



HAL
open science

Etude des réponses du métabolisme de *Dunaliella* sp au stress abiotique pour une exploitation en thérapie : analyses génomiques et protéomiques

Fatma Elleuch

► **To cite this version:**

Fatma Elleuch. Etude des réponses du métabolisme de *Dunaliella* sp au stress abiotique pour une exploitation en thérapie : analyses génomiques et protéomiques. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université d'Orléans; École nationale d'ingénieurs de Sfax (Tunisie), 2019. Français. NNT : 2019ORLE3128 . tel-03704190

HAL Id: tel-03704190

<https://theses.hal.science/tel-03704190>

Submitted on 24 Jun 2022

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

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



Université d'Orléans
*École doctorale (santé, sciences biologiques et
chimie du vivant)*
Centre de Biophysique Moléculaire - CNRS

Université de Sfax
École Nationale d'Ingénieurs de Sfax
Ecole Doctorale Sciences et Technologies
N° d'ordre: 2019–11

THÈSE EN COTUTELLE présentée par :

Fatma ELLEUCH

Soutenue le : **28 décembre 2019**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans / Université de Sfax**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie / Génie
biologique

**Etude des réponses du métabolisme de *Dunaliella* sp au stress abiotique
pour une exploitation en thérapie: analyses génomiques et
protéomiques.**

THÈSE dirigée par :

Chantal PICHON Professeur, CBM (Université d'Orléans)
Imen FENDRI Maître de Conférences, FSS (Université de Sfax)

RAPPORTEURS :

Edith FILAIRE Professeur, GREENTECH, Clermont-Ferrand
Boulbéba SELMI Professeur, ISBM, Université de Monastir
Philippe Michaud Professeur, Université Clermont-Auvergne

JURY:

Ahmad REBAI Professeur, CBS, Président du jury, Université de Sfax
Edith FILAIRE Professeur, GREENTECH, Clermont-Ferrand
Boulbéba SELMI Professeur, ISBM, Université de Monastir
Philippe Michaud Professeur, Université Clermont-Auvergne
Patrick BARIL Maître de Conférences, CBM, Université d'Orléans
Chantal PICHON Professeur, CBM, Université d'Orléans
Imen FENDRI Maître de Conférences, FSS, Université de Sfax

Remerciements

« Ressentir de la gratitude sans l'exprimer, c'est comme emballer un cadeau et ne pas le donner. » William Arthur Ward

J'aimerais tout d'abord remercier mes directrices de thèse **Dr. Imen FENDRI**, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Sfax (Université de Sfax) et **Pr. Chantal PICHON**, Professeur au Centre de Biophysique Moléculaire (Université d'Orléans) pour m'avoir donné leur confiance, encadré et accompagné tout au long de ce travail avec beaucoup de patience et de pédagogie. Vous avez toujours été disponibles, à l'écoute et attentives à mon moral ce qui fait preuve de grandes qualités humaines.

Je remercie également **Pr. Edith FILAIRE**, directrice de la Société Greentech à Clermont-Ferrand ; **Pr. Boulbéba SELMI**, Professeur à l'ISBM (Université de Monastir) et **Pr. Philippe Michaud**, Professeur à Polytech-Clermont Ferrand pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour leurs remarques pertinentes. Je tiens également à remercier **Dr. Patrick BARIL**, Maître de Conférences à l'Université d'Orléans et **Pr. Ahmad REBAI**, Professeur au Centre de Biotechnologies de Sfax de m'avoir honorée en acceptant de faire partie de mon jury en tant qu'examineur et président, respectivement.

Je remercie Campus France, pour m'avoir accordé la Bourse d'Excellence Eiffel, Le ministère d'enseignement supérieur Tunisien pour les bourses d'alternance et l'Université d'Orléans pour l'aide à la mobilité à travers le projet pics

Je remercie également **Pr. Slim ABDELKAFI**, Directeur de l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS) et de l'Unité de Biotechnologie des Algues de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je le remercie vivement pour ses conseils et sa disponibilité malgré toutes ses responsabilités.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Dr. Patrick Baril** pour ses conseils précieux, son impressionnante directive et pour avoir toujours su faire preuve d'une grande disponibilité. C'était vraiment un plaisir pour moi de travailler avec vous.

J'adresse mes sincères remerciements à **Dr. Hajer Ben Hlima**, Maître Assistante à l'ENIS de m'avoir accompagné dans la partie modélisation. Je dois beaucoup à ses encouragements, ses conseils et ses suggestions.

Rudy Clemençon, un grand merci pour votre aide dans la réalisation des expérimentations *in vivo*. Les discussions avec vous m'ont été très enrichissantes.

J'exprime mes respectueuses reconnaissances à **Dr. Bilel Hadrich**, Maître Assistant à l'ENIS, pour son aide dans l'analyse du plan d'expérience.

Je tiens à prouver mon amitié et ma reconnaissance à tous les chercheurs et membres de l'équipe UBA : **Mouna Dammak, Mohamed Barkallah, Faiez Hentati, Nesrine Karkouch, Feten Ben Amor, Hana Derbel, Jihen Elleuch, Olfa Baccari et Siwar Chaari**.

Un merci tout spécial pour mon artiste de rose **Vinni**, je suis très contente de ton amitié. Merci pour nos sorties festives et nos confidences...

Merci également pour **Pinpin**, nous avons fait un bon mélange entre arabe anglais chinois et français et Google traduction.

Je remercie aussi **Geoffrey**, mon fournisseur de cellules, notre petite maman **Caroline, Elodie, Florence, Justine, Mohamed, Mahdi, Maamar ...**, **Federico, Yoan, Delphine, Amandine et Christine**. J'exprime ma reconnaissance à tous les autres membres de l'équipe Thérapies Innovantes et Nanomédecine pour la très bonne humeur et l'ambiance au sein du groupe.

Je tiens également à remercier **David Gosset** responsable de la plateforme de Cytométrie et imagerie cellulaire.

Je clôture cette espace par un dédicace à ma famille : mes parents **EZZEDDINE** et **SOULEF**, les raisons de mon existence. Nul mot n'exprime ma gratitude pour vos sacrifices consenties pour mon éducation et mon bien être. Que ce travail soit un modeste témoignage de ma grande affection. A mes frères **Faeiz, Mohamed et Ibrahim** qui ne cessent de m'entourer d'aide et d'encouragement. A mon fiancé

FIRAS d'être à mes côtés pour me soutenir, encourager et donner du gout à ma vie, pour son amour, pour sa tendresse. J'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Table des matières

Introduction	1
Synthèse Bibliographique	3
A. Les algues	3
1. Phycologie : étude des algues.....	3
1.1. <i>Caractéristiques générales</i>	3
1.2. <i>Milieu de vie</i>	4
1.3. <i>Classification</i>	5
2. Voie métabolique	11
2.1. <i>Photosynthèse</i>	11
2.2. <i>Caroténogenèse</i>	15
2.3. <i>Lipogenèse</i>	18
2.4. <i>Synthèse de glycérol</i>	19
2.5. <i>Synthèse des Acides aminés, des antioxydants et des phytohormones</i>	19
3. Domaines d'utilisation des algues	20
3.1. <i>Alimentation humaine</i>	20
3.2. <i>Alimentation animale</i>	22
3.3. <i>En cosmétique</i>	22
3.4. <i>En agriculture</i>	22
3.5. <i>Domaine énergétique</i>	22
3.6. <i>Domaine environnemental et biomatériaux</i>	23
3.7. <i>Domaine de la biotechnologie</i>	23
4. Production et modes de culture des algues.....	24
5. <i>Dunaliella</i>	25
5.1. <i>Présentation générale</i>	25
5.2. <i>Production de Dunaliella</i>	26
5.3. <i>Etat des lieux des stress appliqués à Dunaliella</i>	30
5.4. <i>Mécanisme de réponse au stress chez Dunaliella</i>	33
6. Structure de la LYBC	34
B. Le cancer	34
1. Généralités.....	34
1.1. <i>Chiffres et idée générale sur le cancer</i>	34

1.2.	<i>Les différents types de cancer</i>	35
1.3.	<i>Les facteurs de risques</i>	36
1.4.	<i>Carcinogenèse</i>	37
1.5.	<i>Traitements</i>	38
2.	Cancer de sein	38
2.1.	<i>Anatomie du sein</i>	38
2.2.	<i>Incidence du cancer du sein</i>	39
2.3.	<i>Les différents stades du cancer de sein</i>	40
2.4.	<i>Classification</i>	41
3.	TNBC	41
3.1.	<i>Aspect général</i>	41
3.2.	<i>Classification du TNBC</i>	42
3.3.	<i>Traitements contre TNBC</i>	43
4.	Les voies de mort cellulaire	45
4.1.	<i>Apoptose</i>	45
4.2.	<i>Nécrose</i>	50
4.3.	<i>Autophagie</i>	50
4.4.	<i>Autres formes de mort cellulaire</i>	51
4.5.	<i>PARP : marqueur d'apoptose</i>	52
5.	Immunologie des cancers	53
5.1.	<i>Cellules de l'immunité innée</i>	54
5.2.	<i>Cellules de l'immunité adaptative</i>	62
5.3.	<i>Mécanisme d'échappement : anomalie du système immunitaire</i>	68
5.4.	<i>Les TILs</i>	69
	Matériel et méthodes	70
1.	Matériel	70
1.1.	<i>Microalgues</i>	70
1.2.	<i>Milieu de culture de <i>Dunaliella</i></i>	70
1.3.	<i>Les lignées cellulaires sélectionnées</i>	70
1.4.	<i>Milieus de cultures des cellules cancéreuses</i>	71
1.5.	<i>Les souris</i>	71
2.	Méthodes	71
2.1.	<i>Conditions de culture de <i>Duanliella</i></i>	71

2.2.	<i>Approches de modélisation pour les simulations et les prédictions du plan d'expérience</i>	72
2.3.	<i>Suivi de la croissance</i>	74
2.4.	<i>Extraction des pigments</i>	74
2.5.	<i>Analyse des cellules algales par cytométrie en flux</i>	74
2.6.	<i>Observations au microscope épi-fluorescent</i>	75
2.7.	<i>Extraction des ARN totaux</i>	75
2.8.	<i>qRT-PCR</i>	76
2.9.	<i>Analyse des protéines in silico : modélisation moléculaire</i>	79
2.10.	<i>Préparation des extraits</i>	81
2.11.	<i>Culture cellulaire</i>	82
2.12.	<i>Test XTT : test de viabilité</i>	82
2.13.	<i>Dosage de la Lactate Déshydrogénase : test de cytotoxicité</i>	83
2.14.	<i>Test au Cristal violet</i>	84
2.15.	<i>Dosage des ROS</i>	84
2.16.	<i>Evaluation de l'apoptose par le kit Annexine V/PI</i>	84
2.17.	<i>Mesure de la fluorescence</i>	85
2.18.	<i>Microscopie à épifluorescence</i>	85
2.19.	<i>Microscopie confocale</i>	85
2.20.	<i>Le test TUNEL</i>	86
2.21.	<i>Fragmentation de l'ADN</i>	87
2.22.	<i>Transfert des protéines sur membrane (Western blot)</i>	87
2.23.	<i>Test in vivo</i>	89
	Résultats et discussion	93
	Chapitre 1 : Réponse de <i>Dunaliella</i> sp. à la condition de caroténogenèse au niveau transcriptionnel.....	93
1.	Optimisation des conditions de cultures de <i>Dunaliella</i> sp. pour une sur-production de caroténoïdes	93
1.1.	<i>Estimation du modèle</i>	93
1.2.	<i>Analyse statistique et validation du modèle</i>	95
1.3.	<i>Interprétation du modèle de surface de réponse</i>	96
1.4.	<i>Condition optimale</i>	98
1.5.	<i>Validation du modèle</i>	98
1.6.	<i>Comparaison de cette condition optimale à la littérature</i>	98

1.7.	<i>Caractérisation de Dunaliella en fonction des conditions de culture :</i>	101
2.	Etude transcriptionnelle	108
2.1.	<i>Optimisation de la méthodologie d'extraction des ARN totaux</i>	108
2.2.	<i>Validation des amorces choisies</i>	109
2.3.	<i>Efficacité d'amplification</i>	111
2.4.	<i>Criblage du meilleur gène de référence</i>	113
2.5.	<i>Profil d'expression génique dans les conditions de stress</i>	114
2.6.	<i>Modélisation moléculaire</i>	120
Chapitre 2 : activité anticancéreuse de <i>Dunaliella</i> sp.		130
1.	Evaluation de l'activité des extraits de <i>Dunaliella in vitro</i>	130
1.1.	<i>Sensibilité des cellules 4T1</i>	130
1.2.	<i>Evaluation de la cytotoxicité sur des cellules A549 et des cellules HeLa</i>	135
1.3.	<i>Relargage de LDH</i>	136
1.4.	<i>Test au Cristal violet</i>	137
1.5.	<i>Dosage des espèces réactives d'oxygène (ROS)</i>	137
1.6.	<i>Annexine V/PI</i>	138
1.7.	<i>Mesure de l'autofluorescence des extraits</i>	142
1.8.	<i>Observations microscopiques des cellules 4T1</i>	142
1.8.1.	<i>Observation au microscope épifluorescent</i>	143
1.8.2.	<i>Observation au microscope confocale</i>	143
1.9.	<i>Fragmentation de l'ADN suite à la mort cellulaire</i>	144
1.9.1.	<i>Analyse de la mort cellulaire par Profil de fragmentation de l'ADNg</i>	144
1.9.2.	<i>Test TUNEL</i>	145
1.10.	<i>Expression des protéines apoptotiques</i>	146
2.	Evaluation de l'activité anticancéreuse <i>in vivo</i>	150
2.1.	<i>Effet des extraits aqueux sur la taille des tumeurs implantées</i>	150
2.2.	<i>Réponse immunitaire des souris</i>	151
2.1.	<i>La réponse immunitaire au niveau transcriptionnelle</i>	153
Conclusions et perspectives		156
Liste bibliographique		157
Annexes		189

Liste des figures

Figure 1. Répartition des algues suivant les longueurs d'onde des radiations (http://www.edu.upmc.fr/uel/biologie/).....	4
Figure 2. (A) Les longueurs d'onde d'absorption des pigments : chlorophylles a et b, caroténoïdes, phycoérythrine, phycocyanine (http://www.cima.ualg.pt/) (B) Les différentes structures de chlorophylle : (a) chl a, (b) chl b, (c) chl d, (d) chl c ₁ , (e) chl c ₂	13
Figure 3. Mécanisme de photosynthèse, phase lumineuse (claire) et phase obscure (Cycle de Calvin) (Singh et al., 2014).....	14
Figure 4. Modèle hypothétique de la voie de caroténogénèse chez <i>Dunaliella</i> (Ye et al., 2008) présentant la structure des caroténoïdes synthétisés. Les enzymes correspondraient à : PSY: phytoene synthase; PDS: phytoene desaturase; ZDS: ζ-carotene desaturase; LYC-E: lycopene ε-cyclase; LYC-B: lycopene β-cyclase; EHY: ε-carotene hydroxylase; BHY: β-carotene hydroxylase; ZEP: zeaxanthin epoxydase; NXS: neoxanthin synthase.....	17
Figure 5. Voies de synthèse des lipides chez les microalgues. Abréviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACP, acyl-carrier protein; LACS, long-chain acyl-CoA synthetase; ATP:CL, ATP-dependent citrate lyase; CoA, coenzyme A; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; FAS, fatty acid synthase; FAT, fatty acyl-ACP thioesterase; G3P, glycerate-3-phosphate; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; LPAAT, lyso-phosphatidic acid acyltransferase; LPAT, lyso-phosphatidylcholine acyltransferase; PDC, pyruvate dehydrogenase complex; TAG, triacylglycerol (Bellou et al., 2014).....	18
Figure 6. Voie de synthèse des acides aminés (https://en.wikipedia.org/wiki/File:Amino_acid_biosynthesis_overview.png).....	20
Figure 7. Schéma anatomique du sein chez les femmes (https://www.ligue-cancer.net/article/26094_cancer-du-sein).....	39
Figure 8. Les différentes voies d'apoptose (Elmore, 2007).....	47
Figure 9. Ordre d'influence des facteurs testés et leurs interaction sur la réponse, (A) Diagramme de Pareto d'estimation de l'effet normalisé ; (B) Diagramme normal.....	94
Figure 10. Les résidus bruts vs les valeurs prédites (A); Les valeurs prédites vs les valeurs observées (B).....	96
Figure 11. Tracés de contour et tracé de surface de réponse 3D correspondant aux effets des divers facteurs sur la production de caroténoïdes chez <i>Dunaliella</i> sp: (A) réponse par rapport	

à l'azote et la salinité avec intensité lumineuse fixée à son niveau 0, (B) réponse contre azote et intensité lumineuse, la salinité a été fixée à son niveau 0 (C) réponse par rapport à la variation de la salinité et à de l'intensité lumineuse tout en maintenant le niveau d'azote à 0,97	
Figure 12. Tracé des moyennes marginales et des limites de confiance à une erreur de 5%..	98
Figure 13. Courbe de croissance de DSC et DSS au bout de 30 jours de culture par comptage cellulaire sur cellule de Malassez	101
Figure 14. Suivi de la production des pigments de DSC et DSS pendant un mois en μg de pigments/ml de culture (A) et par pg de pigments/cellules (B)	103
Figure 15. Analyse en cytométrie en flux: définition des populations de DSC (A.gauche) et DSS (A.droite). (B) Intensités moyennes de fluorescence de <i>Dunaliella</i> sp. par excitation avec les lasers FL1 (530/30 nm), FL2 (575/26 nm) et FL3 (682/13 nm).	106
Figure 16. Analyse des cellules marquées au NR par cytométrie en flux	107
Figure 17. Mise au point de l'extraction des ARNt chez DSC et DSS. (A) 1 ou 0 lavage du culot de <i>Dunaliella</i> , (B) Elimination des étapes de lavages et ajout de lavage de l'ARN piégé dans la colonne, 3 ou 4 lavages, (C) extraction d'ARN sans lavage du culot et avec 3 lavages d'ARN au tampon RPE.....	108
Figure 18. Validation de la spécificité des amorces codant pour les gènes <i>Eno</i> , <i>HSP70</i> , <i>RPE</i> , <i>Cgp</i> , <i>DXS</i> , <i>LCYB</i> , $\alpha\text{-tub}$, $\beta\text{-tub}$ 18S et <i>Act</i> ; (A) par migration sur gel d'agarose, (B) par analyse des courbes de fusion	110
Figure 19. Calcul des efficacités des PCR amplifiant les gènes <i>Eno</i> , <i>HSP70</i> , <i>RPE</i> , <i>Cgp</i> , <i>DXS</i> , <i>LCYB</i> , $\alpha\text{-tub}$, $\beta\text{-tub}$, 18S et <i>Act</i> par le logiciel <i>LightCycler® 480</i> , Version 1.5 (Roche).	112
Figure 20. Criblage du meilleur gène de ménage parmi $\alpha\text{-Tub}$ et $\beta\text{-Tub}$, 18S et <i>Act</i> moyennant (A) <i>RefFinder</i> et (B) <i>GeNorme</i>	114
Figure 21. Niveaux d'expression des gènes : (A) <i>ENO</i> , (B) <i>DXS</i> , (C) <i>LCYB</i> , (D) <i>Cgp</i> , (E) <i>HSP70</i> , (F) <i>RPE</i> en fonction du temps de stress appliqué. Les quantifications ont été normalisées par rapport au gène $\alpha\text{-Tub}$. L'astérisque indique une différence significative entre les expressions des gènes à différents moments de stress, selon le test ANOVA unidirectionnel suivi par le test de Tukey. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$. Les données sont exprimées en tant que moyennes \pm SD ($n = 3$).	119
Figure 22. Analyse par Northern blot d' <i>ENO</i> , <i>LCYB</i> , <i>DXS</i> , <i>Cgp</i> , <i>HSP70</i> , <i>RPE</i> , $\alpha\text{-Tub}$ chez DSC et DSS après 72h de culture cellulaire. L'intensité des bandes sont en corrélation avec les valeurs trouvées par PCR quantitative	120
Figure 23. La séquence de <i>LCYB</i> de <i>D. salina</i> retrouvée (A) et son alignement dans la banque de données du NCBI (B).....	121

