09.002
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A (2003) Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends in Plant Science* 8(1): 27–32, doi: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)00010-9)
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313–349, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
- Krieger-Liszakay A, Fufezan C, Trebst A (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98(1): 551–564, doi: 10.1007/s11120-008-9349-3
- Kusumawati I, Indrayanto G (2013) Natural Antioxidants in Cosmetics. In: Atta-ur-Rahman (ed), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp 485–505, doi: 10.1016/B978-0-444-59603-1.00015-1
- Laamanen CA, Ross GM, Scott JA (2016) Flotation harvesting of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58: 75–86, doi: 10.1016/j.rser.2015.12.293
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RCH, Bino RJ, Wijffels RH (2012) Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology* 162(1): 21–27, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.018
- Lamers PP, Laak CCW van de, Kaasenbrood PS, Lorier J, Janssen M, Vos RCHD, Bino RJ, Wijffels RH (2010) Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering* 106(4): 638–648, doi: 10.1002/bit.22725
- Latowski D, Kuczyńska P, Strzałka K (2011) Xanthophyll cycle--a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 16(2): 78–90, doi: 10.1179/174329211X13020951739938

- Laurent D, Pietra F (2004) Natural-product diversity of the New Caledonian marine ecosystem compared to other ecosystems: a pharmacologically oriented view. *Chemistry & Biodiversity* 1(4): 539–594, doi: 10.1002/cbdv.200490048
- Lavaud J, Kroth PG (2006) In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. *Plant and Cell Physiology* 47(7): 1010–1016, doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj058>
- Lavaud J, Strzepak RF, Kroth PG (2007) Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography* 52(3): 1188–1194, doi: <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.3.1188>
- Le Chevanton M, Garnier M, Bougaran G, Schreiber N, Lukomska E, Bérard JB, Fouilland E, Bernard O, Cadoret JP (2013) Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research* 2(3): 212–222, doi: 10.1016/j.algal.2013.05.003
- Ledford HK, Niyogi KK (2005) Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell & Environment* 28(8): 1037–1045, doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01374.x
- Lee SH, Lee JB, Lee KW, Jeon YJ (2010) Antioxidant properties of tidal pool microalgae, *Halochlorococcum porphyrae* and *Oltamanssiellopsis unicellularis* from Jeju Island, Korea. *ALGAE* 25(1): 45–56, doi: 10.4490/algae.2010.25.1.045
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125(2): 288–306, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.012
- Lesser MP (2006) Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 68(1): 253–278, doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001
- Levasseur W, Perré P, Pozzobon V (2020) A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances* : 107545, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107545
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102(3): 771–776, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.022
- Li YT, Han DX, Sommerfeld M, Hu QA (2011) Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology* 102(1): 123–129, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.036>
- Li P, Liu CY, Liu H, Zhang Q, Wang L (2013) Protective function of nitric oxide on marine phytoplankton under abiotic stresses. *Nitric Oxide* 33: 88–96, doi: 10.1016/j.niox.2013.06.007
- Li ZS, Noda K, Fujita E, Manabe Y, Hirata T, Sugawara T (2015) The Green Algal Carotenoid Siphonaxanthin Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes and the Accumulation of Lipids in White Adipose Tissue of KK-Ay Mice. *The Journal of Nutrition* : jn.114.200931, doi: 10.3945/jn.114.200931
- Liefer JD, Garg A, Campbell DA, Irwin AJ, Finkel ZV (2018) Nitrogen starvation induces distinct photosynthetic responses and recovery dynamics in diatoms and prasinophytes. *PLOS ONE* 13(4): e0195705, doi: 10.1371/journal.pone.0195705
- Lin JH, Lee DJ, Chang JS (2015) Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology* 184: 421–428, doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.099

- Liu W, Au DWT, Anderson DM, Lam PKS, Wu RSS (2007) Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 346(1): 76–86, doi: 10.1016/j.jembe.2007.03.007
- Liu H, Qiu N, Ding H, Yao R (2008) Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International* 41(4): 363–370, doi: 10.1016/j.foodres.2007.12.012
- Llewellyn CA, Airs RL (2010) Distribution and Abundance of MAAs in 33 Species of Microalgae across 13 Classes. *Marine Drugs* 8(4): 1273–1291, doi: 10.3390/md8041273
- Loganathan BG, Orsat V, Lefsrud M (2020) Evaluation and interpretation of growth, biomass productivity and lutein content of *Chlorella variabilis* on various media. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8(3): 103750, doi: 10.1016/j.jece.2020.103750
- López A, Rico M, Santana-Casiano JM, González AG, González-Dávila M (2015) Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research* 22(19): 14820–14828, doi: 10.1007/s11356-015-4717-y
- Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD (2019) Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules* 24(22), doi: 10.3390/molecules24224132
- Lv J, Yang X, Ma H, Hu X, Wei Y, Zhou W, Li L (2015) The oxidative stability of microalgae oil (*Schizochytrium aggregatum*) and its antioxidant activity after simulated gastrointestinal digestion: Relationship with constituents. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117: 1928–1939, doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400588>
- Maadane A, Merghoub N, Ainane T, El Arroussi H, Benhima R, Amzazi S, Bakri Y, Wahby I (2015) Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology* 215: 13–19, doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.400
- MacIntyre H, Cullen J (2005) Using Cultures to Investigate the Physiological Ecology of Microalgae. *Algal Culturing Techniques*, Andersen, R.A; (Ed). Elsevier Academic Press, pp 287–326
- Mackey KRM, Morris JJ, Morel FMM, Kranz SA (2015) Response of Photosynthesis to Ocean Acidification. *Oceanography* 28: 74–91, doi: <https://doi.org/10.5670/oceanog.2015.33>
- Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology* 157(2): 183–193, doi: 10.1016/S0176-1617(00)80189-3
- Manabe Y, Takii Y, Sugawara T (2020) Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae, suppresses advanced glycation end product-induced inflammatory responses. *Journal of Natural Medicines* 74(1): 127–134, doi: 10.1007/s11418-019-01354-z
- Marin B, Melkonian M (2010) Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operons. *Protist* 161(2): 304–336, doi: 10.1016/j.protis.2009.10.002
- Masci P, Bernard O, Grogard F (2008) Continuous Selection of the Fastest Growing Species in the Chemostat. *IFAC Proceedings Volumes* 41(2): 9707–9712, doi: 10.3182/20080706-5-KR-1001.01642
- Masojídek J, Vonshak A, Torzillo G (2010) Chlorophyll fluorescence applications in microalgal mass cultures. In: Suggett DJ, Prášil O, Borowitzka MA (eds), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Dordrecht, Springer Netherlands, pp 277–292

- Matos J, Cardoso C, Gomes A, Campos AM, Falé P, Afonso C, Bandarra NM (2019) Bioprospection of *Isochrysis galbana* and its potential as a nutraceutical. *Food & Function* 10(11): 7333–7342, doi: 10.1039/C9FO01364D
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659–668, doi: 10.1093/jexbot/51.345.659
- McClure DD, Luiz A, Gerber B, Barton GW, Kavanagh JM (2018) An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal Research* 29: 41–48, doi: 10.1016/j.algal.2017.11.015
- Meireles LA, Guedes AC, Malcata FX (2003) Increase of the yields of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by the microalga *Pavlova lutheri* following random mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering* 81(1): 50–55, doi: 10.1002/bit.10451
- Menguy E, Dumontet V, Coulombier N, Meriot V, Déan LL, Barthelemy V, Jauffrais T (2020) A method to assess algicidal activity of microalgal extracts coupling microalgae produced in stirred closed photobioreactor operating in continuous with pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *MethodsX* 7: 101037, doi: 10.1016/j.mex.2020.101037
- Miazek K, Iwanek W, Remacle C, Richel A, Goffin D (2015) Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 16(10): 23929–23969, doi: 10.3390/ijms161023929
- Millao S, Uquiche E (2016) Antioxidant activity of supercritical extracts from *Nannochloropsis gaditana*: Correlation with its content of carotenoids and tocopherols. *The Journal of Supercritical Fluids* 111: 143–150, doi: 10.1016/j.supflu.2016.02.002
- Milledge JJ, Heaven S (2013) A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 12(2): 165–178, doi: 10.1007/s11157-012-9301-z
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384(3): 240–242, doi: 10.1016/0014-5793(96)00323-7
- Milligan AJ, Mioni CE, Morel FMM (2009) Response of cell surface pH to pCO<sub>2</sub> and iron limitation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Marine Chemistry* 114: 31–36, doi: <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2009.03.003>
- Mimouni V, Ulmann L, Pasquet V, Mathieu M, Picot L, Bougaran G, Cadoret JP, Morant-Manceau A, Schoefs B (2012) The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13(15): 2733–2750, doi: 10.2174/138920112804724828
- Mishra A, Jha B (2011) Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina* 54(2): 195–199, doi: 10.1515/bot.2011.012
- Mitra M, Patidar SK, Mishra S (2015) Integrated process of two stage cultivation of *Nannochloropsis* sp. for nutraceutically valuable eicosapentaenoic acid along with biodiesel. *Bioresource Technology* 193: 363–369, doi: 10.1016/j.biortech.2015.06.033
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405–410, doi: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mittler R (2017) ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 22(1): 11–19, doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Miyachi S, Iwasaki I, Shiraiwa Y (2003) Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high-CO<sub>2</sub> conditions. *Photosynthesis Research* 77(2): 139–153, doi: 10.1023/A:1025817616865



- Molina Grima E, Fernández FGA, Medina AR (2013) Downstream Processing of Cell Mass and Products. Handbook of Microalgal Culture. John Wiley & Sons, Ltd, pp 267–309, doi: 10.1002/9781118567166.ch14
- Molina Grima E, García Camacho F, Sánchez Pérez JA, García Sánchez JL (1994) Biochemical productivity and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* Parke and *Tetraselmis* sp. as a function of incident light intensity. *Process Biochemistry* 29(2): 119–126, doi: 10.1016/0032-9592(94)80004-9
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26: 211–219
- Moon JK, Shibamoto T (2009) Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5): 1655–1666, doi: 10.1021/jf803537k
- Morowvat MH, Ghasemi Y (2016) Evaluation of antioxidant properties of some naturally isolated microalgae: Identification and characterization of the most efficient strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 263–269, doi: 10.1016/j.bcab.2016.09.010
- Motuhi SE, Mehiri M, Payri CE, La Barre S, Bach S (2016) Marine Natural Products from New Caledonia--A Review. *Marine Drugs* 14(3), doi: 10.3390/md14030058
- Mulders KJM, Lamers PP, Martens DE, Wijffels RH (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology* 50(2): 229–242, doi: 10.1111/jpy.12173
- Müller L, Fröhlich K, Böhm V (2011) Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129(1): 139–148, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.045
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(1): 31–57, doi: 10.1080/0735-260291044179
- Muzandu K, Ishizuka M, Sakamoto KQ, Shaban Z, El Bohi K, Kazusaka A, Fujita S (2006) Effect of lycopene and  $\beta$ -carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicology and Applied Pharmacology* 215(3): 330–340, doi: 10.1016/j.taap.2006.03.006
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB da, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853–858, doi: 10.1038/35002501
- Naguib YMA (2000) Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(4): 1150–1154, doi: 10.1021/jf991106k
- Nakazawa Y, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K (2009) Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods* 1(1): 88–97, doi: 10.1016/j.jff.2008.09.015
- Napoleon C, Raimbault V, Claquin P (2013) Influence of nutrient stress on the relationships between PAM measurements and carbon incorporation in four phytoplankton species. *PLOS ONE* : 8, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066423>
- Natrah FMI, Yusoff FM, Shariff M, Abas F, Mariana NS (2007) Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology* 19(6): 711–718, doi: 10.1007/s10811-007-9192-5
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005) Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1): 668–676, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.072
- Nishiyama Y, Murata N (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery.

- Applied Microbiology and Biotechnology* 98(21): 8777–8796, doi: 10.1007/s00253-014-6020-0
- Novoveská L, Ross ME, Stanley MS, Pradelles R, Wasiolek V, Sassi JF (2019) Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Marine Drugs* 17(11): 640, doi: 10.3390/md17110640
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619–4626, doi: 10.1021/jf010586o
- Paliwal C, Mitra M, Bhayani K, Bharadwaj VSV, Ghosh T, Dubey S, Mishra S (2017) Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology* , doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.058
- Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP (2010) Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & Metabolism* 7: 18, doi: 10.1186/1743-7075-7-18
- Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL (2008) Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiology* 101(10): S58–S68, doi: 10.1016/j.amjcard.2008.02.010
- Pasquet V, Chérouvrier JR, Farhat F, Thiéry V, Piot JM, Bérard JB, Kaas R, Serive B, Patrice T, Cadoret JP, Picot L (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry* 46(1): 59–67, doi: 10.1016/j.procbio.2010.07.009
- Patias LD, Fernandes AS, Petry FC, Mercadante AZ, Jacob-Lopes E, Zepka LQ (2017) Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxyl radical scavenger capacity. *Food Research International* , doi: 10.1016/j.foodres.2017.06.069
- Patterson GW, Tsitsa-Tzardis E, Wikfors GH, Gladu PK, Chitwood DJ, Harrison D (1993) Sterols of *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *Comparative biochemistry and physiology B: Comparative biochemistry* 105(2): 253–0–1993, doi: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90225-T](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90225-T)
- Payri CE, Allain V, Aucan J, David C, David V, Dutheil C, Loubersac L, Menkes C, Pelletier B, Pestana G, Samadi S (2019) New Caledonia. World Seas: An Environmental Evaluation. Elsevier, pp 593–618, doi: 10.1016/B978-0-08-100853-9.00035-X
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH (2011) Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs* 9(10): 1806–1828, doi: 10.3390/md9101806
- Pereira H, Custódio L, Rodrigues MJ, De S, Oliveira M, Barreira L, Neng NDR, Nogueira JMF, Alrokayan SA, Mouffouk F, Abu-Salah KM, Ben-Hamadou R, Varela J (2015) Biological activities and chemical composition of methanolic extracts of selected autochthonous microalgae strains from the Red Sea. *Marine Drugs* 13(6): 3531–3549, doi: 10.3390/md13063531
- Perelman A, Matsukawa R, Schlosberg M, Cohen BS, Fostik-Magyar C, Dubinsky Z (1998) Natural Antioxidant Activity in Some Microalgal Species. *Israel Journal of Plant Sciences* 46(2): 169–176, doi: 10.1080/07929978.1998.10676724
- Perez-Garcia O, Escalante FME, Bashan LE de-, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45(1): 11–36, doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037
- Person J, Lando D, Mathieu D (2011) Livre turquoise : algues, filières du futur. Adebitech, Romainville, 163 pp
- Petrushkina M, Gusev E, Sorokin B, Zotko N, Mamaeva A, Filimonova A, Kulikovskiy M, Maltsev Y, Yampolsky I, Guglya E, Vinokurov V, Namsaraev Z, Kuzmin D (2017)

- Fucoxanthin production by heterokont microalgae. *Algal Research* 24: 387–393, doi: 10.1016/j.algal.2017.03.016
- Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F (2013) Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control* 31(2): 593–606, doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.039
- Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) Heavy Metal–Induced Oxidative Stress in Algae. *Journal of Phycology* 39(6): 1008–1018, doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
- Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G (2016) Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 36, doi: <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Platt T, Gallegos CL, Harrison WG (1981) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38
- Plaza M, Amigo-Benavent M, Castillo MD del, Ibáñez E, Herrero M (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International* 43(10): 2341–2348, doi: 10.1016/j.foodres.2010.07.036
- Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E (2008) In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* 19: 31–39, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>
- Ponis E, Robert R, Parisi G (2003) Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 221: 491–505, doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00075-9)
- Pospíšil P, Yamamoto Y (2017) Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861(2): 457–466, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.005
- Pouvreau JB, Michèle Morançais, Taran F, Rosa P, Laurent Dufossé, Fabienne Guérard, Pin S, Fleurence J, Pondaven P (2008) Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenols pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15): 6278–6286, doi: 10.1021/jf073187n
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical biochemistry* 269(2): 337–341, doi: 10.1006/abio.1999.4019
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4290–4302, doi: 10.1021/jf0502698
- Ptushenko VV, Solovchenko AE (2016) Tolerance of the photosynthetic apparatus to acidification of the growth medium as a possible determinant of CO<sub>2</sub>-tolerance of the symbiotic microalga *Desmodesmus* sp. IPPAS-2014. *Biochemistry (Moscow)* 81(12): 1531–1537, doi: 10.1134/S0006297916120142
- Quick KL, Hardt JI, Dugan LL (2000) Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *Journal of Neuroscience Methods* 97(2): 139–144, doi: 10.1016/S0165-0270(00)00179-5
- Ram S, Paliwal C, Mishra S (2019) Growth medium and nitrogen stress sparked biochemical and carotenogenic alterations in *Scenedesmus* sp. CCNM 1028. *Bioresource Technology Reports* 7: 100194, doi: 10.1016/j.biteb.2019.100194