Figure 24 . <i>Alignement de séquences multiples de LCYB de D. salina par rapport à d'autres LCYB. ACA34344.1 : numéro d'accès de LCYB de Dunaliella salina ; AAO649777.1: numéro d'accession de LCYB de Haematococcus lacustris ; AAA81880.1: numéro d'accession de LCYB d'Arabidopsis thaliana ; WP_012166204.1: numéro d'accession de LCYB d'Acaryochloris marina.</i>	122
Figure 25. <i>Représentation en ruban du modèle 3D LCYB montrant les deux domaines (le domaine catalytique et le domaine transmembranaire)</i>	123
Figure 26. <i>Prédiction de la partie transmembranaire de LYCB par le serveur TMHM</i>	123
Figure 27. (A) <i>La molécule de FAD ancrée dans le site de liaison du FAD est représentée par un bâton jaune; (B) mode de liaison du cofacteur FAD. Les interactions observées entre le récepteur et le ligand polaire sont représentées par des lignes pointillées rouges et les résidus impliqués dans ces contacts sont représentés par des bâtons bleus; (C) détermination du volume (en rouge) du site probable de liaison FAD.</i>	125
Figure 28. (A) <i>Représentation de la surface de LCYB montrant le tunnel de liaison au substrat avec le site de liaison du FAD avec une molécule de FAD amarrée (Le modèle 3D est présenté comme un modèle de surface de couleur bleue. Le site de liaison au substrat sont indiqués par des flèches en pointillés noirs et marqués de manière appropriée. (B) calcul du volume du site de liaison au substrat à l'aide du programme CAST</i>	126
Figure 29. <i>Séquence de Cgp choisie de D. salina (A) et son alignement dans la banque de donnée du NCBI (B)</i>	127
Figure 30. <i>Modèle 3D de la protéine SUMO de Dunaliella sp. (A) Modèle 3D de LCYB montrant la molécule de FAD ancrée, les motifs d'interaction SUMO et le site de lysine SUMO de couleur jaune (B).</i>	129
Figure 31. <i>Histogrammes représentant les pourcentages de viabilité des cellules 4TI après traitement avec les extraits de DSC pendant (A) 24 h et (B) 48 h.</i>	131
Figure 32. <i>Histogrammes représentant les pourcentages de viabilité des cellules 4TI après traitement avec les différents extraits DSS pendant (A) 24 h et (B) 48 h.</i>	133
Figure 33. <i>Les CI50 des extraits aqueux de DSS et DSC suite au traitement des cellules 4TI pendant (A) 24 h et (B) 48 h</i>	134
Figure 34. <i>Histogrammes représentant le pourcentage de viabilité des cellules (A) A549, (B) Hela, après traitement pendant 48 h avec des extraits aqueux de DSC et DSS</i>	135
Figure 35. <i>Evaluation de la cytotoxicité des extraits aqueux par mesure du relargage de la LDH après 24 h de traitement.</i>	136

Figure 36. Coloration au cristal violet après traitements aux extraits aqueux de DSC et DSS pendant 48 h.	137
Figure 37. Production des ROS suite au traitement aux extraits aqueux pendant 24.....	138
Figure 38. Principe du marquage à l'Annexine V/PI.....	139
Figure 39. Visualisation du mécanisme d'apoptose par test Annexine V/PI, (A) contrôle négatif (cellules NT) et contrôle positif (traitement au FA3% dans la glace pendant 30 min), (B) vérification de la supposition du camouflage de la fluorescence de PI par analyse des cellules traitées au DSS 0,2 pendant 4h avec et sans marquage PI, (C) traitement des cellules 4T1 à l'extrait aqueux de DSS pendant 2, 4 et 24 h aux doses 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 mg/ml, (D) traitement des cellules 4T1 à l'extrait aqueux de DSC pendant 2, 4 et 24 h aux doses 0,05, 0,1 et 0,2 mg/ml.....	142
Figure 40. Spectre de fluorescence des extraits aqueux de DSC et DSS solubilisés dans du PBS à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm.....	142
Figure 41. Fluorescence des cellules 4T1 traitées pendant 6h aux extraits aqueux de DSC et DSS, (A) contrôle négatif, cellules non traitées; (B) DSC à la dose 1 mg/ml (C) DSC à la dose 0,5 mg/ml, (D) DSS à la dose 1 mg/ml, (E) DSS à la dose 0,5 mg/ml.....	143
Figure 42. Analyse par microscopie confocale de cellules 4T1 traitées aux extraits aqueux DSC et DSS (1 mg/ml). (A) contrôle négatif, cellules non traitées; (B) traitement avec l'extrait DSC pendant 2h, (C)traitement avec l'extrait DSC pendant 6h, (D) traitement avec extrait DSS pendant 2h, (E) traitement avec extrait DSS pendant 6h.	143
Figure 43. Électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des ADNg de cellules 4T1 incubées pendant 48 h avec les extraits aqueux DSC et DSS. Pistes 1, 5 et 9 : marqueur moléculaire de 1 kb, pistes 2, 6 et 10 : ADN de cellules 4T1 non traitées, piste 3 : traitement avec l'extrait DSC à 0,5 mg/ml, piste 4 : traitement avec l'extrait DSC à 0,75 mg/ml, piste 7 : traitement avec l'extrait de DSS à 0,5 mg/ml, piste 8 : traitement à 0,2 mg/ml de l'extrait DSS, piste 11 : traitement à la Staurosporine (témoin positif).	145
Figure 44. Détection des cellules apoptotiques in situ par la fragmentation d'ADN et sa révélation au TUNEL. Les cellules apoptotiques sont colorées en brun foncé (contre colorées à l'hématoxyline). (A) cellules non-traitées, (B) cellules traitées à la DNase 10U pendant 20 min (control positif), (C) cellules traitées à la DNase en absence de l'enzyme TdT dans le mélange réactionnel de TUNEL (contrôle négatif), (D) traitement avec l'extrait DSS à 0,2 mg/ml pendant 18h, (E) traitement avec l'extrait DSS à 0,2 mg/ml pendant 24 h, (Fet F') traitement avec l'extrait DSS à 0,5 mg/ml pendant 24 h avec les grandissement x10 et x40	

<i>respectivement, (G) traitement avec l'extrait DSC à 0,2 mg/ml pendant 18h, (H) traitement avec l'extrait DSC à 0,2 mg/ml pendant 24 h</i>	<i>146</i>
<i>Figure 45. Activation des caspase-3 et -9 accompagnée du clivage de PARP-1, (A) suivi des protéines apoptotiques chez les cellules 4T1 non-traitées et traitées à la staurosporine 10µM (contrôl positif), (B) effet des extraits de DSC et DSS à 0,5 mg/ml à différents instants, (C) quantification de l'expression de caspase-3 sous forme activée et non-activée par rapport à l'actine des cellules NT, (D) quantification de l'expression de caspase-9 sous forme activée par rapport à l'actine des cellules NT, (E) quantification de l'expression de PARP-1 sous forme clivée et non-activée par rapport à l'actine des cellules NT. Les moyennes des intensités de bandes quantifiées par image j, sont présentées en fonction des écartypes (SD) de trois acquisitions</i>	<i>149</i>
<i>Figure 46. Effet de traitement par les extraits aqueux DSC et DSS sur les souris Balb/c ayant développé un cancer de sein suite à l'injection de cellules 4T1. (A) volume relative de l'évolution des tumeurs au cours du traitement. (B) suivi de la masse des souris au cours du traitement.</i>	<i>151</i>
<i>Figure 47. Analyse des TIL après 14 jours de traitement dans la tumeur</i>	<i>153</i>
<i>Figure 48. Niveau d'expression relatif de l'Arg-1, NOS-2 et COX-2 après traitement par DSC et DSS par normalisation contre le gène GAPDH. Les résultats indiqués sont des valeurs moyennes. ± Erreur standard de la moyenne où (# p <0,05) indique une différence significative entre les expressions du gène chez les souris traitées au PBS et celles traitées à l'extrait, selon le test One-way ANOVA suivi du test de Tukey en utilisant le test Origin 8..</i>	<i>154</i>

Liste des tableaux

Tableau 1. <i>Classification des algues (Fritsch, 1923, 1922; J and Chapman, 1973); Chl : Chlorophylle ; carot : carotène ; APC: allophycocyanine ; PC : phycocyanine, PE : phycoérythrine</i>	6
Tableau 2. <i>Classification des algues selon leur embranchement (en se basant sur les données de (Ruggiero et al., 2015) et (https://www.algaebase.org/))</i>	8
Tableau 3. <i>Molécules de réserve des produits de la photosynthèse (Metting, 1996)</i>	12
Tableau 4. <i>Exemples d'utilisation de D. salina dans des applications thérapeutiques</i>	28
Tableau 5. <i>Exemple de quelques études analysant l'effet de stress sur la production de certains métabolites chez Dunaliella. Abb : dehydroascorbate (DHA), glutathione forme réduite et oxydée (GSH and GSSG), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD)</i>	30
Tableau 6. <i>Variables codées et gamme expérimentale de facteurs sélectionnés pour l'optimisation de la production de caroténoïdes</i>	73
Tableau 7. <i>Plan expérimental de la matrice Box-Behnken et évaluation de la quantité de caroténoïdes produits</i>	73
Tableau 8. <i>Amorces utilisées et leurs caractéristiques : taille des amplicons correspondants, température de fusion Tm (° C) basée sur l'analyse de la courbe de fusion, l'efficacité d'amplification E (%) et référence ou numéro d'accès</i>	78
Tableau 9. <i>Liste des anticorps utilisés pour la détection des TILs</i>	90
Tableau 10. <i>Liste des amorces utilisées dans la caractérisation de la réponse immunitaire des souris</i>	92
Tableau 11. <i>Coefficients estimatifs et statiques de l'optimisation des caroténoïdes : Tableau de Student ; les facteurs significatifs sont présentés en gras ; (p <0,001) Très significatif; (p <0,01) modérément significatif; (p <0,05) marginalement significatif; L: terme linéaire; Q: terme quadratique;</i>	94
Tableau 12. <i>Analyse de variance (ANOVA) de l'optimisation des caroténoïdes chez Dunaliella</i>	95
Tableau 13. <i>Observation microscopique de Dunaliella sp. à différentes stades de sa croissance</i>	104
Tableau 14. <i>Observation des cellules DSC et DSS au microscope à épifluorescence</i>	105

Tableau 15. *Motifs d'interaction SUMO putatifs dans CGP et LCYB montrant les scores des sites prédits (en gras) et le résidu de lysine impliqué dans l'interaction avec SUMO (souligné)*
..... 128

Liste des abréviations

2-PGA : D-2-phosphoglycérate	Cgp : carotene globule protein
AA: African-American	Chl : Chlorophylle
Aa: acide aminé	CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
Act: Actine	CPA : cellule présentatrice d'antigène
ADH: acide docosahexaénoïque	CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques
AGPI: Acides Gras Poly-Insaturés	CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
AIF: Apoptosis Inducing Factor	DAB:diaminobenzidine
ALA : acide α -linoléique	DBD : DNA-binding domain
AMD : domaine d'auto-modification	DCIS : carcinome canalaire in situ
AMPK: AMP-activated protein kinase	DED : death effector domain
Apaf-1: Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	DHA: dehydroascorbate
APC: allophycocyanine	DHAP: dihydroxyacétone phosphate
APX: ascorbate peroxidase	DHAR: dehydroascorbate reductase
ARA: acide arachidonique	DISC : death-inducing signaling complex
ASW: Artificial SeaWater	DMAPP : diméthylallyl diphosphate
Bcl: B-cell lymphoma	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
BHY: β -carotene hydroxylase	DMSO : Diméthylsulfoxyde
BLBC: basal-like breast cancer	DOE: Department of Energy
BRCA : BREast CANcer	DXP : désoxyxylulose 5-phosphate
BSA :Bovine Serum Albumin	DXR : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase
CAD: Caspase Activated DNase	DXS : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
Carot : carotène	EADS: European Aeronautic Defence and Space company
CAR-T: Chimeric Antigen Receptor	
c-FLIP: cellular FLICE-like inhibitory protein	

EDTA : Éthylènediaminotétracétique	HSP70 : chloroplast-localised heat shock protein
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	IA : immunité adaptative
EHY: ε-carotène hydroxylase	IAP:Inhibitor of Apoptosis Proteins
Eno : Enolase	ICAD: Inhibitor of Caspase Activated DNase
EPA : acide éicosapentaénoïque	II : immunité innée
FAD: flavin adenine dinucleotide	INCa : Institut National Du Cancer
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain	IPP : isopentényl pyrophosphate
FBS: Fetal Bovine Serum	JGI: Joint Genome Institute
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate	LAK : Lymphokine-Activated Killer
Flt3L: Fms-like tyrosine kinase 3 ligand	LCYB : Lycopène β-cyclase
FOXP3: forkhead box P3	LDH :lactate-déshydrogénase
FSC: Forward Scatter	LYC-E: lycopene ε-cyclase
G3P : Glycéraldéhyde 3-phosphate	MDHAR: monodehydroascorbate reductase
GGPP : géranylgeranyl pyrophosphate	MDSC: myeloid-derived suppressor cells
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor	MEP : 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphat
GOE:Great Oxidation Event	MMP : métalloprotéases matricielles
GPDH: glycérol 3-phosphate déshydrogénase	MPT: mitochondrial permeability transition
GR: glutathione reductase	mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
GSH : glutathione forme réduite	MVA : Voie du mévalonate
GSSG : glutathione forme oxydée	NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2	NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
HIF : Hypoxia Inducible Factors	NK : Natural Killer
HPV : Human PapillomaVirus	NXS: neoxanthin synthase
HRP : horseradish peroxidase	PARP: poly(ADP-ribose) polymérase

PBS: Phosphate-buffered saline
 PC : phycocyanine
 pCR : réponse complète pathologique
 PDB: Protein Data Bank
 PDS: phytoene desaturase
 PE : phycoérythrine
 PI :Propidium Iodide
 PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle
 PS :PhosphatidylSérine
 PSI,PSII : PhotoSystème I et II
 PSY: phytoene synthase
 PVDF : Polyfluorure de vinylidène
 QNBC: Quadruple-negative breast cancer
 RA : récepteurs d'Androgène
 RE :récepteurs d'estrogène
 RI : réaction immunitaire
 RIP: Receptor-interacting protein
 RIPA : Radioimmunoprecipitation assay
 RMN: résonance magnétique nucléaire
 ROS : reactive oxygen species
 RP : récepteurs de progestérone
 RPE: chloroplaste ribulose phosphate-3-epimerase
 RPMI:Roswell Park Memorial Institute medium
 RSM : Response Surface Methodology
 RTV : volume relatif des tumeurs
 RuBP : ribulose 1,5-biphosphate
 SDS : dodécylsulfate de sodium
 SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
 SIDA: Syndrome ImmunoDéficientaire Acquis
 SIRP α : Signal regulatory protein α
 SOD: superoxide dismutase
 SSC: Side Scatter
 TA : température ambiante
 TAA : antigènes associés aux tumeurs
 TAG: triacylglycérides
 TAP : transcription-associated protein
 TBS :tris-buffered saline
 TCR: T cell receptor
 TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
 TGF- α : Transforming Growth Factor α
 TIL : tumeur infiltrated lymphocytes
 TNBC: Triple-Negative Breast Cancer
 TNFR1 : Tumor necrosis factor receptor 1
 TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
 TRADD: TNFR1-associated death domain protein
 TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
 TRITC : Tetramethylrhodamine
 TSA : antigènes spécifiques de tumeurs
 TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)

WA : White Americans

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

ZDS: ζ -carotene desaturase

ZEP: zeaxanthin epoxidase

α -TUB : Alpha tubuline

β -TUB : Beta tubuline

Introduction

Introduction

La richesse du milieu marin est impressionnante. Il s'agit d'un vaste champ à exploration ayant incité les chercheurs à fouiller dans cette immense source de microorganismes dans le but d'étudier leurs caractéristiques et de les exploiter dans diverses applications. Les microalgues sont des microorganismes ubiquistes mais majoritairement aquatiques. Elles possèdent un large spectre d'applications tel que l'alimentation humaine et pour bétail, l'agriculture, dans les domaines pharmaceutique et cosmétique, dans les produits de nettoyage, les industries textiles... A l'heure actuelle, seules quelques souches sont bien exploitées et étudiées. Le genre *Dunaliella* a eu un intérêt particulier grâce à sa production de divers composés de haute valeur ajoutée dont le β -carotène. *Dunaliella* est également bien connue par sa capacité d'adaptation à diverses conditions de stress. La combinaison de plusieurs facteurs de stress dans un même milieu de culture est une nouvelle stratégie d'amélioration de la production de métabolites (Minhas et al., 2016). Une souche ayant une similarité de 97% avec *D. salina*, a été isolée à partir de la zone côtière de Sousse, Tunisie (Ben Amor et al., 2017). Dans ce contexte, se positionne cette thèse ayant les objectifs suivants : améliorer la production de caroténoïdes chez *Dunaliella*, explorer au niveau transcriptionnelle les changements induits et étudier le pouvoir anticancéreux des extraits de cette souche isolée ainsi que la détermination de la voie de mort cellulaire. Dans le premier volet de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la réponse de *D. salina* à une combinaison de facteurs de stress moyennant un plan d'expériences de type Box-Behnken à trois facteurs et trois niveaux dans le but d'une suraccumulation de caroténoïdes. L'expression des gènes *l'énolase (Eno)*, *la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)*, *la lycopène β -cyclase (LCYB)*, *la protéine de choc thermique (HSP70)* et *la ribulose phosphate-3-épimérase chloroplastique (RPE)* a été étudiée. Les structures 3D de deux protéines sur exprimées au niveau transcriptionnel (la protéine associée aux globules de carotène (CGP) et la Lycopène- β -cyclase) ont été déterminées ainsi que les interactions et les régulations possibles. Le deuxième volet porte sur l'étude de l'activité anticancéreuse de cette souche et la détermination de la voie de mort cellulaire induite suite aux traitements aux extraits de *Dunaliella*. Une validation de cette activité sur le modèle animal a été également incluse. L'intérêt accordé à la recherche de traitement contre le cancer vient du fait que la maîtrise de sa propagation devient de plus en plus complexe dû à l'émergence des causes vulnérables de cette maladie. Le cancer est la deuxième cause de mortalité enregistrée dans le monde après les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux.

Face à ce problème de santé publique, « La médecine verte » et la recherche de molécules bioactives ciblant que les cellules cancéreuses est une alternative de traitement sont en plein développement ces dernières années. Les micro-organismes pourraient apporter une réponse thérapeutique adaptée aux moyens financiers et à l'environnement socioculturel des populations.

Le manuscrit de cette thèse est ainsi organisé en trois grandes parties.

La première partie consiste à une synthèse bibliographique dans le domaine d'étude. Tout d'abord, une description générale des microalgues ainsi que leur classification ont été abordées. Les microalgues sont bien connues par leur production de divers métabolites primaires et secondaires ainsi nous rappelons certaines voies métabolique impliquées dans leur synthèse. Les microalgues peuvent être exploitées dans diverses applications grâce à ces composés à haute valeur ajoutée. Un aperçu sur les possibilités de leur exploitation dans les différents domaines est mentionné, ainsi que les systèmes de leur production en masse : les systèmes ouverts et fermés. Étant donné que cette thèse est focalisée sur l'étude de *Dunaliella*, une présentation générale, un état des lieux de sa production et des stress appliqués sur cette souche sont présentés. Un peu loin du monde des microalgues, le cancer de sein triple négatif et le cancer en générale ont été défini. Les voies de mort cellulaire et la réponse immunitaire de l'organisme face au cancer sont également présentées. La deuxième partie de ce mémoire est consacrée aux différentes méthodes et protocoles expérimentaux utilisés au cours de ce travail. La troisième partie de la thèse est subdivisées en deux chapitres présentant les résultats obtenus pour les deux objectifs précédemment définies et une discussion par rapport à d'autres travaux de recherche détaillés dans la littérature. Cette mémoire se termine par une conclusion générale ainsi que les perspectives envisagées.

Synthèse
Bibliographique

A. Les algues

1. Phycologie : étude des algues

1.1. Caractéristiques générales

Une algue tient son origine du mot latin *Alga/e*. Ce sont des thallophytes dépourvues de tige, de racine, de feuilles et de fleurs. Les algues sont des organismes photosynthétiques, chlorophylliennes, majoritairement aquatiques (marin ou dulcicole) ou terrestres (peu humides). Elles peuvent être autotrophes, mixotrophes et/ou hétérotrophes. Elles peuvent également être procaryotes (Cyanobactéries) ou eucaryotes appartenant aux règnes des protistes ou des végétaux (Phycées). Il s'agit donc d'un groupe polyphylétique, issu d'un assemblage artificiel de divers règnes (Metting, 1996). Le mot algue regroupe les macros et les microalgues qui se différencient essentiellement d'un point de vue taille et contenu en organites. Les macroalgues sont benthiques, pluricellulaires pouvant atteindre plusieurs mètres en longueur alors que les microalgues sont des phytoplanctons microscopiques. On peut les répartir en microplanctons de taille allant de 20 à 200 μm , nanoplanctons de 2 à 20 μm et des picoplanctons de 0,2 à 2 μm (Metting, 1996). Ils sont capables d'élaborer des symbioses avec d'autres organismes. On cite par exemple les lichens qui sont des symbioses avec des champignons.

Les algues sont capables de produire différents composés à haute valeur ajoutée tels que les pigments comme les chlorophylles (a, b, c, d), les caroténoïdes et les phycobilines, des lipides comme les triglycérides, les phospholipides et les glycolipides, des acides gras saturés et polyinsaturés (AGPI) comme les oméga-3 (ALA, EPA, ADH) ou les oméga-6 (ARA), des peptides, des acides aminés (Aas) et des protéines, la quasi-totalité des vitamines essentielles (B1, B6, B12, C, E, K1, biotine, riboflavine, acide nicotinique, acide pantothénique et acide folique), des fibres, des minéraux et des oligoéléments (Person, 2011). Ils peuvent aussi produire des antioxydants des polyphénols, des antibiotiques, des composés alcooliques, des tanins, des terpénoïdes, des polysaccharides et des bromophénols etc., Cependant, elles peuvent également produire des composés toxiques tels que les algicides et les neurotoxines (Metting, 1996), des teneurs élevées en iode ou en métaux lourds comme l'arsenic.

1.2. Milieu de vie

Les algues sont des êtres ubiquistes, occupant divers types de niches écologiques. La température, la quantité et la qualité de lumière sont parmi les principaux facteurs influençant l'habitat des algues. Au niveau de la mer, ces deux facteurs dépendent du mouvement des marées et de la profondeur du littoral marin. En effet, la lumière qui affranchit la mer diffère suivant la profondeur, d'où différentes longueurs d'onde des radiations solaires, et les algues se distribuent suivant la disponibilité des longueurs d'onde qu'elles puissent absorber selon leurs compositions en pigments. Certains auteurs définissent ce mécanisme par l'adaptation chromatique des algues. Les algues vertes sont présentes à la surface adaptée aux longueurs d'onde rouge, les algues brunes sont trouvées entre les algues vertes et rouges (Figure 1). Ces dernières vivent en profondeur exploitant les longueurs d'onde vertes et bleues. Cependant, ce paramètre n'empêche pas de trouver parfois des algues vertes vivant en profondeur et des rouges à la surface (Métailié and Lage, 2015).

D'autres paramètres peuvent influencer l'habitat des algues à savoir la salinité et la disponibilité des substrats. En effet, les microalgues peuvent occuper des endroits terrestres avec un cycle de reproduction avec un besoin de l'eau, d'où la nécessité d'avoir des endroits généralement humides. Une autre spécificité des macroalgues est leur besoin d'un lieu d'ancrage pour se développer.

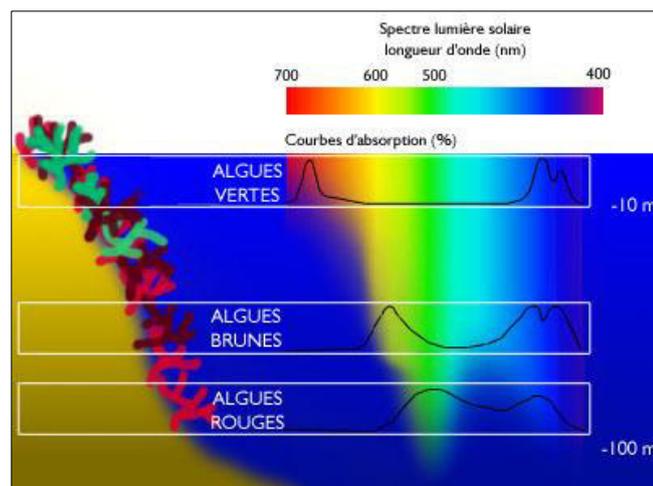


Figure 1. Répartition des algues suivant les longueurs d'onde des radiations

(<http://www.edu.upmc.fr/uel/biologie/>)

1.3. Classification

La classification des algues est très complexe et ambiguë étant donné l'existence de différents critères de classification créant ainsi un désaccord entre les systématiciens. Parmi les critères de classification nous citons : l'organisation nucléaire (procaryote ou eucaryote), nature de la membrane, nature des réserves, flagellation, mode de reproduction, la nature des pigments et celle de l'appareil photosynthétique. Ce dernier critère est considéré comme le plus important.

Dès 1901 (Bohlin, 1901), différentes sortes de classification des algues ont été proposées. Par exemple, (Fritsch, 1923, 1922) et (J and Chapman, 1973) ont classé les algues en 11 et 10 classes respectivement. Dans cette classification, Chapman n'a pas considéré les *Cyanobactéries* comme des algues au sens strict du mot. Le tableau 1, résume cette classification en mettant en œuvre les principales caractéristiques des différentes classes. Le tableau 2 présente autrement la classification des algues en détaillant leurs embranchements. Via ce tableau, nous montrons que les algues sont un mélange de différents règnes : des Eubactéries, des Protozoaires, des Chromistes et des Végétaux. Cette classification est basée sur les données de Ruggiero et al., (2015) ayant détaillé la distribution de tous les êtres vivants. Une fois les algues ont été sélectionnées, toutes les classes ont été vérifiées sur la plateforme (<https://www.algaebase.org/>). Les classes des Cyanobactéries, des Chlorophycées, des Rhodophycées, des Phéophycées, des Diatomées et des Euglénophycées ont été les plus citées dans la littérature.

Ces organismes sont issus d'endosymbioses successives. La mitochondrie provient d'une endosymbiose de α -protéobactéries par un protoeukaryote développant ainsi les eucaryotes complexes. Le chloroplaste à son tour, prend son origine d'une endosymbiose primaire d'une cyanobactérie par cet eucaryote hétérotrophe "appelé aussi protiste" (Archibald, 2015; Raven and Allen, 2003). Les organismes issus de cet événement sont des eucaryotes, photosynthétiques (autotrophes) et aérobies. Il s'agit des glaucophytes, des algues vertes et rouges ayant des plastides entourés par deux membranes. Ce premier pas de diversité des algues est suivi par endosymbiose secondaire et tertiaire générant les autres groupes d'algues.

Tableau 1. Classification des algues (Fritsch, 1923, 1922; J and Chapman, 1973); Chl : Chlorophylle ; carot : carotène ; APC: allophycoyanine ; PC : phycocyanine, PE : phycoérythrine

Embranchement	Classe	Pigmentation	Réserve	Flagellation	Reproduction	Membrane cellulaire	Type de noyau
<i>Cyanophyta</i>	<i>Cyanophyceae</i> (<i>Myxophyceae</i>)	Chl a, β -carotène, flavacène, Échinénone (isozea, zea, myxo, oscilla)xanthine APC, C-PC, C-PE	Amidon (granule) Sucre et glycogène	Non flagellé	Division simple, endospore non-motile, spores, fragmentation végétative Pas de reproduction sexuelle	Manque de cellulose	Procaryote Unicellulaire/ Filamenteux complexe
<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlorophyceae</i>	Chl a, b, α et β -carotène, lutéine, (zea, viola, loro, neo)xanthine, Micronone	Amidon, huile, pyrénolide	De 2 à 4 flagelles (mobile), Isokonté	- Isogamie, anisogamie, oogamie - Zoospore motile, spore non-motile	- Cellulose+ mannanes+ xylanes - sitostérol - Parfois calcifiée	Eucaryote Uni/pluricellulaire
	<i>Prasinophyceae</i>						
	<i>Charophyceae</i>						
<i>Euglenophyta</i>	<i>Euglenophyceae</i>	- Certains incolore - Chl a, b, diadinoxanthine ...	- Paramylon - Ergostérol	Une ou 2 flagelles dont l'une contient des cils et le deuxième est réduit	Division longitudinale	- Pas de membrane cellulaire - Périplaste flexible ou pellicule	Eucaryote Unicellulaire
<i>Chloromonadophyta</i>	<i>Chloromonadophyceae</i> (= <i>Raphidophyceae</i>)	Chl a, β -carot, diadinoxanthine (++)	Huile	2 flagelles égales hétérokontées	longitudinal division	- Pas de membrane cellulaire	Eucaryote
<i>Xanthophyta</i>	<i>Xanthophyceae</i>	Chl a et c, β -carotène, heteroxanthine, diadinoxanthine (++)	- Huile - Leucosin - Ergostérol	2 flagelles inégales hétérokontés et parfois un seul flagelle	- Zoospore, aplanospores, statospore - Isogamie, oogamie (<i>Vaucheria</i>)	- Riche en composés pectiques - silicification au période de repos	Eucaryote
	<i>Eustigmatophyceae</i>						

<i>Pyrophyta</i>	Desmophyceae	Chl a, c, β -carotene, diadinoxanthine, Dincoxanthine, peridines	- Amidon - lipides	Biflagelle latérale	- Zoospore - Division longitudinal (Desmo) - Division oblique longitudinal (Dino) - Aniso ou isogamie	Sans cellulose	Eucaryote Unicellulaire mobile -filaments courtes
	Dinophyceae					Avec ou sans cellulose	
<i>Chrysophyta</i>	<i>Chrysophyceae</i>	Chl a, c, β -carot, (Fuco, Diato, diadino)xanthine	- Chrysolaminarine - Fucostérole, porifasterol	- 2 flagelles hétérokontées (chrysophyceae) - 2 flagelles isokontées + haptonema (haptophyceae)	Zoospore, statospore	- moins de cellulose avec une silicification ou calcification de la membrane	Eucaryote Unicellulaire Chromista
	<i>Haptophyceae</i>						
<i>Bacillariophyta</i> (Diatomées)	<i>Bacillariophyceae</i>	Chl a, c, β -carot, (Fuco, Diato, diadino)xanthine	Chrysolaminarine Pyrénoïde, huile, volutine	Sans flagelle sauf pour les gamètes mâles	- Division cellulaire - Oogamie (diatomées centrées) - isogamie amoeboid (diatomées pennées)	Silice+ composées pectique	Eucaryote Unicellulaire (parfois forme des colonies)
<i>Cryptophyta</i>	<i>Cryptophyceae</i>	Chl a, c Biliprotéines α -carot, (Allo, Croco, Monado)xanthine	- Amidon -Carbohydres	2 Flagelles inégales à l'exception de <i>Bjornbergiella</i> et <i>Tetragonidium</i>	zoospores		Eucaryote Unicellulaire
<i>Phaeophyta</i>	<i>Phaeophyceae</i>	Chl a, c, β -carot, violaxanthine Fucoxanthine (++)	Mannitole, laminarine	2 flagelles hétérokontées	- Monospores, tetraspores, aplanospores non-motiles - De l'isogamie à l'oogamie	Cellulose+ acide alginique+ fucidine	Filamenteux + Différenciation interne et externe complexe Parasite et epiphytique
<i>Rhodophyta</i>	<i>Rhodophyceae</i>	APC, C-PC, R-PC, B-PE, R-PE, phytochrome, α et β carot, Chl a et d, zeaxanthine, lutéine	Amidon, floridoside, mannoglycerate, polysaccharides sulfatés	Pas de flagelles	Complexe oogamie		Coccoïdes Unicellulaire, Filament simple, Thalle complexe

Tableau 2. Classification des algues selon leur embranchement (en se basant sur les données de (Ruggiero et al., 2015) et (<https://www.algaebase.org/>))

Règne			Embranchement			Classe				
Kingdom EUBACTERIA			Subkingdom Negibacteria	Phylum Cyanobacteria [= Cyanophyta]		Class Cyanophyceae [= Phycobacteria]				
Kingdom Protozoa	SUBKINGDOM EOZOA	INFRAKINGDOM EUGLENOZOA	Phylum Euglenozoa	Subphylum Glycomonada		Class Diplonemea				
						Class Kinetoplastea				
				Subphylum Euglenoida	Infraphylum Entosiphona	Class Entosiphonea				
						Class Euglenophyceae				
			Subphylum Symbiontida		Class Postgaardea					
			Infraphylum Dipilida		Superclass Spirocuta	Class Peranemea				
					Superclass Rigimonada	Class Ploecotarea				
						Class Stavomonadea				
			Phylum Loukozoa	Subphylum Eolouka		Class Jakobea				
				Subphylum Neolouka		Class Malawimonadea				
	Phylum Metamonada	Subphylum Trichozoa		Superclass Eopharyngia	Class Trepomonadea					
	Phylum Choanozoa	Subphylum Choanofila		Class Choanoflagellatea						
		Subphylum Cristidiscoidea		Class Cristidiscoidea						
	Phylum Picozoa					Class Picomonadea				
Phylum Percolozoa		Subphylum Tetramitia		Class Heterolobosea						
Kingdom CHROMISTA	Subkingdom Hacrobia		Phylum Cryptophyta			Class Cryptophyceae				
			Phylum Haptophyta			Class Coccolithophyceae [= Prymnesiophyceae]				
	SUBKINGDOM HAROSA		INFRAKINGDOM HALVARIA	Superphylum Alveolata	Phylum Ciliophora	Subphylum Intramacronucleata		Class Ciliata		
								Class Litostomatea		
								Class Spirotrichea		
					Phylum Miozoa	Subphylum Myxozoa	Infraphylum Apicomplexa	Superclass Apicomonada	Class Apicomonadea	
							Superclass Sporozoa			
						Infraphylum Dinozoa	Superclass Dinoflagellata	Class Dinophyceae		
								Class Ellobiopsea		
							Class Noctiluca (Noctilucopephyceae)			
							Class Oxyrrhea			
							Class Syndinea			
			Superclass Perkinsozoa	Class Perkinsea						
			Subphylum Protalveolata		Class Colponemea					
	SUBKINGDOM HALVARIA		Phylum Ochrophyta Heterokontophyta p.p.] [=			Class Bolidophyceae				
						Class Chrysomerophyceae				
						Class Chrysophyceae				
				Class Eustigmatophyceae						
				Class Pelagophyceae						
		Class Dietyochophyceae [= Hypogyristea]								

					Class Phaeophyceae
					Class Phaeothamniophyceae [= Aurophyceae]
					Class Picophagophyceae [= Picophagea]
					Class Pinguiphyceae
					Class Raphidophyceae (= Chloromonadophyta)
					Class Schizocladiphyceae
					Class Synchronophyceae
					Class Synurophyceae
					Class Xanthophyceae
			Phylum Bigyra		Class Bikosea
			Phylum Bigyra		Class Blastocystea
			Phylum Bigyra		Class Nanomonadea
			Phylum Bigyra		Class Opalineae
			Phylum Bigyra		Class Labyrinthulea
			Phylum Bigyra		Class Placididea [= Placidiophyceae]
	INFRAKINGDOM RHIZARIA		Phylum Cercozoa		Class Chlorarachniophyceae [Chlorarachnea]
	INFRAKINGDOM RHIZARIA		Phylum Cercozoa		Class Thecofilosea
	INFRAKINGDOM RHIZARIA		Phylum Cercozoa		Class Filosa
	INFRAKINGDOM RHIZARIA		Phylum Cercozoa		Class Imbricatea
			Phylum Bacillariophyta	Subphylum Bacillariophytina	Class Bacillariophyceae [= Diatomeae]
Kingdom PLANTAE	SUBKINGDOM BILIPHYTA		Phylum Glaucophyta		Class Glaucophyceae
			Phylum Rhodophyta	Subphylum Cyanidiophytina	Class Cyanidiophyceae
				Subphylum Eurhodophytina	Class Bangiophyceae
				Subphylum Proteorhodophytina	Class Florideophyceae
					Class Compsopogonophyceae
					Class Porphyridiophyceae
					Class Rhodellophyceae
			Class Stylonematophyceae		
	SUBKINGDOM VIRIDIPLANTAE	INFRAKINGDOM CHLOROPHYTA	Phylum Chlorophyta	Subphylum Chlorophytina	Class Chlorodendrophyceae
					Class Chlorophyceae
					Class Pedinophyceae
					Class Trebouxiophyceae
					Class Ulvophyceae
			Subphylum Prasinophytina	Class Nephrophyceae [= Nephroselmidiophyceae]	
		Class Mamiellophyceae			
		Class Pyramimonadophyceae			
		Class Charophyceae			
Class Chlorokybophyceae					
INFRAKINGDOM STREPTOPHYTA	Superphylum Charophyta: Phylum Charophyta	Class Coleochaetophyceae			
		Class Conjugatophyceae (Zygnematophyceae)			
		Class Klebsormidiophyceae			
		Class Mesostigmatophyceae			

1.3.1. *Les algues bleues : les Cyanobactéries*

Ce sont des organismes procaryotes (ressemblant aux bactéries à Gram négatif) caractérisés par l'absence de membrane distincte pour le noyau, la mitochondrie et le chloroplaste. Ainsi, la photosynthèse a obligatoirement lieu dans le cytoplasme. Grâce à ce phénomène oxygéné, elles étaient responsables de l'oxygénation rapide de l'atmosphère terrestre au cours de l'épisode de « Great Oxidation Event» (GOE) à la fin de l'éon Archéen (Schirmer et al., 2015). Elles colonisent des environnements aquatiques (des océans et des eaux douces) et terrestres (même les déserts) et des milieux extrêmes tels que les sources thermales et les lacs polaires (Loza et al., 2013). Les cyanobactéries sont à l'origine des chloroplastes des eucaryotes photosynthétiques (les glaucophytes, les algues vertes et rouges) à travers le mécanisme d'endosymbiose primaire (Raven and Allen, 2003).