- Raposo MF de J, De Morais RMSC, Bernardo de Morais AMM (2013) Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs* 11(1): 233–252, doi: 10.3390/md11010233
- Raposo MF de J, Morais AMMB de (2015) Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences* 125: 32–41, doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.018
- Ratz-Lyko A, Arct J, Pytkowska K (2012) Methods for evaluation of cosmetic antioxidant capacity. *Skin Research and Technology* 18(4): 421–430, doi: 10.1111/j.1600-0846.2011.00588.x
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9–10): 1231–1237
- Redfield A (1958) The Biological Control of Chemical Factors in the Environment. *American Scientist* 46(3): 230A–221
- Ribeiro D, Freitas M, Silva AMS, Carvalho F, Fernandes E (2018) Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology* 120: 681–699, doi: 10.1016/j.fct.2018.07.060
- Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F (2008) Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research* 57: 451–455, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.05.002>
- Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, McAinsh M, Davies JM (2015) The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany* 66(1): 37–46, doi: 10.1093/jxb/eru398
- Richmond A (2008) Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley & Sons, USA, 587 pp
- Rico M, López A, Santana-Casiano JM, González AG, González-Dávila M (2013) Variability of the phenolic profile in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* growing under copper and iron stress. *Limnology and Oceanography* 58(1): 144–152, doi: 10.4319/lo.2013.58.1.0144
- Rios AF, Fraga F, Perez FF, Figueiras FG (1998) Chemical composition of phytoplankton and particulate organic matter in the Ria de Vigo (NW Spain). *Scientia Marina* 62: 257–271, doi: 10.3989/scimar.1998.62n3257
- Roach T, Krieger-Liszkay A (2014) Regulation of Photosynthetic Electron Transport and Photoinhibition. *Current Protein and Peptide Science* 15(4): 351–362
- Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102(1): 100–112, doi: 10.1002/bit.22033
- Rodrigues E, Mariutti LRB, Chisté RC, Mercadante AZ (2012) Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure–activity relationship. *Food Chemistry* 135(3): 2103–2111, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.074
- Rodriguez-Amaya DB (2010) Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 23(7): 726–740, doi: 10.1016/j.jfca.2010.03.008
- Rodriguez-Garcia I, Guil-Guerrero JL (2008) Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry* 108(3): 1023–1026, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.059
- Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Señoráns FJ, Cifuentes A, Ibáñez E (2010) Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from

- Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51(2): 456–463, doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.014
- Roy S, Llewellyn C, Egeland ES, Johnsen G (2013) Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography, Volume 49. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 892 pp
- Ruiz-Domínguez MC, Vaquero I, Obregón V, Morena B de la, Vilchez C, Vega JM (2015) Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain *onubensis*) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology* 27(3): 1099–1108, doi: 10.1007/s10811-014-0403-6
- Ryckebosch E, Muylaert K, Eeckhout M, Ruysen T, Foubert I (2011) Influence of Drying and Storage on Lipid and Carotenoid Stability of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(20): 11063–11069, doi: 10.1021/jf2025456
- Saed-Moucheshi A, Shekoofa A, Pessarakli M (2014) Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition* 37(10): 1573–1585, doi: 10.1080/01904167.2013.868483
- Safafar H, Wagenen J van, Møller P, Jacobsen C (2015) Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs* 13(12): 7339–7356, doi: 10.3390/md13127069
- Saiga A, Tanabe S, Nishimura T (2003) Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(12): 3661–3667, doi: 10.1021/jf021156g
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Riceevans C (1995) Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322(2): 339–346, doi: 10.1006/abbi.1995.1473
- Salguero A, Morena B de la, Vigara J, Vega JM, Vilchez C, León R (2003) Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering* 20(4–6): 249–253, doi: 10.1016/S1389-0344(03)00065-0
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2028 pp
- Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque TG, Buonocore GG, Ramos F, Castilho MC, Machado AV, Costa HS (2014) Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 31(3): 374–395, doi: 10.1080/19440049.2013.879215
- Sánchez JF, Fernández-Sevilla JM, Acién FG, Cerón MC, Pérez-Parra J, Molina-Grima E (2008) Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(5): 719–729, doi: 10.1007/s00253-008-1494-2
- Sandmann G (2019) Antioxidant Protection from UV- and Light-Stress Related to Carotenoid Structures. *Antioxidants* 8(7): 219, doi: 10.3390/antiox8070219
- Sansone C, Brunet C (2019) Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *Antioxidants* 8(7): 199, doi: 10.3390/antiox8070199
- Sansone C, Galasso C, Orefice I, Nuzzo G, Luongo E, Cutignano A, Romano G, Brunet C, Fontana A, Esposito F, Ianora A (2017) The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Scientific Reports* 7: 41215, doi: 10.1038/srep41215

- Sathasivam R, Ki JS (2018) A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. *Marine Drugs* 16(1): 26, doi: 10.3390/md16010026
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1995) Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM (eds), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 49–70, doi: 10.1007/978-3-642-79354-7\_3
- Schüler LM, Santos T, Pereira H, Duarte P, Katkam NG, Florindo C, Schulze PSC, Barreira L, Varela JCS (2020) Improved production of lutein and  $\beta$ -carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis* sp. CTP4. *Algal Research* 45: 101732, doi: 10.1016/j.algal.2019.101732
- Serive B, Kaas R, Bérard JB, Pasquet V, Picot L, Cadoret JP (2012) Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 124: 311–320, doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.105
- Serive B, Nicolau E, Bérard JB, Kaas R, Pasquet V, Picot L, Cadoret JP (2017) Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *PLOS ONE* 12(2): e0171872, doi: 10.1371/journal.pone.0171872
- Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods* 18: 820–897, doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018
- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32(1): 67–103, doi: 10.1080/10408399209527581
- Shaish A, Avron M, Pick U, Ben-Amotz A (1993) Are active oxygen species involved in induction of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta* 190(3): 363–368, doi: 10.1007/BF00196965
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012(1): 1–26, doi: 10.1155/2012/21703
- Sharma AK, Parul, General T (2019) Variation of both chemical composition and antioxidant properties of newly isolated *Parachlorella kessleri* GB1, by growing in different culture conditions. *LWT* 112: 108205, doi: 10.1016/j.lwt.2019.05.103
- Show KY, Lee DJ, Tay JH, Lee TM, Chang JS (2015) Microalgal drying and cell disruption – Recent advances. *Bioresource Technology* 184: 258–266, doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.139
- Sieracki M, Poulton NJ, Crosbie N (2005) Automated isolation techniques for microalgae. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, Burlington, Mass, pp 101–116
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215(2): 213–219, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x
- Sies H, Stahl W (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62(6): 1315S–1321S, doi: 10.1093/ajcn/62.6.1315S
- Simic S, Kosanic M, Rankovic B (2012) Evaluation of In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Green Microalgae *Trentepohlia umbrina*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40(2): 86–91, doi: 10.15835/nbha4027933
- Singh P, Baranwal M, Reddy SM (2016) Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical Biology* 54(10): 2269–2275, doi: 10.3109/13880209.2016.1153660
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S (2019) Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24(8): 1583, doi: 10.3390/molecules24081583

- Singh R, Parihar P, Singh M, Bajguz A, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM (2017) Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Microbiology* 8, doi: 10.3389/fmicb.2017.00515
- Singh G, Patidar SK (2018) Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management* 217: 499–508, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.04.010
- Sinha RP, Singh SP, Häder DP (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 89(1): 29–35, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.07.006
- Smeriglio A, Cornara L, Trombetta D (2020) Antioxidants in Diets and Food. In: Xiao J, Sarker SD, Asakawa Y (eds), *Handbook of Dietary Phytochemicals*. Springer Singapore, Singapore, pp 1–37, doi: 10.1007/978-981-13-1745-3\_3-1
- Smerilli A, Balzano S, Maselli M, Blasio M, Orefice I, Galasso C, Sansone C, Brunet C (2019) Antioxidant and Photoprotection Networking in the Coastal Diatom *Skeletonema marinoi*. *Antioxidants* 8(6): 154, doi: 10.3390/antiox8060154
- Smerilli A, Orefice I, Corato F, Gavalás Olea A, Ruban AV, Brunet C (2017) Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *Skeletonema marinoi*. *Environmental Microbiology* 19(2): 611–627, doi: 10.1111/1462-2920.13545
- Smith HL, Waltman P (1995) *The Theory of the Chemostat: Dynamics of Microbial Competition*. Cambridge University Press, 344 pp
- Solovchenko AE (2013) Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology* 60(1): 1–13, doi: 10.1134/S1021443713010081
- Solovchenko A, Khozin-Goldberg I (2013) High-CO<sub>2</sub> tolerance in microalgae: possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Letters* 35(11): 1745–1752, doi: 10.1007/s10529-013-1274-7
- Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN (2008) Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(4): 455–462, doi: 10.1134/S1021443708040043
- Solovchenko A, Lukyanov A, Solovchenko O, Didi-Cohen S, Boussiba S, Khozin-Goldberg I (2014) Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804: Interactive effects of stresses on *N. oceanica*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116(5): 635–644, doi: 10.1002/ejlt.201300456
- Sonani RR (2015) Antioxidant Potential of Phycobiliproteins: Role in Anti-Aging Research. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 04(02), doi: 10.4172/2161-1009.1000172
- Soto ML, Parada M, Falqué E, Domínguez H (2018) Personal-Care Products Formulated with Natural Antioxidant Extracts. *Cosmetics* 5(1): 13, doi: 10.3390/cosmetics5010013
- Sozmen AB, Canbay E, Sozmen EY, Ovez B (2018) The effect of temperature and light intensity during cultivation of *Chlorella miniata* on antioxidant, anti-inflammatory potentials and phenolic compound accumulation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14: 366–374, doi: 10.1016/j.bcab.2018.03.023
- Stahl W, Sies H (1993) Physical Quenching of Singlet Oxygen and cis-trans Isomerization of Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691(1): 10–19, doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb26153.x
- Stahl W, Sies H (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24(6): 345–351, doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X