1.3.2. *Les algues vertes :*

Les algues vertes sont considérées comme l'ancêtre des plantes supérieures. Une analyse des protéines associées à la transcription (TAP) de 110 génomes et 13 transcriptomes chez des *Viridiplantae* ont montré que de nombreuses familles de TAP ont évolué dans les algues streptophytes (charophytes) (Wilhelmsson et al., 2017) confirmant ainsi la relation entre les algues vertes et les plantes supérieures. Cette évolution a conduit à des changements importants dans l'écosystème terrestre (Leliaert et al., 2012). L'endosymbiose primaire donnant naissance aux algues vertes a eu lieu il y a entre 1 et 1,5 milliard d'années. Les microalgues vertes ont été par la suite sujettes d'endosymbioses secondaires engendrant trois groupes d'algues: les chlorarachniophytes, les euglénoïdes photosynthétiques et les Dinoflagellés "verts" (Leliaert et al., 2012). Il a été suggéré que l'endosymbiose secondaire se produise par endocytose (Keeling, 2010).

Les principales caractéristiques de cette classe de microalgues sont citées dans le tableau 1. Elles sont ubiquistes ayant la capacité de s'adapter à des environnements extrêmes comme les déserts chauds ou froids, les habitats hyper-salins, les eaux acides contenant des concentrations extrêmes de métaux lourds etc...(Leliaert et al., 2012). Les algues vertes sont bien diversifiées comprenant des formes uni ou multinucléées, unicellulaires, coloniales, filamenteuses et pseudo-parenchymateuses (Metting, 1996). Certaines vivent en symbiose avec des ciliés, des foraminifères, des cnidaires, des mollusques, des vertébrés et des champignons pour former des lichens alors que d'autres vivent sous forme de parasites hétérotrophes (Leliaert et al., 2012).

1.3.3. *Les algues rouges : Rhodophycées*

Elles sont caractérisées par leur couleur rouge clair ou violette grâce aux pigments protéiques phycobilines (phycoérythrine). Leurs chloroplastes sont ainsi appelés les rhodoplastes. Ces algues ont subi une ou plusieurs endosymbioses secondaires permettant aux cryptophytes, haptophytes, straménopiles photosynthétiques (diatomées, chrysophytes et algues brunes), les dinoflagellés (Leliaert et al., 2012), les hétérokontes et les apicomplexes (Keeling, 2010) d'acquérir leur plastides. Les lignées qui ont englobé les algues rouges sont dites des chromalveolates et représentent plus de 50% des espèces de protistes actuellement décrites (Keeling, 2010). On compte 6500 espèces dans cet embranchement dont 3% seulement vivent dans les eaux douces (Nan et al., 2017). Elles ont été également détectées sur le sol et dans les foraminifères tropicaux sous forme d'endosymbiontes (Metting, 1996).

1.3.4. *Les algues brunes : Phaeophyceae*

Elles possèdent des chloroplastes à quatre membranes ce qui signifie qu'elles sont probablement issues d'une endosymbiose tertiaire. Ces plastides contiennent le pigment fucoxanthine leur donnant la couleur allant du vert-olive aux différentes nuances du brun. Ce sont des algues majoritairement marines. On compte entre 1500 et 2000 espèces. C'est le seul groupe d'algues qui ne contient pas d'espèce unicellulaire ("Brown algae," 2018). Elles contiennent des vésicules appelées physodes (Craigie et al., 1977) ayant le rôle de vacuole d'exocytose.

2. Voie métabolique

Cette grande diversité des algues a généré une richesse marquante en production de métabolites primaires et secondaires. Ces composés à haute valeur ajoutée sont synthétisés par plusieurs voies métaboliques telles que la photosynthèse, la caroténoïdogenèse, la lipogenèse, voie de synthèse de glycérol, Aa, les antioxydants avec une superbe coordination et régulation des différentes voies suivant les conditions et la profondeur de culture dans le milieu marin.

2.1. *Photosynthèse*

La majorité des algues sont des organismes autotrophes, responsables de 50% de la photosynthèse sur terre grâce à leur pigmentation transformant ainsi la matière inorganique et l'énergie lumineuse en énergie chimique et différentes formes de molécules de réserves : α -

(1-4) glucane (amidons) / β -(1-3) -glucane, des fructanes, des hydrates de carbone de faible poids moléculaire, des graisses et des huiles (Tableau 3) etc...

Tableau 3. *Molécules de réserve des produits de la photosynthèse (Metting, 1996)*

Forme de réserve	algues
amidon floridien (sous-unités d'amylopectine)	Algues rouges
amidon myxophycéen (sous-unités de type amylopectine ou glycogène)	Algues bleues
amidon amylose-amylopectine réticulé fructosanes (fructose oligosaccharides de type inuline)	Algues vertes
α- (1-4) glucane	Cryptophytes et les dinoflagellés
Huile ou amidon sous forme β-(1-3) glucopyranoside.	Chrysophytes
Paramylon : β-(1-3) D-glucose	Euglénoïdes et Prymnésiophytes

2.1.1. Appareil photosynthétique

La chlorophylle *a* (Chl *a*) est présente chez toutes les algues et est accompagnée par des pigments accessoires qui absorbent à distinctes longueurs d'onde élargissant ainsi le spectre de récolte de la lumière (Figure 2A). Chl *a* possède un pic majeur à 683 ± 20 nm dû à l'activité du PSII et un large épaulement de 700 à 750 nm, dû à la fois au PSII et PSI (Pedrós et al., 2008). Les pigments accessoires sont les chl *b*, *c*, *d*, les caroténoïdes et les phycobilines. Les différentes structures des chlorophylles sont présentées dans la figure 2B. Ce sont des macrocycles tétra-pyrroliques métallés par la présence d'un atome de magnésium complexé en leur centre et substitués par une chaîne phytyle. Les caroténoïdes participent à l'absorption de lumières et essentiellement à la protection de la chaîne respiratoire de la photo-oxydation. De plus l'association chlorophylles-caroténoïdes semble avoir un intérêt pour le repliement correct des protéines de liaison.

La capture de lumière se fait moyennant le complexe de phycobilisomes chez les Cyanobactéries, Cryptophycée et les Rhodophycées. Ces complexes sont constitués à 85% de phycobiliprotéines dont on distingue 4 classes : allophycocyanine au centre du complexe, la phycocyanine suivie de la phycoérythrine ou la phycoérythrocyanine au niveau des

projections radiaires. Les caractéristiques de ces pigments ont été détaillées par (Thomas, 1989).

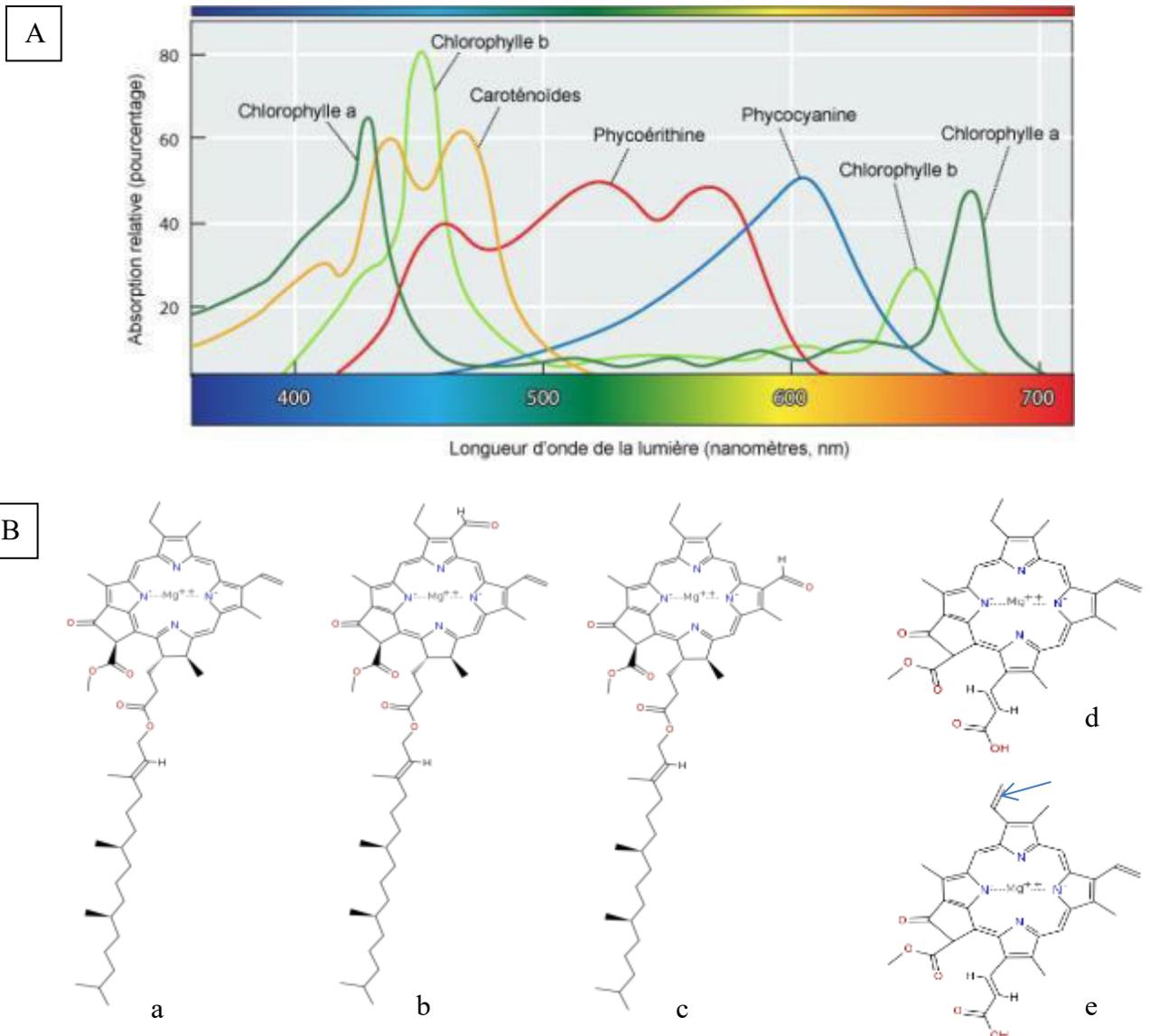


Figure 2. (A) Les longueurs d'onde d'absorption des pigments : chlorophylles a et b, caroténoïdes, phycoérythrine, phycocyanine (<http://www.cima.ualg.pt/>). (B) Les différentes structures de chlorophylle : (a) chl a, (b) chl b, (c) chl d, (d) chl c₁, (e) chl c₂

2.1.2. Déroulement de la photosynthèse

La photosynthèse se déroule en deux phases (Figure 3). La première, dite claire, dépend de la lumière et s'enchaîne au niveau du thylakoïde des chloroplastes/Grana. Les principaux acteurs de cette étape sont les photosystèmes PSI (P700) et PSII (P680). Le noyau

de ces PS est constitué de 3 molécules : chlorophylle, un accepteur d'e et un donneur d'e (H₂O) (Singh et al., 2014). La chlorophylle capte la lumière (les photons) au niveau du PSII. Durant le transfert d'e (provenant de l'oxydation de H₂O) dans le thylakoïde jusqu'au PSI, des molécules d'O₂, d'ATP et de NADPH sont synthétisées. Ces deux dernières molécules énergétiques entrent dans la deuxième phase de la photosynthèse dite obscure. Au cours de cette phase, le cycle de Calvin ayant lieu dans le stroma, commence par la fixation d'une molécule de CO₂ au ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) jusqu'à la formation de Glycéraldéhyde 3-phosphate G3P qui servira à la synthèse de glucose (qui sera stocké sous les différentes formes citées dans le tableau 3). L'équation globale de ce mécanisme est la suivante (Eq.1, (Singh et al., 2014)):

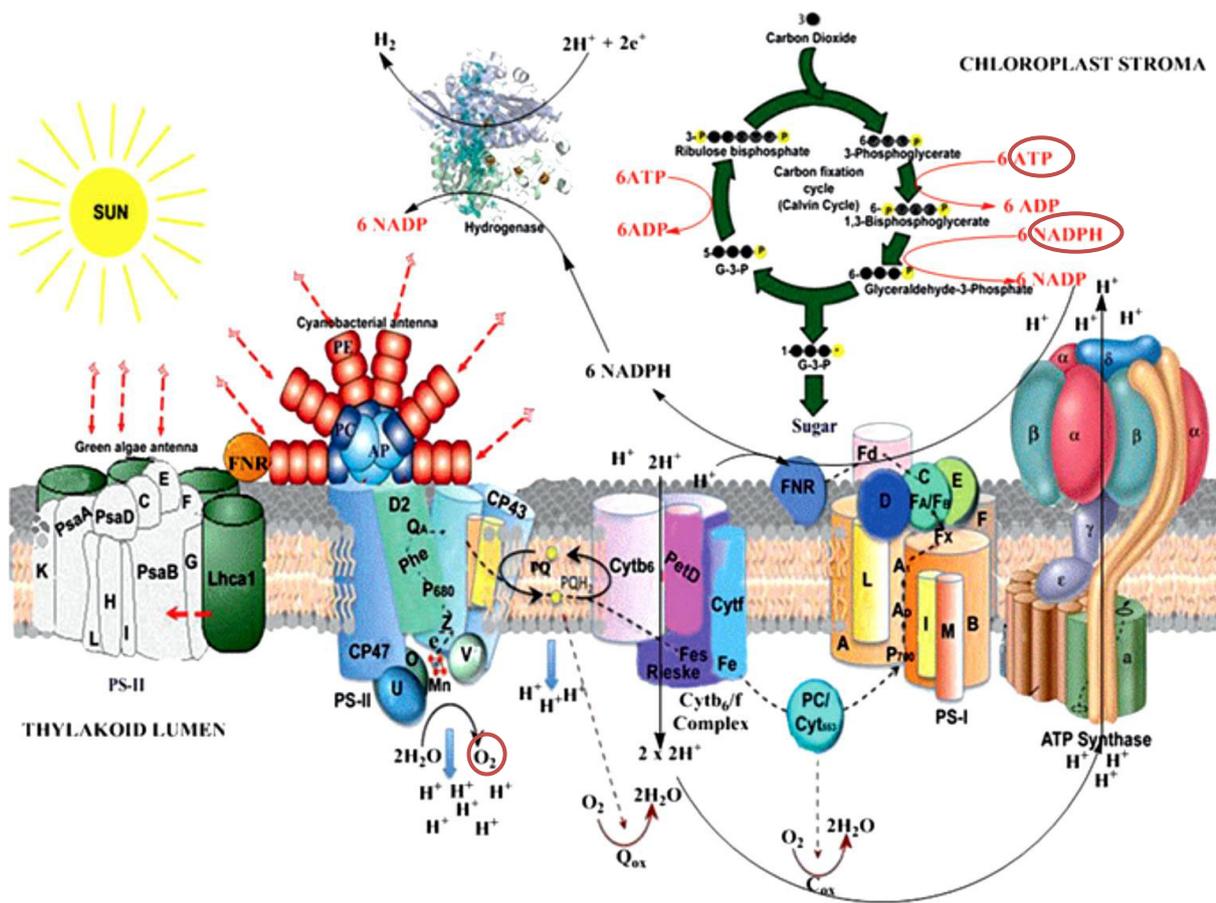
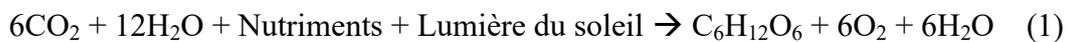


Figure 3. Mécanisme de photosynthèse, phase lumineuse (claire) et phase obscure (Cycle de Calvin) (Singh et al., 2014)

2.2. Caroténogenèse

Un autre mécanisme d'intérêt similaire à la photosynthèse, est la caroténogenèse aboutissant à la synthèse de caroténoïdes.

2.2.1. Mécanisme de Caroténogenèse

Plusieurs revues ont détaillé le mécanisme de caroténogenèse (Domonkos et al., 2013; Ye et al., 2008) qui se déroule en trois étapes. La première est la biosynthèse du géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), suivie par la biosynthèse du lycopène et par la suite la génération de différents caroténoïdes avec leurs cycles cyclohexane. Durant la première étape, la GGPP est synthétisée par addition séquentielle de trois molécules d'isopentényl pyrophosphate (IPP) à son dimère diméthylallyl diphosphate (DMAPP). Ces deux précurseurs sont générés par deux voies: MEP (2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate) et MVA (Voie du mévalonate). La voie MEP commence par la catalyse du pyruvate et du G3P par DXS (1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase). Alors que, la voie cytosolique MVA commence par la condensation de deux acétylcoenzyme A (acétyl-coA). Il semble que les algues vertes n'utilisent que la voie MEP (Domonkos et al, 2013). La condensation de deux GGPP au cours de la deuxième étape conduit à la formation du phytoène incolore (ayant trois doubles liaisons conjuguées) par la phytoène synthase (Psy). Le suivi de quatre désaturations et une isomérisation génèrent le lycopène (11 doubles liaisons conjuguées), qui est le point de départ de la synthèse de tous les autres caroténoïdes (Figure 4). Le β -carotène est le résultat de cyclisation du lycopène par la Lycopène β -cyclase (LCYB).

2.2.2. Propriétés des caroténoïdes

On distingue actuellement plus de 700 caroténoïdes. Ce sont des isoprénoïdes (C₄₀) dont la couleur varie du jaune au rouge. Cette coloration dépend du nombre des doubles liaisons conjuguées. En effet, plus ce nombre de liaison augmente, plus les caroténoïdes absorbent à des longueurs d'onde plus grandes (Domonkos et al., 2013). On distingue : les carotènes ayant une chaîne hydrocarbonée (cyclée ou non à leurs extrémités) et les xanthophylles qui sont les dérivés oxygénés (Jin et al., 2003). Les xanthophylles primaires assurent les fonctions vitales pour la cellule. Les xanthophylles secondaires sont surproduites par réponse à un facteur de stress par stimulation de la caroténogenèse. Les caroténoïdes primaires sont localisés au niveau des thylakoïdes alors que les secondaires sont généralement synthétisés dans les vésicules lipidiques au niveau du stroma plastidique ou le cytosol (Jin et

al., 2003). Ces premiers caroténoïdes entrent dans la structure de l'antenne de récolte de la lumière (PSI et PSII), le complexe Cytochrome b6/f et les complexes de récolte de la lumière impliqués dans le transport d'électrons photosynthétiques. Ils établissent des interactions avec ces protéines participant ainsi à la stabilisation des complexes au niveau de la membrane thylacoïdale (Domonkos et al., 2013). Suivant les liaisons établies par les groupes polaires et apolaires des caroténoïdes, la structure de la membrane et de leurs villosités sont modifiées. En outre, ces polyènes protègent l'appareil photosynthétique des lésions d'irradiations excessives causant la photoinhibition et la photooxydation par différents mécanismes : une prévention contre la formation des ROS et leur quenching ($^1\text{O}_2$), une protection contre la peroxydation des lipides et contre le stress oxydatif via le cycle de xanthophylle. Chez les diatomées et les dinoflagellés, cette fonction est assurée grâce au cycle de diadinoxanthine. Ces isoprénoïdes jouent un rôle de protection assez important en cas de haute température par dissipation thermique (Domonkos et al., 2013). Les caroténoïdes sont des précurseurs de l'acide abscissique qui est l'hormone majeure de la régulation de la réponse au stress chez les plantes (Liang et al., 2017). Ces molécules bioactives sont utilisées dans les domaines agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique étant données leur pouvoir antioxydant. En effet, elles pourraient inhiber et prévenir contre de nombreuses pathologies comme la cataracte, les maladies cardiovasculaires et certains cancers (Ye et al., 2008).

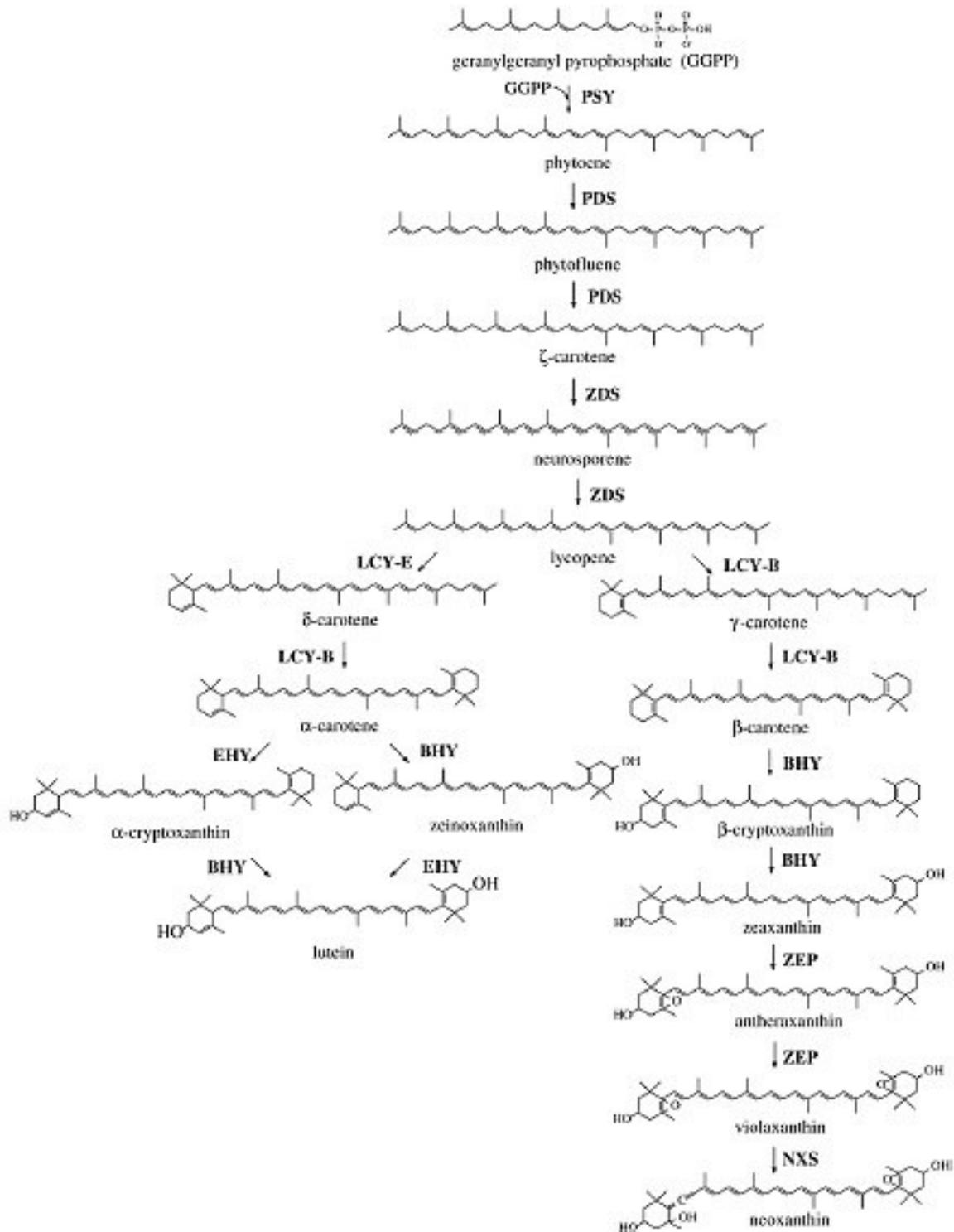


Figure 4. Une hypothèse de la voie de caroténogénèse chez *Dunaliella* (Ye et al., 2008) présentant la structure des caroténoïdes synthétisés. Les enzymes correspondraient à : PSY: phytoene synthase; PDS: phytoene desaturase; ZDS: ζ -carotene desaturase; LYC-E: lycopene ϵ -cyclase; LYC-B: lycopene β -cyclase; EHY: ϵ -carotene hydroxylase; BHY: β -carotene hydroxylase; ZEP: zeaxanthin epoxydase; NXS: neoxanthin synthase

2.3. Lipogenèse

Les algues accumulent entre 20 et 50% de MS en lipides pour atteindre jusqu'à 80% dans des conditions de cultures optimisées (Bellou et al., 2014). La transformation du CO₂ atmosphérique (ou autre source de carbone) en triacylglycérides (TAG) passe par les étapes suivantes : la formation d'acétyl-coA dans le cytoplasme, l'allongement et la désaturation de la chaîne carbonée des acides gras; et la biosynthèse des triglycérides (Huang et al., 2010). En effet, le produit de la photosynthèse G3P est transformé en pyruvate et par la suite en acétyl - CoA dans le chloroplaste (Figure 5). Une deuxième voie possible de formation d'acétyl-CoA est la glycolyse des réserves polysaccharidiques (Bellou et al., 2014). Un deuxième substrat utilisé pour la biosynthèse de TAG est le L- α -phosphoglycérone, dérivé de phosphodihydroxyacétone qui est un produit de la glycolyse (Huang et al., 2010).

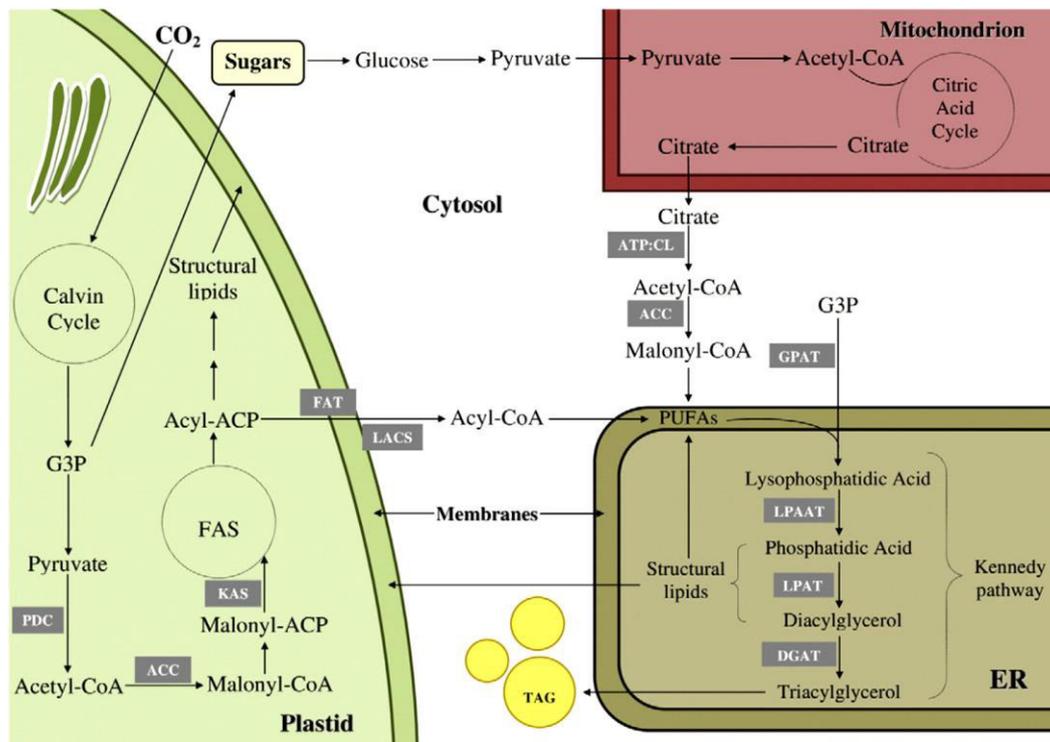


Figure 5. Voies de synthèse des lipides chez les microalgues. Abréviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACP, acyl-carrier protein; LACS, long-chain acyl-CoA synthetase; ATP:CL, ATP-dependent citrate lyase; CoA, coenzyme A; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; FAS, fatty acid synthase; FAT, fatty acyl-ACP thioesterase; G3P, glycérate-3-phosphate; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; LPAAT, lyso-phosphatidic acid acyltransferase; LPAT, lyso-phosphatidylcholine acyltransferase; PDC, pyruvate dehydrogenase complex; TAG, triacylglycerol (Bellou et al., 2014)

2.4. Synthèse de glycérol

Le glycérol est une source de carbone pour les algues cultivées en mixo ou en hétérotrophie. Par contre, les autotrophes ont la capacité de le synthétiser eux-mêmes. En effet, en cas d'hypersalinité, les microalgues accumulent le glycérol comme étant un osmoprotectant. La production de cette molécule est dépendante de la glycolyse. La transformation entre la G3P et son isomère dihydroxyacétone phosphate DHAP est spontanée suivant les besoins de la cellule. DHAP est catalysé par le glycérol 3-phosphate déshydrogénase GPDH en glycérol-3-P. Celui-ci est par la suite transformé en glycérol (Xia et al., 2014).

2.5. Synthèse des Acides aminés, des antioxydants et des phytohormones

La diversité des métabolites microalgaux s'étend également aux acides aminés (Aas), les polyphénols, les flavonoïdes... Le pyruvate est un précurseur important pour la synthèse des Aas suivi par le cycle de Krebs (Figure 6). La production de ces Aas dépend parfois des conditions de culture. A titre d'exemple, une augmentation de la production d'alanine et arginine a été observée chez *Dunaliella* suite à une déficience en azote (Nehmé et al., 2017). Ces Aas sont à leur tour des précurseurs pour la synthèse d'antioxydants hydrophiles tels que la Glutathionne et les flavonoïdes. D'autres antioxydants à caractère hydrophobe sont synthétisés à savoir le squalene, le tocophérol, l'acide abscissique qui dérivent de la voie de synthèse des terpénoïdes (même que les caroténoïdes).

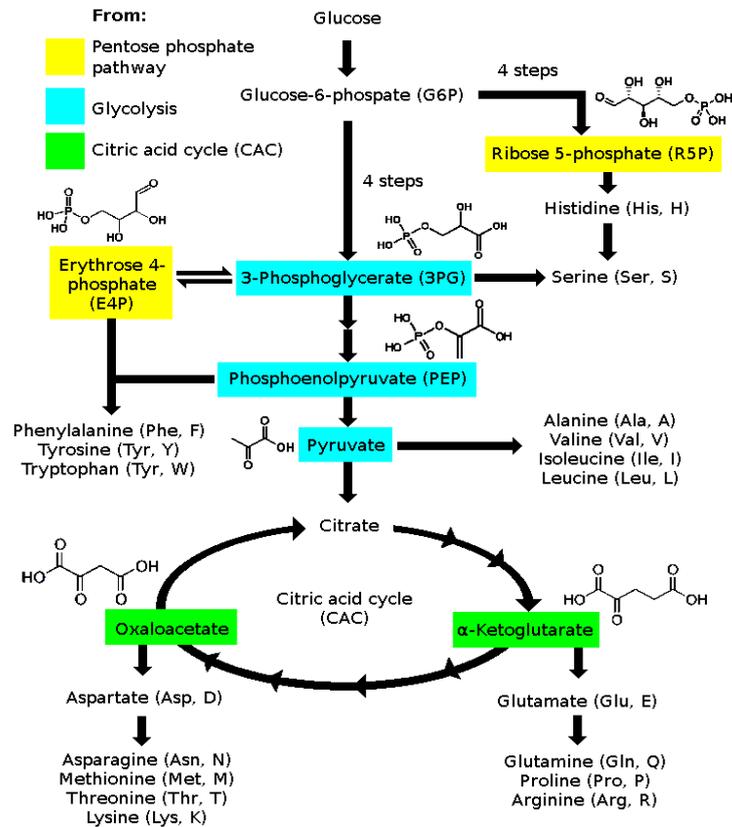


Figure 6. Voie de synthèse des acides aminés

(https://en.wikipedia.org/wiki/File:Amino_acid_biosynthesis_overview.png)

3. Domaines d'utilisation des algues

La richesse des algues en métabolites leur a confié une place importante sur le marché mondial. La consommation de certaines macroalgues a débuté depuis le 4^{ème} siècle au Japon dans la médecine traditionnelle. Actuellement, le champ d'utilisation des algues s'est élargi aux domaines alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, agriculture, énergétique et environnementale (tableau Annexe 1) (Person, 2011):

3.1. Alimentation humaine

En alimentation humaine, les algues sont incorporées essentiellement sous forme de complément alimentaire grâce à leur richesse en protéines, en AGPI et en vitamines. En 2010, le coût de la consommation mondiale de biomasse microalgale dans ce domaine a été estimé à 2,5 milliard de dollars selon *National Algal Biofuels Technology Roadmap* (Person,

2011). Ces microalgues ont été commercialisées sous forme de capsules, comprimés, extraits solubles en ampoules, suspensions, incorporées dans les pâtes, les grignotines, les boissons, friandises ou pâtes à mâcher, les céréales du petit déjeuner, les biscuits ou les barres nutritives etc...La consommation de spiruline est bien célèbre depuis des décennies chez les Aztèques au Mexique et la tribu Kanembou au Tchad (Person, 2011). Elle est la plus cultivée en Mexique, Hawaii, Californie et Thaïlande dans des étangs extérieurs pour l'utilisation en tant que complément alimentaire (Metting, 1996). *Arthrospira* a acquis cette importance grâce à sa richesse en vitamines, en minéraux, en polysaccharides et particulièrement en protéines (environ 60% de la biomasse sèche). Elle contient également les phycobiliprotéines (phycocyanines), qui sont largement recherchées comme des colorants naturels et des molécules actives. De même et avec un chiffre de 1,5 milliard de dollars en 2017, les caroténoïdes prouvent leur grand intérêt sur le marché mondial non seulement comme colorant naturel mais aussi comme complément alimentaire grâce à ses caractéristiques antioxydantes et thérapeutiques. Il est attendu que ce chiffre devrait atteindre 2,0 milliards de dollars d'ici 2022 avec un taux de croissance annuel de 5,7% pour la période 2017-2022 (<https://www.bccresearch.com/>). Le β -carotène de *Dunaliella salina* (*D. salina*) et l'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* sont les plus produites à l'échelle industrielle. La production de l'astaxanthine à partir de *H. pluvialis* s'est montrée compétitive par rapport à celle des caroténoïdes synthétiques où le cout de la première est estimé à 552 dollars/kg contre 1000 dollars/kg pour la deuxième (Saini and Keum, 2017). Les productions mondiales dans le domaine alimentaire de *spiruline*, *Chlorella*, *Dunaliella* et *Nostoc* sont estimées respectivement à 3000t/an, 1200 t/an, 600 t/an et 500 t/an (Barry et al., 2016).

Comme le corps humain est incapable de synthétiser les AGPI, les algues présentent une source des ω -3, ω -6 et EPA qui sont bénéfiques pour la santé. Plusieurs autres composés à effet thérapeutique ont été identifiés au niveau des microalgues tels que le glucane (immunostimulant, antitumoral ...), les vitamines, les polysaccharides sulfatés (comme les fucanes et les ulvanes...), les carraghénanes (antitumoraux, anticoagulants...), les agars (agents gonflants, laxatifs...) et les alginates (empreinte dentaire, antiacide, gélifiant..). 75% de la production mondiale des macroalgues produites sont exploités dans le domaine d'alimentation humaine avec dominance de la cuisine asiatique. Les macroalgues rouges se sont avérées riches en protéines (de 30 à 40% MS) et elles ont un taux élevé d'AGPI.

3.2. *Alimentation animale*

Outre l'alimentation humaine, les algues sont introduites dans l'alimentation animale (bétail et poisson) en tant que complément alimentaire et agent d'amélioration de la coloration de leur chair. Un marché mondial de 230 millions d'euros a été estimé pour l'utilisation de microalgues dans ce domaine en 2010 (Person, 2011). Des bassins de co-élevage d'algues et d'espèces marines (poissons, coquillages ou crevettes) sont utilisés de plus en plus dans le monde apportant des bénéfices pour les deux cultures.

3.3. *En cosmétique*

Les extraits d'algues ont été intégrés dans les crèmes de soin du visage, de la peau, la protection solaire et les produits de soins capillaires. Les macroalgues sont utilisées en thalassothérapie, fabrication des masques et dentifrices. Les oligo-alginates ont des activités anti-éruption cutanée, anti-acné, et anti-âge. Les fucoïdanes réduisent le vieillissement de la peau et favorisent la croissance capillaire (Person, 2011).

3.4. *En agriculture*

Les algues sont utilisées comme des biofertilisants. Les cyanobactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique, d'améliorer et de maintenir la fertilité du sol. Les macroalgues sont utilisées comme des engrais grâce à leur richesse en minéraux et colloïdes. Les phytohormones de ces organismes ont un effet phytosanitaire sur les plantes en les ressemblant à des vaccins de plantes améliorant ainsi leur croissance (Person, 2011).

3.5. *Domaine énergétique*

Les lipides produits par les algues sont convertis en biocarburant « de troisième génération », bioéthanol, biogaz, dihydrogène H₂ et de bioélectricité. L'avantage de ce type de biocarburant c'est qu'il n'entre pas en compétition avec l'agriculture ni au détriment de l'alimentation comme c'est le cas des biocarburants de première et deuxième générations. Pendant 4 jours en 2010, EADS, maison mère d'Airbus, a utilisé un biocarburant dérivé 100% d'algues pour faire voler chaque jour un Diamond DA42NG. D'autant plus, la production de biocarburant par des microalgues a l'avantage de réduire les émissions de gaz à effet de serre et de préserver l'environnement. Il a été reporté qu'au cours de leur développement, une

production de 100 kg d'algues consomme 182 Kg de CO₂ (Person, 2011). L'utilisation de biodiesel diminue la toxicité de l'air à 90% et 95% des cancers (Huang et al., 2010). Les polysaccharides des macroalgues servent pour la production de bio-alcool, bio-méthane, des émulsifiants et des tensioactifs.