- Steinrücken P, Erga SR, Mjøs SA, Kleivdal H, Prestegard SK (2017) Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal Research* 26: 392–401, doi: 10.1016/j.algal.2017.07.030
- Sugawara T, Ganesan P, Li Z, Manabe Y, Hirata T (2014) Siphonaxanthin, a Green Algal Carotenoid, as a Novel Functional Compound. *Marine Drugs* 12(6): 3660–3668, doi: 10.3390/md12063660
- Suh SS, Kim SM, Kim JE, Hong JM, Lee SG, Youn UJ, Han SJ, Kim IC, Kim S (2017) Anticancer activities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, *Botrydiopsisidaceae* sp. *BMC complementary and alternative medicine* 17(1): 509, doi: 10.1186/s12906-017-1991-x
- Suh SS, Yang EJ, Lee SG, Youn UJ, Han SJ, Kim IC, Kim S (2017) Bioactivities of ethanol extract from the Antarctic freshwater microalga, *Chloromonas* sp. *International Journal of Medical Sciences* 14(6): 560–569, doi: 10.7150/ijms.18702
- Sun L, Wang L, Li J, Liu H (2014) Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta. *Food Chemistry* 160: 1–7, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.067
- Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126(1): 45–51, doi: 10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x
- Takahashi S, Murata N (2005) Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of Photosystem II from photodamage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1708(3): 352–361, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.04.003>
- Takaichi S (2011) Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* 9(6): 1101–1118, doi: 10.3390/md9061101
- Takeoka GR, Dao L, Flessa S, Gillespie DM, Jewell WT, Huebner B, Bertow D, Ebeler SE (2001) Processing Effects on Lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 3713–3717, doi: 10.1021/jf0102721
- Talero E, García-Mauriño S, Ávila-Román J, Rodríguez-Luna A, Alcaide A, Motilva V (2015) Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine Drugs* 13: 6152–6209, doi: <https://doi.org/10.3390/md13106152>
- Tammam AA, Fakhry EM, El-Sheekh M (2011) Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *African Journal of Biotechnology* 10(19): 3795–3808, doi: 10.4314/ajb.v10i19.
- Tannin-Spitz T, Bergman M, Van-Moppes D, Grossman S, Arad S (2005) Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology* 17(3): 215–222, doi: 10.1007/s10811-005-0679-7
- Telfer A (2002) What is  $\beta$ -carotene doing in the photosystem II reaction centre? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 357(1426): 1431–1440, doi: 10.1098/rstb.2002.1139
- Telfer A, Pascal A, Gall A (2008) Carotenoids in Photosynthesis. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), Carotenoids: Volume 4: Natural Functions. Carotenoids. Birkhäuser, Basel, pp 265–308, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0\_14
- Thinh LV, Renaud SM, Parry DL (1999) Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 170: 161–173, doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00400-1)
- Touloupakis E, Cicchi B, Benavides AMS, Torzillo G (2016) Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae



- (*Poterioochromonas* sp). *Applied Microbial and Cell Physiology* 100: 1333–1341, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7024-0>
- Triantaphylidès C, Havaux M (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* 14(4): 219–228, doi: 10.1016/j.tplants.2009.01.008
- Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst KI, Mangelsdorf I, McArdle H, Naska A, Neuhäuser-Berthold M, Nowicka G, Pentieva K, Sanz Y, Siani A, Sjödin A, Stern M, Tomé D, Vinceti M, Willatts P, Engel KH, Marchelli R, Pöting A, Poulsen M, Salminen S, Schlatter J, Arcella D, Gelbmann W, Sesmaisons-Lecarré A de, Verhagen H, Loveren H van (2016) Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 14(11): e04594, doi: 10.2903/j.efsa.2016.4594
- Van Heukelem L, Thomas CS (2001) Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A* 910(1): 31–49, doi: 10.1016/S0378-4347(00)00603-4
- Vanderauwera S, Hoerberichts FA, Van Breusegem F (2009) Hydrogen Peroxide-Responsive Genes in Stress Acclimation and Cell Death. In: Rio LA, Puppo A (eds), *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Signaling and Communication in Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 149–164, doi: 10.1007/978-3-642-00390-5\_9
- Wada N, Sakamoto T, Matsugo S (2015) Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants. *Antioxidants* 4(3): 603–646, doi: 10.3390/antiox4030603
- Walne PR (1966) Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea Edulis* L. Fishery investigations (Great Britain. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). H.M.S.O., London, 53 pp
- Wang W, Qin X, Sang M, Chen D, Wang K, Lin R, Lu C, Shen JR, Kuang T (2013) Spectral and functional studies on siphonaxanthin-type light-harvesting complex of photosystem II from *Bryopsis corticulans*. *Photosynthesis Research* 117(1): 267–279, doi: 10.1007/s11120-013-9808-3
- Wang B, Zarka A, Trebst A, Boussiba S (2003) Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus Pluvialis* (chlorophyceae) as an Active Photoprotective Process Under High Irradiance. *Journal of Phycology* 39(6): 1116–1124, doi: 10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x
- Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J (2018) Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69(1): 209–236, doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040322
- Watanabe J, Oki T, Takebayashi J, Yada H, Wagaki M, Takano-Ishikawa Y, Yasui A (2016) Improvement and Interlaboratory Validation of the Lipophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity: Determination of Antioxidant Capacities of Lipophilic Antioxidant Solutions and Food Extracts. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 32(2): 171–175, doi: 10.2116/analsci.32.171
- Wijffels RH, Barbosa MJ, Eppink MHM (2010) Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4(3): 287–295, doi: 10.1002/bbb.215
- Williamson CJ, Perkins R, Yallop ML, Peteiro C, Sanchez N, Gunnarsson K, Gamble M, Brodie J (2018) Photoacclimation and photoregulation strategies of *Corallina* (Corallinales, Rhodophyta) across the NE Atlantic. *European Journal of Phycology* 53: 290–306, doi: <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1442586>

- Wolfe-Simon F, Starovoytov V, Reinfelder JR, Schofield O, Falkowski PG (2006) Localization and Role of Manganese Superoxide Dismutase in a Marine Diatom. *Plant Physiology* 142(4): 1701–1709, doi: 10.1104/pp.106.088963
- Worden AZ, Nolan JK, Palenik B (2004) Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography* 49: 168–179, doi: <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0168>
- Wu YP, Beardall J, Gao KS (2015) Physiological responses of a model marine diatom to fast pH changes: Special implications of coastal water acidification. *PLOS ONE* 10: 10, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141163>
- Wu Y, Gao K, Riebesell U (2010) CO<sub>2</sub>-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biogeosciences* 7: 2915–2923, doi: <http://dx.doi.org/10.5194/bg-7-2915-2010>
- Wu HY, Roy S, Alami M, Green BR, Campbell DA (2012) Photosystem II photoinactivation, repair, and protection in marine centric diatoms. *Plant Physiology* 160, (1): 464–476, doi: <https://doi.org/10.1104/pp.112.203067>
- Wu Z, Zhu Y, Huang W, Zhang C, Li T, Zhang Y, Li A (2012) Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology* 110: 496–502, doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.101
- Xia B, Sui Q, Sun X, Han Q, Chen B, Zhu L, Qu K (2018) Ocean acidification increases the toxic effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the marine microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials* 346: 1–9, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.017>
- Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q, Zhang C (2013) Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs* 11(7): 2667–2681, doi: 10.3390/md11072667
- Xiang YB, Zhang J, Weeks DP (2001) The Cia5 gene controls formation of the carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS* 98: 5341–5346, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.101534498>
- Xie Y, Ho SH, Chen CNN, Chen CY, Ng IS, Jing KJ, Chang JS, Lu Y (2013) Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource Technology* 144: 435–444, doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.064
- Yilancioglu K, Cokol M, Pastirmaci I, Erman B, Cetiner S (2014) Oxidative Stress Is a Mediator for Increased Lipid Accumulation in a Newly Isolated *Dunaliella salina* Strain. *PLOS ONE* 9(3), doi: 10.1371/journal.pone.0091957
- Yokohama Y, Kageyama A, Ikawa T, Shimura S (1977) A Carotenoid Characteristic of Chlorophycean Seaweeds Living in Deep Coastal Waters. *Botanica Marina* 20(7): 433–436, doi: 10.1515/botm.1977.20.7.433
- Yoshida Y, Niki E (2003) Antioxidant Effects of Phytosterol and Its Components. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 49(4): 277–280, doi: 10.3177/jnsv.49.277
- Yoshida K, Terao J, Suzuki T, Takama K (1991) Inhibitory effect of phosphatidylserine on iron-dependent lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179(2): 1077–1081, doi: 10.1016/0006-291x(91)91929-7
- Yoshii Y (2006) Diversity and evolution of photosynthetic antenna systems in green plants. *Phycological Research* 54(3): 220–229, doi: 10.1111/j.1440-1835.2006.00430.x
- Yoshii Y, Takaichi S, Maoka T, Suda S, Sekiguchi H, Nakayama T, Inouye I (2005) Variation of Siphonaxanthin Series Among the Genus *Nephroselmis* (prasinophyceae, Chlorophyta), Including a Novel Primary Methoxy Carotenoid. *Journal of Phycology* 41(4): 827–834, doi: 10.1111/j.1529-8817.2005.00103.x