3.6. *Domaine environnemental et biomatériaux*

La biomasse algale peut être utilisée pour le traitement des déchets, des effluents municipaux et industriels et des sites pollués d'hydrocarbures.

Les macroalgues représentent également une source pour la fabrication de biomatériaux. En effet, les alginates microalgues permettent la fabrication des fils d'alginate de calcium pour fabriquer les compresses. La farine d'algue brune est mixée avec de la cellulose pour former des fibres de viscose utilisable en textiles d'ameublement et pour les vêtements de sport et sous-vêtements. Les alginates sont également trouvés dans les colles, ciments, papier, carton et produits de céramique.

3.7. *Domaine de la biotechnologie*

Parmi les autres applications recherchées de nos jours c'est la transformation des microalgues pour la production de protéines recombinantes de haute qualité et à moindre coût. Selon une enquête récente, plus de 100 protéines recombinantes ont été exprimées dans les chloroplastes d'algues (Ahmad et al., 2020). Ces microorganismes présentent une solution pour y faire grâce à leur croissance rapide comparée aux autres végétaux et à leur capacité d'introduire les modifications post-traductionnelles (Cadoret et al., 2008).

L'utilisation des algues a été bien cadrée et règlementée selon la procédure CE258/97 «Nouveaux aliments » (JOCE du 27/01/1997) (Person, 2011). Plusieurs microalgues ont été autorisées pour la consommation humaine telle qu'*Arthrospira platensis* (cyanobactérie) depuis 1981, *Odontella aurita* (diatomée) depuis 2002 et *Chlorella vulgaris* (chlorophycées) depuis 2004. Les extraits de β-carotène (E160a) issus de *D. salina* pour alimentation humaine et l'astaxanthine (E161j) extraite de la microalgue *Haematococcus pluvialis* essentiellement pour alimentation des poissons (truites et saumons) sont également autorisés. Selon la loi française, la microalgue appartenant au genre *Dunaliella* a été autorisée pour l'utilisation en alimentation depuis 24 juin 2014 selon l'arrêté établissant la liste des plantes, autorisées dans

les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi. Person détaille aussi la réglementation d'utilisation des macroalgues dans les différents domaines (Person, 2011).

4. Production et modes de culture des algues

Vu les grands intérêts des algues et leurs larges spectres d'applications, le monde est invité à pousser et encourager la production et la culture de ces organismes. En revanche, jusqu'à 2011, l'exploitation des algues à l'échelle mondiale reste marginale avec 15 millions de tonnes/an de macroalgues et 7 à 10 000 tonnes/an de microalgues par rapport à la production végétale terrestre qui est estimée à 4 milliards tonnes/an (Person, 2011). Le défi de nos jours sera d'améliorer les méthodes de cultures actuelles pour augmenter à grande échelle cette production. Les macroalgues sont cultivées en milieu maritime naturel alors que les microalgues sont cultivées soit en photoautotrophie (Raceways ou photobioréacteurs) ou en hétérotrophie (Person, 2011). Les systèmes ouverts Raceways sont les plus utilisés grâce à leur faible coût, simplicité et leur standardisation. Cependant, ils sont plus affrontés aux problèmes de contaminations et la dépendance des conditions naturelles du milieu ... L'eau utilisée pour alimenter ce type de système provient parfois des eaux de ruissellement et les eaux usées de traitement. Cependant, le système fermé en photobioréacteur PBR a une productivité plus importante et il est plus adapté aux cultures sensibles en évitant les contaminations biologiques et/ou chimiques et en contrôlant d'avantage les paramètres de culture. En contre-partie, ce système coûte beaucoup plus cher et il est plus complexe à mettre en place (Person, 2011). Le choix d'un procédé de culture dépend de l'application à envisager, la biomasse récoltée et la nature de la microalgue (Metting, 1996).

La récolte de la biomasse algale se fait par diverses méthodes qui se repose sur les principes de séparation par différence de masse volumique des cellules par rapport à celle du milieu et de séparation par exclusion de taille (Person, 2011). Pour la première méthode, nous citons les techniques de sédimentation, de floculation-décantation, de flottation et de centrifugation. La deuxième méthode est basée sur des procédés de séparation à membranes et de tamisage.

5. *Dunaliella*

5.1. Présentation générale

Plus d'un siècle est passé depuis la nomination de *Dunaliella* par Teoderesco en 1905 (Teoderesco, E.C., 1905) à l'honneur à Michel Fliex Dunal qui l'avait identifié pour la première fois en 1838 dans les marais salins de Montpellier. Il l'avait nommé *Haematococcus salinus* et *Protococcus* au début. Elle avait pris différents noms avant d'être nommée *Dunaliella salina* (Oren, 2005). Ces cellules de couleur orange qui se convertissent en verte dans les conditions de moindre salinité, étaient sujets de confusion, au début : s'il s'agit de deux espèces différentes ou plutôt d'une forme d'adaptation de la même espèce (Oren, 2005). Au cours du temps, une vingtaine d'espèces a été identifiée dans le genre *Dunaliella*. Elles appartiennent à l'embranchement des *Viridiplantae*, *Chlorophyta*, classe des *Chlorophyceae*, ordre des *Chlamydomonadales* et famille des *Dunaliellaceae* selon NCBI. L'halotolérante *D. salina* est l'holotype de ce genre (<https://www.algaebase.org/>). Ces microalgues vertes sont unicellulaires, uni-nucléées, de taille d'environ 10 μm , biflagellées, entourées d'un glycocalyx et manquent d'une rigide paroi cellulaire ce qui leur permet une réponse rapide aux conditions d'hypo ou d'hyperosmolarité (Chen and Jiang, 2009; Ramos et al., 2011; Ye et al., 2008). Elles se reproduisent par division longitudinale d'une cellule motile végétative ou par reproduction sexuelle suite à la fusion de deux gamètes formant un zygote ayant une couche externe plus épaisse (Oren, 2005). Ces zygotes peuvent libérer jusqu'à 32 cellules filles haploïdes à travers une déchirure de l'enveloppe cellulaire. *D. salina* peut développer une étape palmelloïde végétative de cellules rondes non mobiles par réduction de salinité (Oren, 2005). Elle se caractérise par une capacité exceptionnelle à survivre sous certaines contraintes environnementales en produisant des composés de haute valeur ajoutée tels que les acides gras polyinsaturés et un taux élevé de β -carotène pouvant atteindre 10 à 14% de son poids sec (Ramos et al., 2011). Elle est capable également d'accumuler plus de 50% de sa MS en glycérol (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009). La composition de *D. salina* dans des conditions normales est estimée à 57% de protéines, 32% de carbohydrate et 6% de MS en lipides (Priyadarshani and Rath, 2012). C'est vrai que *D. salina* a été retrouvé dans les milieux trop salins mais à l'échelle laboratoire il a été démontré qu'elle a un meilleur taux de croissance à moindre salinité et que sa croissance dans les milieux hypersalins n'est qu'une forme d'adaptation à son environnement de manière plus efficace que ses concurrents (Oren, 2005).

Le génome séquencé et annoté de la souche *D. salina*: CCAP 19/18 a été déposé via 19 BioProjects dans NCBI (NIH) (Polle et al., 2017). Les plates-formes Illumina ou PacBio ont été utilisées produisant 554,53 Gbp (après filtrage de qualité). Avec une approche d'annotation conservatrice utilisant un assemblage masqué par répétition, le projet de génome présenté contient 16697 locus fournissant 18801 transcrits de codage de protéines. Ce projet a comme nombre d'accèsion sur GenBank: PRJNA32771 et ID 32771. La taille du génome est de 343,704 Mb à 40,1% en GC. Le centre qui a assuré ce séquençage est le « Center DOE Joint Genome Institute (JGI) (USA) » en collaboration avec « Pacific Northwest National Laboratory » avec un financement de « U.S. Department of Energy (DOE) (USA) ».

Avant le séquençage de son génome, cette souche a subi des essais de production de protéines recombinantes vues sa déficience en membrane rigide ce qui facilite la transformation et la récolte de protéines. De plus, sa culture en hypersalinité est un critère de sélectivité diminuant ainsi les risques de contaminations. Cependant, le manque de connaissances des promoteurs a été révélé comme un obstacle (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009). Ainsi, le séquençage du génome peut présenter un atout pour cette application.

5.2. Production de *Dunaliella*

La production de *Dunaliella* est bien développée à l'échelle industrielle grâce à la baisse des risques de contamination dans les systèmes ouverts vue sa culture dans un milieu sélectif à haute salinité. "Henkel-Cognis Nutrition and Health" est le plus grand producteur de *D. salina* dans le monde à Whyalla (sud d'Australie) par modification d'un lac salé naturel. Elle est produite en poudre pour être exploitée dans des compléments alimentaires et des aliments fonctionnels. Il existe d'autres sociétés en USA, Chine, Israël, etc. (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009; R. Raja et al., 2007).

5.2.1. Production de caroténoïdes par *Dunaliella*

Le grand intérêt accordé à la production de *D. salina* est plutôt par ce qu'elle est la principale source de β -carotène, précurseur de vitamine A. Le β -carotène de couleur orange est composée d'une longue chaîne conjuguée de huit unités d'isoprène avec un centre de symétrie et un cycle β -cyclohexane à chaque extrémité. Il existe quatre stéréoisomères possibles: le 9-cis- β -carotène, le β -carotène all-trans, le 13-cis β -carotène et le 15-cis β -carotène. *D. salina* peut produire jusqu'au 14% de sa MS en β -carotène dont l'isoforme 9-cis pourrait atteindre jusqu'au 60%. La forme 9-cis a les meilleures activités antioxydantes et

anticancéreuses, tandis que le all-trans a moins d'activité et peut être cancérigène (Hosseini Tafreshi et Shariati, 2008). Dans la nature, la forme trans est la plus stable, la conversion all-cis aura lieu sous des conditions de hautes température et/ou intensité lumineuse (Domonkos et al., 2013). Les formes synthétiques de β -carotène sont aussi des all-trans. Le β -carotène est utilisé pour l'alimentation animale pour donner de la coloration aux chairs de poisson et au jaune d'œuf et améliore la santé et la fertilité des bovins nourris au grain. Ce puissant antioxydant contribue à l'inhibition et la prévention contre différents types de cancer, contrôle le niveau de cholestérol et réduit le risque de maladies cardio-vasculaires (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009).

Cette microalgue produit d'autres caroténoïdes de grand intérêt à savoir la zéaxanthine, la cryptoxanthine, la néoxanthine, le phytoène, le phytofloène et la lutéine. Ce dernier diminue le risque de cataracte, artériosclérose et la dégénérescence musculaire liée à l'âge.

5.2.2. Expression hétérologue de caroténoïdes

L'exploitation bénéfique des caroténoïdes a poussé les chercheurs à essayer de les surproduire dans des organismes non caroténogènes comme *E. coli* et les levures par expression hétérologue des gènes de caroténogénèse. Cependant, ces essais ont eu des résultats limités en comparaison avec la production endogène de *Dunaliella*. *E. coli* surexprimant DXS et DXR (1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase), a une production maximale de 1,6 mg/g de MS comparativement à 50 mg/g de *Dunaliella* commercialisé (Ye et al., 2008). Cette incapacité à stocker une grande quantité de caroténoïdes a été expliquée par le fait que les caroténoïdes lipophiles vont surcharger les membranes et bloquer leur fonctionnalité. *Dunaliella* a l'avantage d'accumuler des caroténoïdes dans les globules lipidiques au niveau de l'espace interthylakoïdien du chloroplaste, ce qui pourrait la protéger de tout effet toxique suite à la forte concentration de composés dans la membrane (Ye et al., 2008). Un essai de transformations successives de caroténogénèse et ajout des acides oléiques et palmitolèiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis une accumulation de 1,04 mg/g de β -carotène (Saini and Keum, 2017).

5.2.3. Utilisation de *Dunaliella* dans des applications thérapeutiques

Cette microalgue a attiré l'attention des chercheurs grâce à sa richesse en composés actifs, à caractères hydrophobes ou hydrophiles élargissant ainsi son spectre d'applications.

Des extraits dans différents solvants ont été préparés à partir de cette souche ciblant notamment le β -carotène et ses dérivés (Tableau 4).

Tableau 4. Exemples d'utilisation de *D. salina* dans des applications thérapeutiques

Méthode d'extraction	Produits identifiés	activités	références
hexane/acétone/EtOH (2/1/1, v/v/v) → saponification au KOH méthanolique → laver 3 fois avec 400 ml d'eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> All-trans-lutéine All-trans-zeaxanthine 13- ou 13'-cis-β carotène All-trans-α carotène 9- or 9'-cis-α carotène All-trans-β carotène 9- or 9'-cis-β carotène 	antioxydant	(Hu et al., 2008)
Même méthode de (Hu et al., 2008)	Mêmes produits identifiés	Effet contre la Cytotoxicité du Cadmium	(Lin' et al., 2010.)
	Mêmes produits identifiés	Effet sur la production de médiateurs pro-inflammatoires stimulés par LPS dans les cellules RAW264.7 via l'inactivation de NF- κ B et JNK	(Yang et al., 2013)
	Mêmes produits identifiés	L'effet anti-inflammatoire sur les macrophages RAW 264,7 infectés par le virus de la pseudo-rage (PRV).	(Lin et al., 2014)
Extrait éthanolique	<ul style="list-style-type: none"> all-trans-β-carotène 9-cis-β-carotène 	Activité anticancéreuse de poumon (cellules A549)	(Sheu et al., 2008)
Extrait 70% éthanol	<ul style="list-style-type: none"> α-carotène β-carotène lutéine cryptoxanthine zeoxanthine 	activités analgésiques et anti-inflammatoires (<i>in vivo</i>)	(Chou et al., 2010)
Extrait 70% éthanol	ND	Activité anticancéreuse HL-60 et MV-4-11 (cellule leucémique)	(Bechelli et al., 2011)
Extrait éthanolique	<ul style="list-style-type: none"> β-carotène 	Activité anticancéreuse A431 (lignée cellulaire de carcinome cutané)	(Emtyazjoo et al., 2012)
Extrait méthanolique	<ul style="list-style-type: none"> β-carotène purifié 	Activité anticancéreuse MDA-MB-231 (cellules cancéreuses)	(Olmos et al., 2015)

Extrait méthanolique	ND	du sein) Activités antibactériennes (isolée de patients avec otite externe)	(Pane et al., 2015)
Extrait à l'acétone → hexane/eau	<ul style="list-style-type: none"> • β-carotène purifié 	Activité anticancéreuse Cellules PC-3 (prostate humaine)	(Jayappriyan et al., 2013)
Extrait à n-hexane /alcool isopropylique (1: 1)	<ul style="list-style-type: none"> • β-carotène • α-carotène • lutéine • lycopène 	Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i>	(Murthy et al., 2005)
hexane/éthanol/acétone/tol uène (10:6:7:7; v/v/v/v) →40% KOH méthanolique (saponification) →10% sulfate de sodium + hexane	<ul style="list-style-type: none"> • α-carotène, • lutéine, • zéaxanthine, • all trans-β-carotène • 9-cis- β -carotène 	Evaluation de l'activité anti-carcinome squameux oral (cellules KB)	(Chiu et al., 2017)
Méthode d'extraction	Doses utilisées	activités	références
Poudre entière	Administration orale : 184,5 ; 369 ; et 922,5 mg/kg	Evaluation des Propriétés immunologiques et activité anti- leucémique (<i>in vivo</i> en utilisant les cellules de leucémie WEHI-3, souris)	(Chuang et al., 2014)
Poudre entière	Administration orale : 500 mg/kg	effet d'amélioration dans la colite expérimentale (<i>in vivo</i> , rat)	(Abdel-Daim et al., 2015)
Poudre entière	Administration orale : 500 et 1000 mg/kg	activité antitumorale <i>in vivo</i> (rat) contre la carcinogénèse mammaire induite par DMBA	(Srinivasan et al., 2017)
Poudre entière	Administration orale : 500 et 1000 mg/kg	Effet contre fibrosarcome (<i>in vivo</i> : rat)	(Rathinam Raja et al., 2007)
Extraction au CO₂ supercritique	Administration orale : 150 mg	Effet anti-diabète (rat)	(Ruperez et al., 2009)

5.3. Etat des lieux des stress appliqués à *Dunaliella*

Dunaliella s'est avérée capable d'adapter son métabolisme suivant les conditions de culture appliquées en produisant différents métabolites pour y faire face. Le tableau 5 présente quelques études qui ont observé l'effet des stress sur cette souche dans le but de surproduire des métabolites d'intérêt.