- Young EB, Beardall J (2003) Photosynthetic Function in *Dunaliella Tertiolecta* (chlorophyta) During a Nitrogen Starvation and Recovery Cycle. *Journal of Phycology* 39(5): 897–905, doi: 10.1046/j.1529-8817.2003.03042.x
- Young AJ, Lowe GM (2001) Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385(1): 20–27, doi: 10.1006/abbi.2000.2149
- Yu M, Chen M, Gui J, Huang S, Liu Y, Shentu H, He J, Fang Z, Wang W, Zhang Y (2019) Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules* 137: 139–150, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.222
- Yu J hui, Wang Y, Sun J, Bian F, Chen G, Zhang Y, Bi Y ping, Wu Y jie (2017) Antioxidant activity of alcohol aqueous extracts of *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 18(9): 797–806, doi: 10.1631/jzus.B1600367
- Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH (2011) Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition and Food Research* 55(1): 150–165, doi: 10.1002/mnfr.201000414
- Zbigniew T, Wojciech P (2006) Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD isoforms in three *Scenedesmus* species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(3): 323–331, doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.12.001
- Zhang YM, Chen H, He CL, Wang Q (2013) Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PLOS ONE* 8(7): e69225, doi: 10.1371/journal.pone.0069225
- Zhang R, Kong Z, Chen S, Ran Z, Ye M, Xu J, Zhou C, Liao K, Cao J, Yan X (2017) The comparative study for physiological and biochemical mechanisms of *Thalassiosira pseudonana* and *Chaetoceros calcitrans* in response to different light intensities. *Algal Research* 27: 89–98, doi: 10.1016/j.algal.2017.08.026
- Zhang ZB, Liu CY, Wu ZZ, Xing L, Li PF (2006) Detection of nitric oxide in culture media and studies on nitric oxide formation by marine microalgae. *Medical Science Monitor* 12(2): 75–85
- Zhang Y, Wu H, Yuan C, Li T, Li A (2019) Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogen starvation and resupply. *Journal of Applied Phycology* 31(5): 2797–2809, doi: 10.1007/s10811-019-01783-z
- Zheng J, Li Z, Manabe Y, Kim M, Goto T, Kawada T, Sugawara T (2018) Siphonaxanthin, a Carotenoid From Green Algae, Inhibits Lipogenesis in Hepatocytes via the Suppression of Liver X Receptor  $\alpha$  Activity. *Lipids* : 41–52, doi: 10.1002/lipd.12002
- Zheng J, Manabe Y, Sugawara T (2020) Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae *Codium cylindricum*, protects Ob/Ob mice fed on a high-fat diet against lipotoxicity by ameliorating somatic stresses and restoring anti-oxidative capacity. *Nutrition Research* 77: 29–42, doi: 10.1016/j.nutres.2020.02.001
- Zhong Q, Wei B, Wang S, Ke S, Chen J, Zhang H, Wang H (2019) The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Marine Drugs* 17(12): 674, doi: 10.3390/md17120674
- Zuluaga M, Gueguen V, Pavon-Djavid G, Letourneur D (2017) Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *BioImpacts* 7(1): 1–3, doi: 10.15171/bi.2017.01



---

# **Annexes**

---



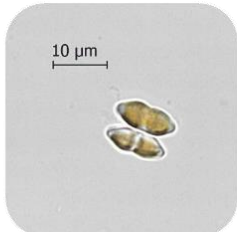
## DIATOMÉES



*Nitzschia* sp. A



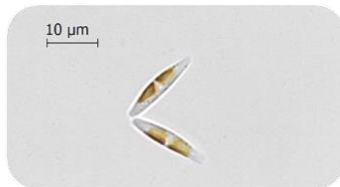
*Entomoneis punctulata*



*Nitzschia* sp. B

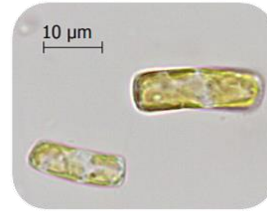


*Bacillaria* sp.

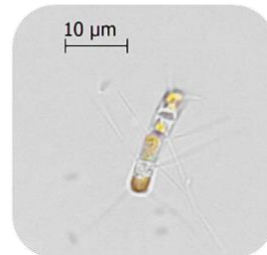


*Cylindrotheca closterium*

## MEDIOPHYCÉES



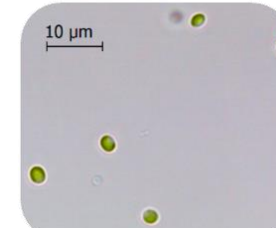
*Thalassiosira weissflogi*



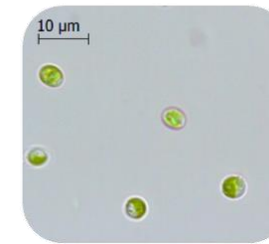
*Chaetoceros* sp.

## CHLOROPHYTES

### TREBOUXIOPHYCÉES

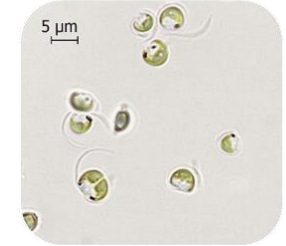


*Picochlorum* sp.



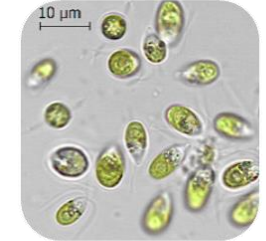
*Schizochlamydeella* sp.

### NEPHROPHYCÉE



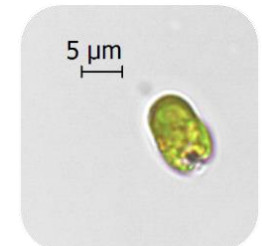
*Nephroselmis* sp.

### CHLOROPHYCÉE

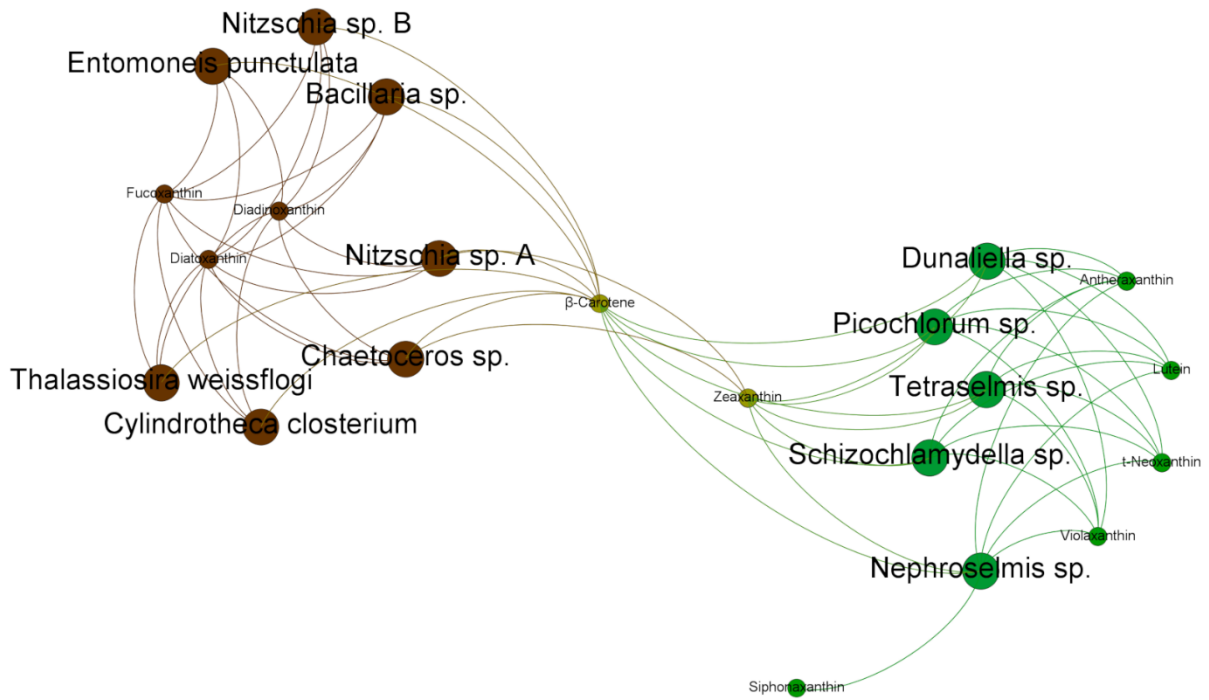


*Dunaliella* sp.

### CHLORODENDROPHYCÉE

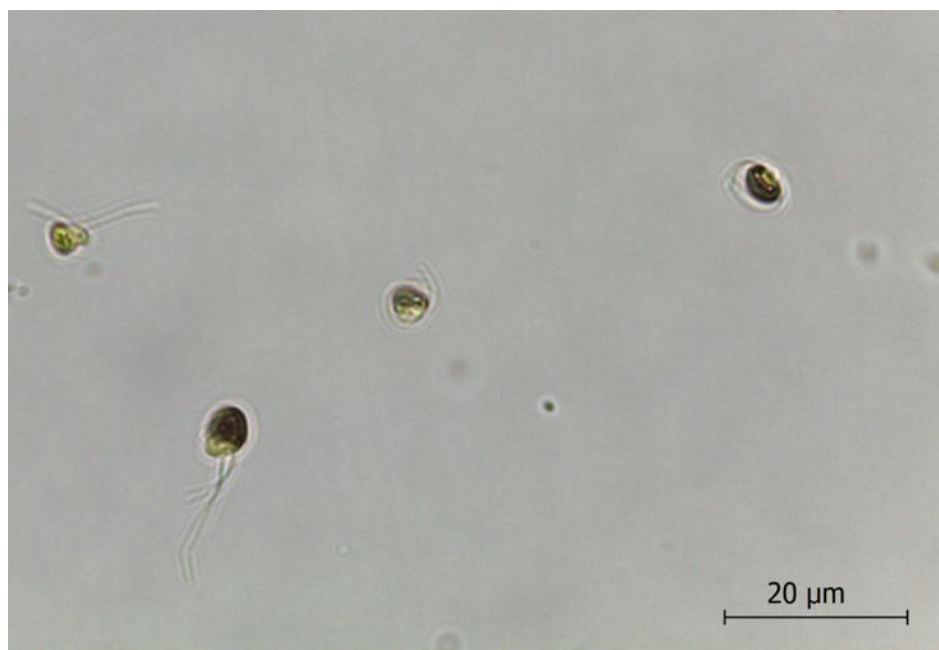


*Tetraselmis* sp.