Tableau 5. Exemple de quelques études analysant l'effet de stress sur la production de certains métabolites chez *Dunaliella*. Abb : dehydroascorbate (DHA), glutathione forme réduite et oxydée (GSH and GSSG), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD)

Molécules surproduites	Conditions de cultures	Espèce	Références
β-carotène	<ul style="list-style-type: none"> • NO₃⁻ (0 – 10 mM) • SO₄²⁻ (0 – 10 mM) • Lumière (5 – 550 kerg cm⁻² s⁻¹) • Interaction lumière et salinité (1 – 4 M) 	<i>D. bardawil</i> <i>D. salina</i>	(Ben-Amotz and Avron, 1983)
	<ul style="list-style-type: none"> • Culture en mixotrophie • méthodologie de surface de réponse (Glucose (5 -15 g/l), KNO₃ (0,1-5 g/l), KH₂PO₄ (0,01-0,07 g/l)) 	<i>D. salina</i>	(Morowvat and Ghasemi, 2016)
	<ul style="list-style-type: none"> • KNO₃ : 0, 1,2, 6 et 12mM • malonate 45 mM • acétate 45 mM • concentration en fer FeSO₄ (450 ; 675μM) 	<i>D. salina</i>	(Mojaat et al., 2008)
	<ul style="list-style-type: none"> • Salinité : 1, 2 et 3 M NaCl 	<i>Dunaliella</i> sp. isolats du lac Urmia au nord-ouest d'Iran	(Rad et al., 2011)
	<ul style="list-style-type: none"> • Deux milieux de culture: Provasoli et ASW à différentes salinité 1M, 2M and 3M NaCl. 	<i>D. salina</i> (strain CONC-007) <i>Dunaliella bardawil</i> (strain ATCC 30861)	(Gomez et al., 2003)
	Interaction <ul style="list-style-type: none"> • lumière 54 μmol m⁻² s⁻¹ 	<i>D. salina</i>	(Wu et al., 2015)

	<ul style="list-style-type: none"> et 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ • azote 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5, 0,75 et 1 g l^{-1} 		
	<ul style="list-style-type: none"> • systèmes à deux phases à une ration de 2:1 (aqueux / organiques (décane)) 	<i>D. salina</i>	(León et al., 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> • Conception orthogonale de la lumière et de la température • Conception orthogonale L9 de KNO_3, $\text{CO (NH}_2)_2$ et NaHCO_3 	3 souches de <i>D. salina</i> isolées de sol salin en Thaïlande	(Z. Wu et al., 2016)
Caroténoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Salinité : 0,6 ; 1,5, 3 et 4,5 M NaCl 	<i>D. salina</i> collectée de Laa^dhibet (Sud de la Tunisie)	(Farhat et al., 2011)
	<ul style="list-style-type: none"> • Effet de la limitation en azote et micronutriments à haute intensité lumineuse 	<i>D. salina</i> CCAP 19/20	(Saha et al., 2018)
	<ul style="list-style-type: none"> • méthodologie de surface de réponse (Salinité : 58,44-116,88 g/l, lumière : 70-240 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, azote NaNO_3 : 0,02-0,1 g/l) 	<i>D. salina</i> isolée de Sebkhia Sidi El Hani (Sousse, Tunisie)	(Ben Amor et al., 2017)
Caroténoïdes, APX	<ul style="list-style-type: none"> • CuCl_2 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM) 	<i>Dunaliella tertiolecta</i> et <i>D. salina</i>	(Nikookar et al., 2005)
β-carotène (+ lutéine, zéaxanthine, α-carotène et Glycérol)	<ul style="list-style-type: none"> • Lumière : (200 ; 500, 1000 et 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 	3 souches de <i>D. salina</i> isolées d'Israël (DF15, DF17) et d'Espagne DF40 Comparées à <i>D. salina</i> CCAP 19/30(<i>D. tertiolecta</i>) et <i>D. salina</i> UTEX 2538 (<i>D. bardawil</i>).	(Xu et al., 2018)
Caroténoïdes (β-carotène, zeaxanthine, Lutéine, Cryptoxanthine) α-Tocopherol, acid ascorbique, GSH, Catalase, Peroxidase, SOD	<p>Interaction entre les facteurs prises deux à deux</p> <ul style="list-style-type: none"> • Azote KNO_3 (5 et 2,5 mM) • Salinité (8; 12 et 16 % NaCl) • UVB 	<i>D. salina</i>	(El-Baky et al., 2004)
β-carotène, chl a et b, ascorbate, DHA, GSH/ GSSG, APX, MDHAR, DHAR, GR, SOD, pyrogallol-dependent peroxidase	<p>Interaction entre</p> <ul style="list-style-type: none"> • Température (13 et 28°C) • Lumière (100 et 1200 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 	<i>D. salina</i> (IR-1 et Gh-U) isolées de deux régions en Iran	(Haghjou et al., 2009)
Lipide	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 	<i>D.</i>	(Ahmed et al.,

Caroténoïdes, sucre	and 2,5 M)	<i>salina</i> SA 134	2017)
Glycérolipides, glycérophospholipides et caroténoïdes	Interaction entre <ul style="list-style-type: none"> • Lumière (50 et 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) • déprivation en azote NO_3 	<i>D. tertiolecta</i> (UTEX LB999)	(Kim et al., 2013)
β-carotène AG totaux	<ul style="list-style-type: none"> • Culture en Turbidostat • appauvrissement en azote 	<i>D. salina</i> (CCAP 19/18)	(Lamers et al., 2012)
Lipides et TAG	<ul style="list-style-type: none"> • Salinité (0,5 et 1 M) 	<i>D. tertiolecta</i> ATCC	(Takagi et al., 2006)
	<ul style="list-style-type: none"> • effet du stade de récolte et du taux de dilution • déprivation en azote, phosphore, vitamines et oligo-éléments 	<i>D. salina</i> (CCAP 19/30) <i>Nannochloropsis Salina</i> (CCAP 849/2)	(Chen et al., 2015)
	<ul style="list-style-type: none"> • ration N/P (25/1 ou 14/1) 	<i>D. salina</i> SA32007, isolée de « Salar de Atacama »	(Arias-Forero et al., 2013)
Glycérol/amidon, caroténoïdes,	<ul style="list-style-type: none"> • effet de la photopériode (4/20 LD), (8/16 LD), (12/12 LD), (16/8 LD) et (20/4 LD) • effet de l'intensité lumineuse (50 ; 100 ; 200 ; 500 ; 1000 et 1500 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) 	<i>D. salina</i> CCAP 19/30	(Xu et al., 2016)
Glycérol / amidon	<ul style="list-style-type: none"> • salinité : 8,766% et 17,532% 	<i>D. salina</i> FACHB 435	(Xia et al., 2014)
	<ul style="list-style-type: none"> • salinité : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5, 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 et 5 M NaCl 	<i>D. salina</i> 435 (UTEX 200)	(H. Chen et al., 2011)
	<ul style="list-style-type: none"> • hypo et hypersalinité 	<i>D. salina</i>	(Zhao et al., 2013)
Chlorophylle a, protéine	<ul style="list-style-type: none"> • méthodologie de surface de réponse : lumière (30–80 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), température (20-30 °C), agitation (100-200 rpm) 	<i>D. salina</i> isolée d'Ayvalik, Balikesir, Turquie	(Imamoglu et al., 2014)
protéine	<ul style="list-style-type: none"> • salinité (1 ; 2 et 3 M) • pH (7,5 ; 8,5 ; 9,5) • phase de croissance 	<i>D. salina</i> SAG 184.80 (Allemagne)	(Sui and Vlaeminck, 2019)

Dunaliella a été choisie comme un modèle d'étude de tolérance au stress salin et au caroténogénèse. D'après le tableau ci-dessus, nous remarquons que suite au même stress, différents métabolites issus de différentes voies métaboliques sont produits. Il est un peu délicat de comparer les niveaux de production des caroténoïdes (β -carotène) entre ces différentes études étant donnée la variabilité des méthodes d'extraction appliquées, des

formules utilisées pour le calcul des concentrations, des unités d'expression, des méthodes d'illumination et des isolats de *D. salina*. Certains auteurs considèrent que *Dunaliella* est une souche photo-autotrophe obligatoire alors qu'aujourd'hui plusieurs essais de culture en mixotrophie ont été enregistrés (Morowvat and Ghasemi, 2016). Les facteurs les plus étudiés dans la culture de *Dunaliella* sont la salinité, la concentration en azote et l'intensité lumineuse.

5.4. Mécanisme de réponse au stress chez *Dunaliella*

Divers mécanismes ont été proposés pour comprendre les voies mobilisées par *Dunaliella* pour la réponse aux conditions de stress stimulant la synthèse des molécules de réponse. Plusieurs auteurs ont essayé d'expliquer la voie de caroténogénèse chez *Dunaliella* suivant les données disponibles (Lamers et al., 2008; Ye et al., 2008). L'augmentation de la salinité, le manque en nutriments (en azote par exemple) et les températures extrêmes (notamment une baisse de température) sont des facteurs qui diminuent le taux croissance. Il a été reporté qu'en cultivant les cellules en conditions de faible taux de croissance et à haute intensité lumineuse, un déséquilibre entre l'énergie utilisée et l'énergie fournie a été créé ce qui a conduit à la production de l'oxygène singlet $^1\text{O}_2$ (ROS) surexcitant ainsi la chlorophylle du photosystème PSII (Lamers et al., 2008; Ye et al., 2008). Les ROS jouent le rôle d'un second messager dans certaines voies de signalisation. Vu la courte durée de vie et la haute réactivité de ces composés, leurs récepteurs devraient être situés à proximité du PSII ce qui suggère qu'il s'agirait peut être des lipides membranaires du chloroplaste (produits de lipooxydation). Les ROS endommagent l'ADN, les protéines et les lipides des cellules. Les microalgues tendent alors à les neutraliser en produisant des antioxydants enzymatiques (SOD, catalase, glutathion peroxydase et APX) et non-enzymatiques (Glutathion, α -tocophérol et caroténoïdes). L'état redox de la plastoquinone semble être une autre alternative de réponse au stress. En effet, au cours de la photosynthèse, la lumière excite le PSII qui transfère les électrons via une cascade de réactions redox à la plastoquinone pour être réduit en plastoquinol. En cas de déséquilibre entre l'intensité lumineuse fournie et utilisée (moins de besoin de NADPH), le taux de production d'électrons par PSII peut dépasser le taux d'oxydation du plastoquinol. En conséquence, le pool de plastoquinone est fortement réduit. Cette modification de l'état redox de la plastoquinone peut être responsable de l'altération de l'expression de quelques gènes (Lamers et al., 2008). Cet auteur a également mentionné la

possibilité de la présence d'un photorécepteur des UV-A au sein des cellules ce qui expliquerait la caroténogenèse suite à un stress de haute intensité lumineuse.

6. Structure de la LYBC

C'est une enzyme clé, responsable de la cyclisation du lycopène en β -carotène. Elle semble avoir le même ancêtre commun chez les plantes, les algues et les cyanobactéries. LYCB est l'équivalent de CrtL-B chez les bactéries. LCYB des cyanobactéries présente environ 400 Aa contre 500Aa pour les plantes. Deux types de lycopène cyclase peuvent être présents: epsilon et bêta résultant d'un événement de duplication d'un ancien gène ou d'un transfert de gène par endosymbiose (Cui et al., 2011). *D. salina* possède une seule copie du gène *LCYB* sous forme bêta avec 11 exons et 10 introns où les exons présentent 21% (1,9 de 9 kb) du gène *DsLCYB* (Ramos et al., 2008). Il est supposé que la forme epsilon est perdue au cours de l'évolution (Cui et al., 2011). Cette hypothèse reste à discuter étant donné que les analyses chimiques des caroténoïdes de *D. salina* montrent l'existence de l' α -carotène. (Ramos et al., 2008) ont isolé et identifié le gène *LYCB* de *D. salina* à partir de cDNA de 1910 pb codant pour une protéine de 584 Aa avec un poids moléculaire de 64,5 kDa (ACA34344.1). *DsLCYB* a une séquence proche des séquences des microalgues *H. pluviialis* et *C. reinhardtii*. Dans la même année (Zhu et al., 2008) ont également identifié une LYCB de *D. salina* de 607 Aa, d'une masse moléculaire de 66,88 kDa et de pI de 8,45. Ces auteurs suggèrent que la LCYB peut être trouvée comme étant un complexe multienzymatique avec d'autres lycopène désaturases.

B. Le cancer

1. Généralités

1.1. Chiffres et idée générale sur le cancer

Le cancer (du grec *karkinos*, qui signifie « crabe »), désigne une prolifération anormale des cellules. Il désigne plus de 277 maladies cancéreuses (Hassanpour and Dehghani, 2017). C'est une maladie due à une désorganisation du patrimoine génétique. Il est le résultat de prolifération de cellules mutées dépassant ses limites habituelles et envahissant par des métastases les parties adjacentes de l'organisme. Cette dissémination accentue la difficulté de traitement par la suite et augmente le nombre de décès. C'est donc une maladie du cycle cellulaire où la cellule ignore les signaux "stop" et n'attend pas les signaux "go" au

cours de la phase G1 ce qui favorise la réplication excessive de l'ADN et augmente la probabilité de mutations induites par la réplication et de dégénérescence des télomères (Feitelson et al., 2015).

Le cancer est considéré comme la deuxième cause de mortalité dans le monde avec un nombre de décès estimé de 9,6 millions en 2018. Ce chiffre peut atteindre 13 millions en 2030. Selon le *Fonds Mondial de Recherche* contre le *Cancer* et l'*Institut américain du cancer* (<https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>), le nombre de cas de cancer dans le monde en 2018 a été estimé à 18 millions, dont 9,5 millions chez les hommes et 8,5 millions chez les femmes.

Certains types de cancer sont plus fréquents dans les pays en cours de développement à cause du manque de conditions hygiéniques favorisant la transmission virale, le manque des possibilités de diagnostic et de traitement. Dans les pays ayant des revenus faibles ou intermédiaire, environ 70% des décès sont dû au cancer. Mais, certains type de cancers sont plus propagés dans les pays développés et ceci peut-être dû à une population plus vieille (espérance de vie plus longue) et/ ou un mode alimentaire trop gras. Le principal type de cancer selon l'OMS est le cancer du poumon avec 1,69 million de décès suivi par le cancer du foie avec 788000 décès. Le cancer du sein arrive en cinquième position avec 571000 de décès, c'est le premier type de cancer chez les femmes. Chez les enfants, ce sont les cancer du sang, de cerveau et des ganglions, qui sont les plus fréquents (Hassanpour and Dehghani, 2017). En Tunisie, 4500 décès dus au cancer ont été enregistré chez les hommes en 2014 (population totale 10,875,000) dont 32,3% sont dues au cancer de la trachée, branches et poumon. Pour les femmes, 2800 décès sont enregistrés dont 22% sont dus au cancer du sein. Quant en France, 97800 et 72700 décès dus au cancer sont enregistrés chez les hommes et les femmes respectivement (population totale 63,937,000). Comme observé en Tunisie, les cancers les plus dominants sont les cancers de la trachée, branches et poumons chez les hommes (24,9%) et le cancer de sein (19,9%) chez les femmes.

1.2. Les différents types de cancer

On distingue 3 grands types de cancer suivant le tissu envahi:

- les carcinomes : les plus fréquents (plus de 85 %) où les cellules cancéreuses apparaissent au sein d'un épithélium. Les adénocarcinomes se développent à partir de l'épithélium d'une glande telle que le poumon, sein, peau, côlon, prostate...
- les sarcomes : c'est le cas où les cellules cancéreuses apparaissent dans un tissu « de support » comme les os, la graisse ou les muscles.
- les cancers hématopoïétiques : le cancer affecte le sang (les leucémies) ou les organes lymphoïdes (les lymphomes).

1.3. *Les facteurs de risques*

Les principaux facteurs de risque cités par l'OMS sont : l'indice élevé de masse corporelle, la faible consommation de fruits et légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool. Ces facteurs sont responsables d'un tiers de décès par le cancer. Le tabagisme à lui seul est responsable d'environ 22% de décès. Un autre facteur cancérigène est les infections bactériennes et virales notamment par *Helicobacter pylori*, le papillomavirus humain (HPV), le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C, le virus d'Epstein Barr et le virus de l'immunoféficience humain (VIH). Dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, 25% des cancers sont dus à des infections virales. Dans ces pays où l'accès aux services de cancérologie est généralement limité comme en Afrique, les cancers ne sont ni dépistés, ni traités, ni soulagés par les soins palliatifs (<https://www.who.int/fr>).

D'autres facteurs influencent directement le patrimoine génétique et le cancer qui en résulte est le résultat d'agression du génome lié à l'exposition à des agents cancérigènes qui peuvent être classés en des facteurs externes ou endogènes (hormones). Ils peuvent être groupés en des agents cancérigènes mutagènes (suie, polluants industrielles, rayons UV, radiations ionisantes, goudrons, les composants de la fumée du tabac, gaz moutardes azotées, aflatoxine, arsenic...) ou des agents cancérigènes non-mutagènes (hormone, alcool, amiante, ...).

Le cancer est une maladie de troisième partie de la vie (à partir de 50 ans) où l'effet de vieillissement cellulaire apparaît par l'accumulation des risques tout au long de la vie avec la perte de l'efficacité des mécanismes de réparation des mutations de l'ADN. Enfin, certains cancers peuvent apparaître dus à une prédisposition génétique par l'hérédité d'une forme de mutation génique.

1.4. Carcinogénèse

La carcinogénèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs facteurs et régulateurs. Au début, les tissus subissent des modifications de la structure et du phénotype et la formation de nodules prénéoplasiques. Dans le cas de certains cancers, la formation de région d'hypoxie va avoir lieu suite à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la migration cellulaire. Ces mécanismes accompagnés par l'autophagie dans les conditions stressantes favorisent l'angiogénèse et la survie des cellules prénéoplasiques et tumorales. Ces dernières qu'elles soient en croissance ou en métastases, perdent la régulation qui caractérise les cellules normales suite à des mutations et / ou à des changements épigénétiques (Feitelson et al., 2015). Dans les cellules cancéreuses, on a constaté une réduction importante de la méthylation d'ADN (Hassanpour and Dehghani, 2017). Chaque type de cancer est différent de l'autre à cause de la diversité des manières d'acquisition du désordre génétique. Généralement 4 à 5 mutations seront à l'origine de la modification du génome des cellules qui sont transformées par la suite des cellules cancéreuses.

La carcinogénèse a besoin d'un grand supplément de nutriment et d'O₂. Pour assurer cette irrigation du tissu, une néoformation de vaisseaux sanguins aura lieu. Mais à cause de la croissance rapide de la tumeur, celui-ci peut devenir hypoxique et s'acidifie. La croissance s'arrête et les cellules sont nécrosées. L'état d'hypoxie peut induire l'expression du facteur de transcription hypoxique (Hypoxia Induced Factor: HIF) qui favorise l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'angiogénèse, la glycolyse anaérobie, la régulation du pH, la migration et l'apoptose. En présence d'oxygène, HIF est détruit par hydroxylation (Pouyssegur et al., 2004). L'acidification du tissu provient du fait que les cellules cancéreuses tiennent leur énergie à partir de la glycolyse qui fournit seulement 2 molécules d'ATP au lieu de 36 obtenu par phosphorylation aérobie. La fermentation anaérobie accumule l'acide lactique d'où la baisse du pH. Cette voie permet en revanche l'accélération de la production de nouvelles molécules comme les acides nucléiques, pour la duplication du génome, ou les acides aminés pour synthétiser de nouvelles protéines. Ceci est renforcé par la mobilisation de la glutaminolyse pour la production de petites molécules comme le glutamate, l'aspartate, le CO₂, le pyruvate, le lactate, l'alanine et le citrate par la lyse de la glutamine qui serviront pour la prolifération par la suite. Ce changement de voie métabolique rend la cellule moins sensible à l'hypoxie et au ROS. La balance entre les voies anabolique et catabolique est maintenue par la voie de signalisation AKT (mTOR et AMPK). Dans le cas d'une

insuffisance en énergie, les cellules meurent par autophagie, mais ce même processus peut fournir de l'énergie et des blocs de constructions pour des nouvelles cellules (Podo et al., 2010).

La dernière étape est la métastase qui permet la propagation et la dissémination des cellules tumorales. Ce processus peut-être très précoce se produisant peu après la vascularisation de la tumeur. Dans la plupart des cas, les tumeurs ne peuvent pas dépasser 1 à 2 mm sans un apport sanguin indépendant (Guo et al., 2017).

1.5. Traitements

En cas de dépistage précoce et de traitement correct, certains cancers (cancer du sein, le cancer du col de l'utérus, le cancer de la cavité buccale, le cancer colorectal, la séminome du testicule ou les leucémies et les lymphomes chez l'enfant) présentent un pourcentage de guérison assez élevé.

Suivant le type et le stade d'avancement du cancer, un unique type ou une combinaison de traitement peuvent être utilisés. A l'heure actuelle, il existe un arsenal thérapeutique important de différentes méthodes de traitement : la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie, la thérapie ciblée, le traitement hormonal et la greffe de cellules souches.

2. Cancer de sein

2.1. Anatomie du sein

Les seins (du latin sinus, « courbure, sinuosité, pli ») sont des marqueurs de féminité et de maternité. Un sein est constitué d'une glande mammaire entourée par un tissu adipeux (figure 7). Cette glande est composée de 15 à 20 lobes dont chacun comporte de 20 à 40 lobules. Chaque lobule contient 10 à 100 acini. Le tissu graisseux sépare les lobes et donne au sein sa forme et son volume. Le lait secrété par les acini en période d'allaitement est drainé au mamelon, situé au centre de l'aréole, par des canaux galactophores. Ils sont soutenus par des ligaments en absence de muscles. La glande mammaire change au cours du temps où elle est sous forme rudimentaire inactive chez les deux sexes jusqu'à la puberté et à partir de ce moment elle se développe chez les femmes grâce aux hormones féminines fabriquées par les ovaires : estrogène et progestérone. Les seins sont bien vascularisés grâce à des systèmes

nerveux, sanguins et lymphatiques. Ce dernier est composé de vaisseaux lymphatiques et d'environ 35 ganglions autour de chaque sein, situé au niveau des aisselles (ganglions axillaires), au-dessus de la clavicule (ganglions sus-claviculaires); sous la clavicule (ganglions sous-claviculaires ou infra-claviculaires) et à l'intérieur du thorax, autour du sternum (ganglions mammaires internes). Ces ganglions protègent le sein des infections bactériennes. De plus, la lymphe transporte les déchets vers ces ganglions qui peuvent contenir des déchets de cellules cancéreuses, présentant ainsi le premier foyer de développement du cancer de sein à distance.