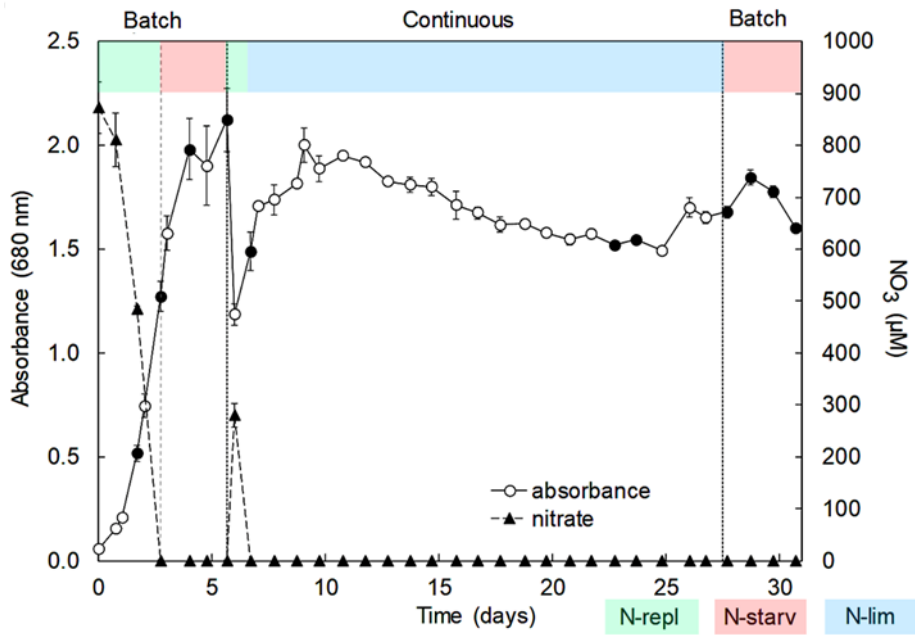


**Annexe 2.** Carotenoids distribution among the twelve microalgae species studied.

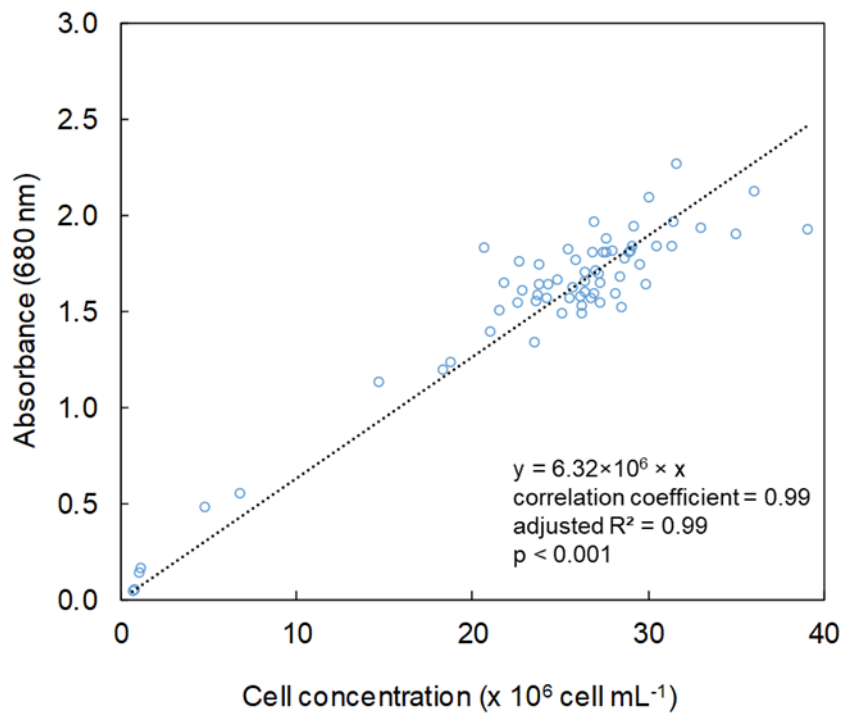




**Annexe 3.** Microphotography of *Nephroselmis* sp..



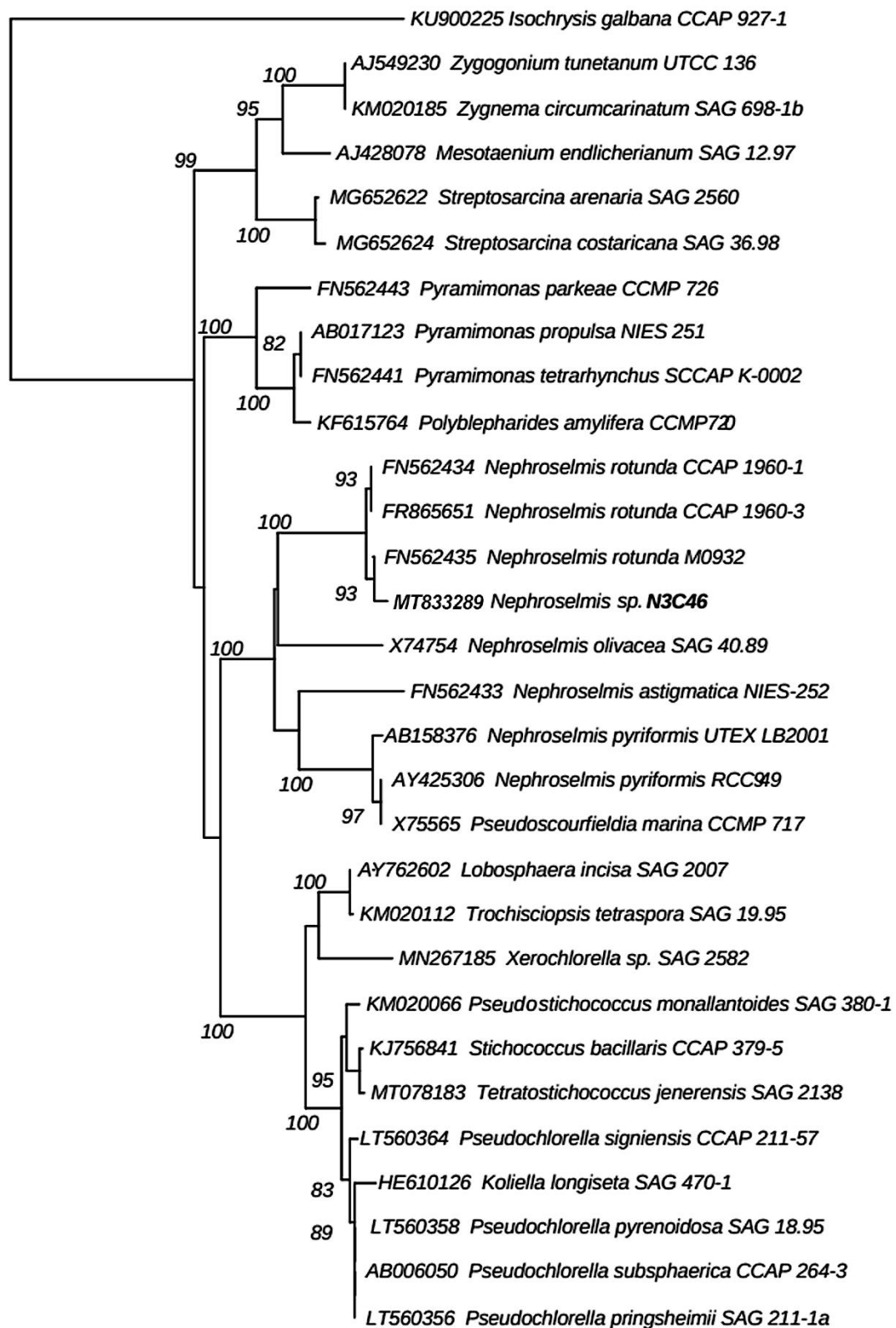
**Annexe 4.** Absorbance at 680 nm and residual nitrate concentration ( $\mu\text{M}$ ) over time of *Nephroselmis* sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity and carotenoids analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 2$ ).



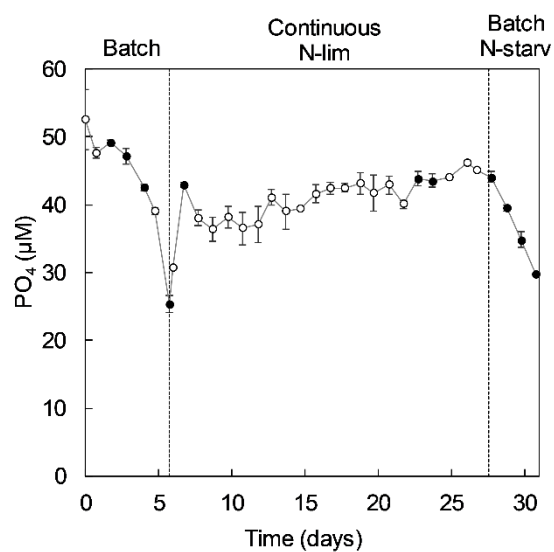
**Annexe 5.** Pearson's correlation analysis between cell concentration in cell mL<sup>-1</sup> and light absorbance at 680 nm.

BioNJ 1060 sites J-C 100 repl.

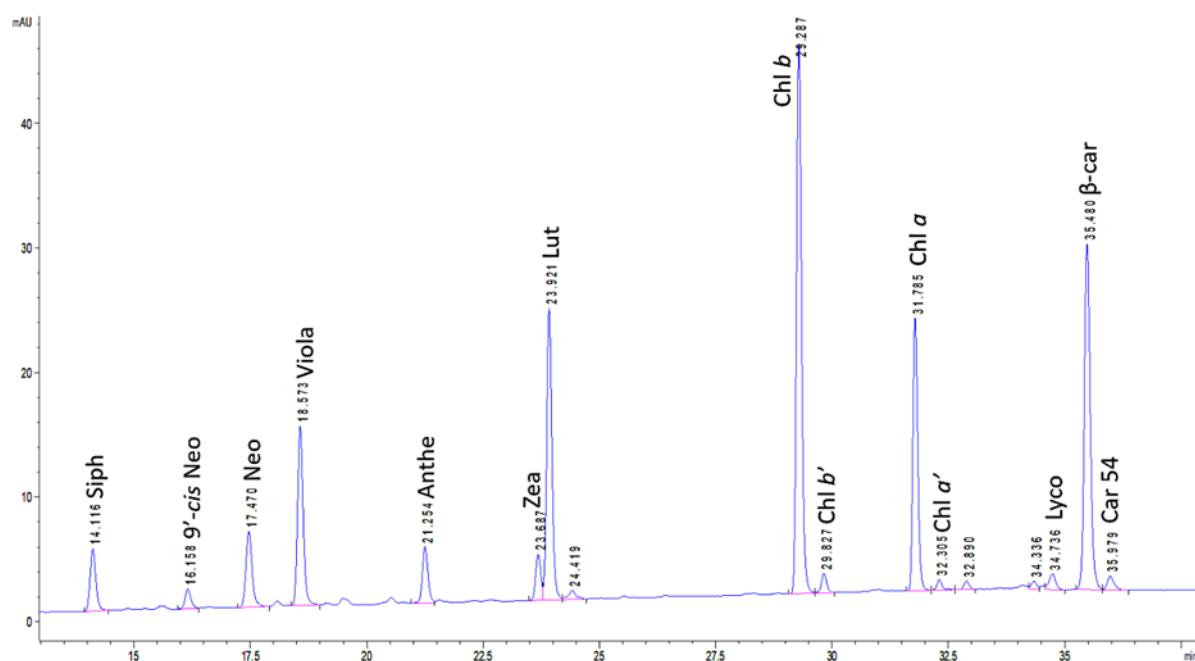
0.02



**Annexe 6.** Phylogenetic tree of *Nephroselmis* sp. N3C46 based on 18S rRNA sequences.



**Annexe 7.** Residual phosphate concentration ( $\mu\text{M}$ ) in the medium over time of *Nephroselmis* sp. cultures in PBRs in batch and continuous mode. Black dots represent sample collection for antioxidant activity measure and carotenoids analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE,  $n = 2$ ).



**Annexe 8.** HPLC chromatogram at 450 nm of ethanol extract of *Nephroselmis* sp.. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin; Viola, violaxanthin; Anthe, antheraxanthin; Zea, zeaxanthin; Lut, lutein; Chl, chlorophyll; Lyc, lycopene; β-car, β-carotene; Car 54, unidentified carotenoid (see Serive et al. (2017) for UV-vis spectrum of Car 54 in HPLC system)

			Siph	Neo	XCP	Lut	Lyco	β-car	TC	Chl a	Chl b
<b>Batch</b>		Day 2	5.00 ± 0.80 <sup>b</sup>	7.35 ± 1.47 <sup>b</sup>	9.50 ± 0.44 <sup>b</sup>	5.93 ± 0.10 <sup>bc</sup>	2.93 ± 0.12 <sup>abc</sup>	11.84 ± 0.73 <sup>ab</sup>	42.55 ± 2.99 <sup>b</sup>	73.75 ± 11.24 <sup>b</sup>	79.48 ± 6.40 <sup>b</sup>
		Day 3	6.36 ± 0.33 <sup>a</sup>	9.58 ± 0.75 <sup>a</sup>	12.14 ± 0.35 <sup>a</sup>	7.16 ± 0.06 <sup>ab</sup>	3.32 ± 0.37 <sup>a</sup>	12.14 ± 0.55 <sup>ab</sup>	50.70 ± 1.34 <sup>a</sup>	110.15 ± 3.79 <sup>a</sup>	102.97 ± 0.51 <sup>a</sup>
		Day 4	4.07 ± 0.32 <sup>b</sup>	6.08 ± 0.61 <sup>b</sup>	9.57 ± 0.36 <sup>b</sup>	7.13 ± 0.21 <sup>ab</sup>	2.99 ± 0.34 <sup>ab</sup>	11.71 ± 0.65 <sup>ab</sup>	41.55 ± 1.64 <sup>b</sup>	65.57 ± 2.81 <sup>bc</sup>	64.21 ± 3.30 <sup>c</sup>
		Day 6	2.35 ± 0.22 <sup>cd</sup>	4.04 ± 0.34 <sup>c</sup>	7.43 ± 0.19 <sup>cd</sup>	6.82 ± 0.24 <sup>abc</sup>	2.48 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	10.63 ± 0.40 <sup>bc</sup>	33.74 ± 1.30 <sup>c</sup>	41.67 ± 2.18 <sup>de</sup>	44.20 ± 2.02 <sup>d</sup>
<b>Continuous N-lim</b>	N-resupply	Day 7	4.01 ± 0.53 <sup>b</sup>	6.05 ± 1.12 <sup>b</sup>	8.60 ± 0.64 <sup>bc</sup>	7.97 ± 0.84 <sup>a</sup>	2.89 ± 0.17 <sup>abc</sup>	12.89 ± 1.43 <sup>a</sup>	42.40 ± 4.06 <sup>b</sup>	66.10 ± 5.93 <sup>b</sup>	63.94 ± 6.83 <sup>c</sup>
	Steady state	Day 23-24	2.66 ± 0.24 <sup>c</sup>	3.37 ± 0.47 <sup>cd</sup>	8.08 ± 0.75 <sup>bc</sup>	5.64 ± 0.54 <sup>bc</sup>	2.58 ± 0.28 <sup>bc</sup>	8.86 ± 0.74 <sup>c</sup>	31.20 ± 2.63 <sup>cd</sup>	51.82 ± 5.43 <sup>cd</sup>	45.92 ± 3.87 <sup>d</sup>
<b>Batch N-starvation</b>		Day 28	2.33 ± 0.07 <sup>cd</sup>	2.94 ± 0.00 <sup>cde</sup>	7.63 ± 0.29 <sup>cd</sup>	5.92 ± 0.36 <sup>bc</sup>	2.70 ± 0.09 <sup>abc</sup>	9.24 ± 0.59 <sup>c</sup>	30.76 ± 0.05 <sup>cd</sup>	45.66 ± 2.36 <sup>d</sup>	41.58 ± 2.79 <sup>de</sup>
		Day 29	1.32 ± 0.12 <sup>de</sup>	2.09 ± 0.06 <sup>de</sup>	6.08 ± 0.52 <sup>de</sup>	5.33 ± 0.47 <sup>c</sup>	2.26 ± 0.01 <sup>cd</sup>	9.42 ± 0.54 <sup>c</sup>	26.51 ± 0.59 <sup>d</sup>	29.61 ± 2.08 <sup>ef</sup>	30.05 ± 2.20 <sup>ef</sup>
		Day 30	1.05 ± 0.16 <sup>e</sup>	1.94 ± 0.15 <sup>e</sup>	5.84 ± 0.77 <sup>de</sup>	5.56 ± 0.85 <sup>bc</sup>	1.85 ± 0.23 <sup>d</sup>	10.61 ± 0.14 <sup>bc</sup>	26.84 ± 2.26 <sup>cd</sup>	24.25 ± 2.70 <sup>f</sup>	28.07 ± 2.92 <sup>f</sup>
		Day 31	0.74 ± 0.12 <sup>e</sup>	1.72 ± 0.25 <sup>e</sup>	5.24 ± 0.88 <sup>e</sup>	5.22 ± 1.00 <sup>c</sup>	0.95 ± 0.16 <sup>e</sup>	10.85 ± 0.44 <sup>abc</sup>	24.72 ± 2.78 <sup>d</sup>	20.69 ± 2.93 <sup>f</sup>	26.03 ± 2.87 <sup>f</sup>

**Annexe 9.** Pigment composition of *Nephroselmis* sp. (mg g<sup>-1</sup> DW) at different time of the culture. Siph, siphonaxanthin; Neo, neoxanthin (*trans* and *cis*); XCP, Xanthophyll Cycle Pigments (violaxanthin + antheraxanthin + zeaxanthin); Lut, lutein; Lyco, lycopene; β-Car, β-carotene; TC, total carotenoids; Chl a, chlorophyll a; Chl b, chlorophyll b. Data are expressed as mean ± standard error (SE, n = 2). Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05).

## Résumé

Une demande croissante d'antioxydants naturels alternatifs aux antioxydants synthétiques a émergé dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique et nutraceutique. La majorité des antioxydants naturels actuellement disponibles sur le marché sont issus des végétaux terrestres, cependant les microalgues par leur chimiodiversité, leur productivité et les possibilités de culture contrôlée offrent un grand potentiel.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer le potentiel de microalgues isolées en Nouvelle-Calédonie comme source d'antioxydants naturels. Une trentaine d'espèces de microalgues ont été isolées dans le lagon calédonien sur un critère de croissance par une méthode de dilution-exclusion. Un criblage de l'activité antioxydante a ensuite été réalisé sur douze de ces espèces, cultivées à deux intensités lumineuses (faible et forte) en utilisant quatre tests antioxydants différents : DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Les résultats du criblage antioxydant ont montré l'importance d'utiliser plusieurs tests antioxydants et l'impact notable de l'intensité lumineuse sur l'activité antioxydante. Le criblage a également permis de mettre en évidence deux espèces d'intérêt *Nephroselmis* sp. et *Tetraselmis* sp. pour lesquelles l'influence de certains paramètres de culture sur l'activité antioxydante a été étudiée.

*Nephroselmis* sp. a une forte capacité à neutraliser les radicaux peroxy grâce à un contenu important en caroténoïdes, et contient un caroténoïde d'intérêt encore peu étudié, la siphonaxanthine. Il a été montré qu'il était nécessaire que la culture de *Nephroselmis* sp. ne soit pas limitée en azote pour favoriser la production de caroténoïdes antioxydants, en particulier la siphonaxanthine.

*Tetraselmis* sp. a montré une forte capacité à inhiber la peroxydation des lipides. L'étude de l'influence du pH (6,5 et 8,5) et du mode de culture (batch vs continu) sur l'activité antioxydante et la photophysiology de *Tetraselmis* sp. ont mis en évidence l'importance de ces deux paramètres sur l'activité antioxydante qui est optimisée lorsque la microalgue est dans un bon état physiologique.

Ces résultats révèlent le potentiel des microalgues isolées en Nouvelle-Calédonie comme source d'antioxydants naturels, et l'impact important des conditions de culture sur l'activité antioxydante. La connaissance des différents mécanismes doit maintenant être approfondie sur des modèles cellulaires et l'origine des molécules impliquées doit être caractérisée par une approche métabolomique.

**Mots clés :** microalgues, antioxydant, Nouvelle-Calédonie, criblage, orientation métabolique, pigments

## Abstract

The demand has increased for natural antioxidant as an alternative to synthetic antioxidant for food, cosmetic and nutraceutical industry. Most natural antioxidant currently available on the market are derived from terrestrial plant. However, microalgae, with their chemodiversity, productivity and controlled cultivation possibilities, are a promising source of antioxidant.

The objective of this thesis is to evaluate the potential of microalgae isolated in New Caledonia as a source of natural antioxidants. About thirty species of microalgae were isolated in the caledonian lagoon for their high growth rate by a dilution-exclusion method. A screening of antioxidant activity was then carried out on twelve species, grown at two light intensities (low and high), using four different antioxidant assays: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) and TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). The results of the antioxidant screening showed the need to use several antioxidant assays and the significant impact of light intensity on antioxidant activity. The screening also highlighted two species of interest, *Nephroselmis* sp. and *Tetraselmis* sp.. The influence of some culture parameters on antioxidant activity was studied for these two species.

*Nephroselmis* sp. has a strong capacity to scavenge peroxy radicals owing to its high carotenoid content. In addition, this species has a carotenoid of interest that is still little studied, siphonaxanthin. It has been shown that the cultivation of *Nephroselmis* sp. should not be limited in nitrogen to promote the production of antioxidant carotenoids, in particular siphonaxanthin.

*Tetraselmis* sp. has been shown to have a strong capacity to inhibit lipid peroxidation. The study of the influence of pH (6.5 and 8.5) and culture mode (batch vs. continuous) on the antioxidant activity and photophysiology of *Tetraselmis* sp. highlighted the importance of these two parameters on the antioxidant activity which is optimized when the microalgae is in a good physiological state.

These results reveal the potential of microalgae isolated in New Caledonia as a source of natural antioxidants, and the high impact of culture conditions on antioxidant activity. Knowledge of the different mechanisms must now be deepened on cellular models and the origin of the molecules involved must be characterized by a metabolomic approach.

**Keywords:** microalgae, antioxidant, New Caledonia, screening, metabolic orientation, pigments