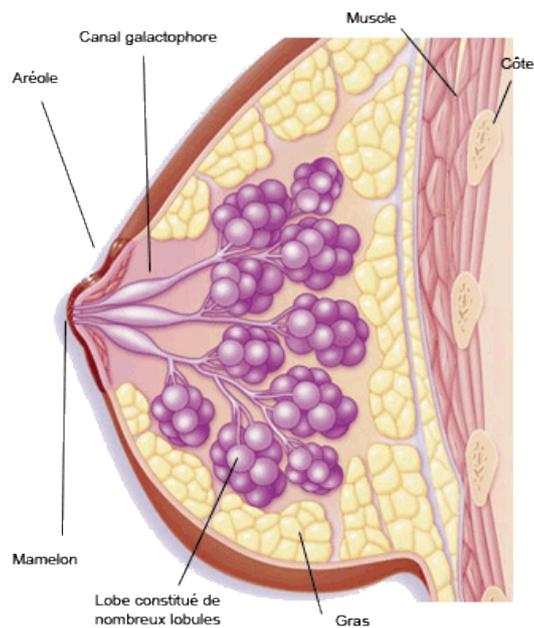


Figure 7. Schéma anatomique du sein chez les femmes (https://www.ligue-cancer.net/article/26094_cancer-du-sein)

2.2. Incidence du cancer du sein

Cet organe est susceptible d'attraper différentes pathologies bénignes telles que la mastodynie prémenstruelle, les écoulements en dehors de grossesse et d'allaitement, les fibroadénomes et les mastoses mais aussi les tumeurs malignes. A l'échelle mondiale, le cancer du sein est le plus répandu chez les femmes, représentant 25,4% du nombre total de nouveaux cas diagnostiqués en 2018, soit environ 2088849 cas (<https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>). Selon l'INCa, 58 968 nouveaux cas de cancer du sein en France sont enregistrés en 2017 et environ 11883 de décès. Son incidence augmente avec l'âge où le moyen âge de diagnostic est 61 ans. En

effet, 10% seulement surviennent avant 40 ans et 75% sont déclarés après 50 ans d'où il est conseillé aux femmes entre 50 et 74 ans de faire un dépistage organisé. Grâce au développement des techniques de dépistage précoce (Mammographie, échographie, test génétique, Biopsie ...) et l'avancement des traitements, le taux d'incidence et le taux de mortalité ont diminué chacun de 1,5% par an en moyenne entre 2005 et 2012. Chez les hommes, 0,5% des cancers masculins sont dus au cancer de sein.

Les mutations au niveau des gènes BRCA1 (chromosome 7q21) et BRCA2 (chromosome 13q12) sont associées au cancer de sein et sa transmission aux descendants. Les cancers du sein associés au gène BRCA1⁻ sont accompagnés par un manque ou faible expression des récepteurs hormonaux, HER2 et Bcl2 et la surexpression de p53, EGFR et des cytokératines basales (CK 5/6) (Podo et al., 2010). Ces cellules présentent une recombinaison homologue altérée et une incapacité à réparer les chromosomes défectueux (Morales et al., 2014).

2.3. Les différents stades du cancer de sein

Suivant la taille et l'avancement de l'évolution de la tumeur, 4 stades sont définis selon la classification TMN (« Tumor, Nodes, Metastasis » soit « tumeur, ganglions, métastases ») de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), 7ème édition:

- Stade 0: Connu sous le nom de carcinome canalaire in situ (DCIS), les cellules sont limitées à l'intérieur d'un canal et n'ont pas envahi les tissus environnants.
- Stade 1: la tumeur atteint 2 cm de diamètre sans affection les ganglions lymphatiques.
- Stade 2: La tumeur a 2 cm de diamètre et a commencé à se propager aux nœuds voisins.
- Stade 3: La tumeur a 5 cm de diamètre et peut commencer à se propager à certains ganglions.
- Stade 4: Le cancer s'est propagé à des organes éloignés, en particulier les os, le foie, le cerveau ou les poumons.

2.4. Classification

Suivant le matériel génétique de cette tumeur et l'absence ou la présence des récepteurs des estrogènes (RE), de la progestérone (RP) et celui du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2 / neu), le cancer de sein est classé en 4 types : le cancer du sein luminal A (RE⁺ et/ou RP⁺, HER2⁻), luminal B (RE⁺ et/ou RP⁺ et HER2⁺), enrichi en HER2 (RE⁻ et/ou RP⁻ et HER2⁺) et basal-like (BLBC) (RE⁻ et/ou RP⁻ et HER2⁻), un cinquième sous type peut être rajouté « normal-like » mais il est supposé qu'il provient d'une contamination d'échantillons par des cellules mammaires normales (Hon et al., 2016). En cas d'absence de ces trois récepteurs, c'est le cancer de sein triple négatif (TNBC) proche du type basal like. En cas d'absence de récepteurs d'androgène de plus, il est défini comme le cancer de sein quadruple négatif (QNBC) (Hon et al., 2016).

3. TNBC

3.1. Aspect général

L'appellation « triple négatif » est apparu pour la première fois en 2005. Il représente 12 à 17% des cas. C'est une tumeur agressive de pronostic défavorable, de grade nucléaire et activité mitotique élevées, ayant un haut pouvoir de métastaser les viscères, particulièrement les poumons (40%), le cerveau (30%), le foie (20%) et les os (10%) (Foulkes et al., 2010). Il peut apparaître entre deux diagnostics mammographies. Sa détection est parfois difficile due à sa croissance rapide et son occurrence chez les jeunes femmes ce qui augmente la probabilité de récurrence à distance et de décès dans les cinq ans suivant le diagnostic, mais pas par la suite. Une faible corrélation existe entre la taille de la tumeur quand elle est inférieure à 50 mm et les métastases ganglionnaires. Il est caractérisé par une altération du processus de réparation de l'ADN.

Une différence de distribution de ce type a été remarqué entre les femmes américaines africaines (AA) et blanches (WA) où les premières présentent une fréquence environ deux fois plus élevée que les femmes WA (15%) (Newman, 2015). Le pourcentage de TNBC chez les femmes à Ghana est d'environ 82%, quant au grec, elle est de 8% (Newman, 2015). En Tunisie le pourcentage est estimé de 18% (Newman, 2015). Les facteurs de risque cliniques et reproductifs diffèrent entre le TNBC et le non TNBC où par exemple il est bien connu que l'allaitement diminue le risque de cancer de sein mais il a été remarqué que la multiparité

(avoir plusieurs grossesses) augmente la probabilité d'être diagnostiqué TNBC (Newman, 2015).

3.2. Classification du TNBC

3.2.1. Selon l'aspect morphologique

Le TNBC peut être classé suivant son aspect morphologique en carcinome canalaire infiltrant, carcinome médullaire, carcinome adénoïde kystique, carcinome myoépithélial, carcinome squameux, carcinome métaplasique, carcinome apocrine, carcinome sécrétoire ou carcinome survenant dans le contexte de l'adénose microglandulaire. Les carcinomes adénoïdes kystiques ont la plus lente croissance, ayant un très bon pronostic après l'excision chirurgicale (Hon et al., 2016).

3.2.2. Selon l'expression génique

Grâce à des études d'expression génique, il a été démontré que le TNBC est un sous-ensemble hétérogène du cancer du sein, caractérisé par six sous-types distincts: deux de type basal (BL1 et BL2); un type immunomodulateur; un type mésenchymateux; un type de cellules souches mésenchymateuses; et un type associé au récepteur d'androgène luminal (Newman, 2015). Un autre regroupement de ces six groupes en quatre a été proposé aussi (Hon et al., 2016).

75% des TNBC sont du type basal-like caractérisés par des mutations au niveau des gènes *TP53* (80%) et *PIK3CA* (9%), une perte de *RBI* et *BRCA1*, une activité élevée de la voie PI(3)K, une signature contenant les kératines 5, 6 et 17, une hyperactivité de FOXM1 (facteur de transcription), MYC et HIF1- α /ARNT (facteur de régulation clé) (Cancer Genome Atlas Network, 2012). D'autres caractéristiques moléculaires du type basal sont cités par Podo et collaborateurs (Podo et al., 2010) incluant une hyperactivité de HER1, RAS, CTNNB1, la voie E2F3, une prolifération élevée due à l'expression des gènes Ki-67, cytokératine, cavéoline-1, alpha B-crystalline et une surexpression de c-kit. Les marqueurs présents à la surface des cellules TNBC de type basal like sont CD44⁺ CD24⁻ ALDH1A1⁺ (aldéhyde déshydrogénase 1), mais la présence de ce phénotype ne signifie pas exclusivement que les cellules sont des cellules tumorales ; elles doivent présenter un pouvoir tumorigène.

75% des femmes qui ont des mutations au niveau du gène *BRCA1* ont un phénotype triple négatif ou type basale ou les deux (Foulkes et al., 2010). Ces deux types de cancers sont

considérés comme des proches car ils sont similaires de point de vue phénotype mais pas de point de vue clinique, transcriptomique et immunohistochimique. 18 à 40% de tumeur basal-like ne possèdent pas un phénotype triple négatif en analyse immunohistochimique avec 20% expriment l'estrogène ou surexpriment HER2 donc une hétérogénéité au niveau génétique.

3.3. *Traitements contre TNBC*

A ce jour, les traitements hormonaux ou ciblés au trastuzumab-un anticorps spécifique des récepteurs HER2/neu sont très efficaces pour le cancer de sein. Malheureusement, dans le cas du TNBC, ces traitements ne sont pas efficaces en l'absence des récepteurs. De plus, les TNBC appartiennent au sous-type basal du cancer du sein qui est intrinsèquement agressif avec un mauvais pronostic après une chimiothérapie systémique pour certains sous-types. Différents essais/solutions sont actuellement proposés (Foulkes et al., 2010; Lebert et al., 2018; Wahba and El-Hadaad, 2015) à savoir:

- La réponse complète pathologique (pCR) des patientes ayant un TNBC au stade II et III a été améliorée suite à l'addition de carboplatine ou de bevacizumab à travers un traitement à base du paclitaxel hebdomadaire, de la doxorubicine et de la cyclophosphamide (Sikov et al., 2015). L'addition du bevacizumab, un anticorps monoclonal qui est un inhibiteur de l'angiogenèse à un traitement initial de cancer du sein métastatique prolonge la survie sans progression (Miller et al., 2007). Par contre, Cameron et ses collaborateurs n'ont pas recommandé l'utilisation de bevacizumab comme traitement adjuvant (Cameron et al., 2013).
- L'ajout de carboplatine néoadjuvant à un traitement au paclitaxel, doxorubicine liposomale non pégylée et du bevacizumab augmente de manière significative la pCR chez les patientes atteintes d'un TNBC au stade II et III (Minckwitz et al., 2014).
- L'avantage de l'ajout de paclitaxel au traitement contre le TNBC a été prouvé par Rodriguez-Lescure et ses collaborateurs (Rodríguez-Lescure et al., 2007) quand ils l'ont additionné à un traitement à base d'adjuvant fluorouracil-epirubicin-cyclophosphamide et par Sparano et collaborateurs en utilisant un traitement à base de doxorubicin et cyclophosphamide (Sparano et al., 2015).
- Le cisplatine pourrait être un traitement efficace contre le cancer du sein héréditaire (BRCA1) et TNBC (Silver et al., 2010). La chimiothérapie à base de platine s'est

avérée plus efficace que la chimiothérapie sans platine dans le cas de TNBC métastatique (Zhang et al., 2015).

- Un bon pronostic a été révélé suite à l'utilisation de l'ixabépilone (un inhibiteur de microtubules) contre le cancer de sein essentiellement négatif au récepteur d'oestrogène (Baselga et al., 2009).
- Une combinaison de cétuximab (anticorps monoclonal ciblant l'EGFR) avec le carboplatine a été également testée (Carey et al., 2008).
- Des inhibiteurs de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase), telque BSI-201 ont été ajoutés à une combinaison de chimiothérapie à base de gemcitabine/carboplatin (O'Shaughnessy et al., 2009). Etant également un inhibiteur de PARP actif par voie orale, Olaparib montre un indice thérapeutique favorable chez les patientes atteintes de cancer de sein à mutation en BRCA1 et 2 (Tutt et al., 2010) et HER2⁺ (Robson et al., 2017). L'Olaparib a été approuvé en janvier 2018 par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, pour son utilisation dans le cancer du sein métastatique muté par BRCA. D'autres inhibiteurs de la PARP sont également étudiés dans le cadre métastatique, notamment le véliparib et le niraparib (par exemple, NCT02595905, NCT01905592 (<https://clinicaltrials.gov/>)). En effet, la PARP est une cible clinique très intéressante dans le TNBC étant donné qu'elle est impliquée dans la réparation par excision de bases nucléotidiques après un dommage d'ADN. Le traitement par chimiothérapie entraîne des anomalies au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses et les anti-PARP empêchent la cellule cancéreuse de se réparer conduisant ainsi à la mort cellulaire. Une deuxième explication pour les cancers à BRCA1/2⁺ a été proposée : lorsque PARP-1 est inhibée, les ruptures de double brins d'ADN s'accumulent et ne sont plus réparées par recombinaison homologue à cause de la déficience en BRCA1 et BRCA2, nécessaires au bon fonctionnement de cette voie. Par conséquent, ces cellules sont sensibles à l'inhibition de PARP-1, entraînant la mort cellulaire et l'apoptose (Farmer et al., 2005; Wahba and El-Hadaad, 2015).
- Un traitement antiandrogénique ciblé par le bicalutamide (en cas de TNBC à RA⁺) engendre une diminution de la prolifération et l'augmentation de l'apoptose (Hon et al., 2016).

Il est à remarquer que les TNBC non basal-like répondent moins bien que les TNBC basal-like à la chimiothérapie, ceci est peut-être expliqué par le faible indice Ki-67 de ces TNBC (Hon et al., 2016).

4. Les voies de mort cellulaire

La mort cellulaire se produit de façon naturelle dans les cellules “normales” pour éliminer les cellules présentant des dysfonctionnements ou altérées permettant le maintien de l’homéostasie de l’organisme. Les principaux mécanismes pour cette élimination sont la nécrose, l’apoptose et l’autophagie. Une dérégulation de ces processus entraîne des complications sanitaires et l’apparition de différentes maladies. Les mêmes stimuli peuvent déclencher l’apoptose ou la nécrose suivant leurs doses utilisées. La variation entre les deux mécanismes dépend aussi de la disponibilité des caspases et de l’ATP intracellulaire, du type de tissu, du stade de développement du tissu et du milieu physiologique.

4.1. Apoptose

Cette partie est inspirée de la revue de (Elmore, 2007) qui a détaillé le mécanisme d’apoptose.

L’apoptose ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme actif consommant de l’ATP et conduisant à l’activation des protéases à cystéine, spécifique à l’aspartate « les caspases » moyennant une complexe cascade d’évènements. Lors de l’apoptose, la cellule subit des modifications morphologiques commençant par un rétrécissement, donnant lieu à un cytoplasme plus dense et des organites plus compactes ainsi qu’une pycnose qui résulte de la condensation de la chromatine. La cellule prend donc la forme d’une masse ronde ou ovale avec un cytoplasme éosinophile et des fragments de chromatine nucléaire denses. Par la suite, elle bourgeonne après une caryorrhexis qui est une fragmentation nucléaire par des endonucléases (Carmaux, 2008). Les corps apoptotiques formés seront phagocytés par les macrophages, les cellules parenchymateuses ou les cellules néoplasiques et dégradées au sein des phagolysosomes. Aucune réaction inflammatoire n’est ainsi associée.

L’apoptose est un mécanisme irréversible suite l’activation de la cascade enzymatique. En effet, les caspases sont exprimées sous la forme de proenzymes inactives qui une fois activées, peuvent soit activer d’autres procaspases, soit s’agréger et s’activer automatiquement. Dix caspases majeures ont été identifiées et classées en initiateurs (caspase-2, 8, 9, 10), effecteurs ou exécuteurs (caspase-3, 6, 7) et caspases inflammatoires (caspase-1, 4, 5). D’autres caspases ont été également identifiées. En effet, la caspase-11 régule l’apoptose et la maturation des cytokines lors d’un choc septique. La caspase-12 médie l’apoptose induite

par le stress du réticulum endoplasmique provoqué par l'amyloïde- β . La caspase-13 identifiée chez le bovin est une orthologue de la caspase-14 humaine et est fortement exprimée dans les tissus embryonnaires mais pas dans les tissus adultes.

L'apoptose joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme et la morphogenèse des mammifères par élimination des cellules « en excès ». Chez l'embryon, ce mécanisme élimine les espaces interdigitaux et la séparation des doigts (Mori et al., 1995). Les cellules nerveuses ou immunitaires surproduites au début et qui n'arrivent pas à établir des connexions synaptiques fonctionnelles ou des spécificités antigéniques productives respectivement seront détruits par apoptose. Les cellules immunitaires activées ou auto-agressives pendant leur maturation seront éliminées dans les organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse et thymus) ou dans les tissus périphériques. Il intervient pendant le processus de cicatrisation, de remodelage chez l'adulte et lors d'élimination de cellules suite au vieillissement (Elmore, 2007). Par conséquent des perturbations de la mort cellulaire peuvent être à l'origine des maladies telles que le cancer, le syndrome lymphoprolifératif auto-immun, le SIDA, l'ischémie et les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique. Le cancer est un exemple de maladie acquise, probablement, suite à la suppression de l'apoptose pendant la cancérogenèse. Les cellules cancéreuses peuvent acquérir une résistance à l'apoptose par une augmentation de l'expression de *c-FLIP*, l'expression des gènes codant les protéines antiapoptotiques tels que Bcl-2 ou Bcl-xL et une régulation négative ou mutation de protéines proapoptotiques comme le Bax (Hassan et al., 2014). D'autres mutations affectant diverses voies de signalisation sont également responsables du développement tumoral malin. Comme exemple, une mutation au niveau du gène suppresseur de tumeur p53 a été observée dans 50% des cancers. Ce facteur de transcription active les protéines de réparation de l'ADN en cas d'endommagement. Il maintient le cycle cellulaire au point de régulation G1/S et déclenche l'apoptose si les dommages à l'ADN sont irréparables. Si le gène p53 est muté, la suppression de la tumeur est fortement réduite. Ce gène peut être endommagé par les radiations, divers produits chimiques et lors de l'infection de certains virus tel que le virus du papillome humain (HPV). Les personnes qui héritent une seule copie fonctionnelle de ce gène ont une forte probabilité de développer le syndrome de Li-Fraumeni, qui se caractérise par le développement de tumeurs au début de l'âge adulte.

Il existe deux voies principales d'apoptose: la voie des récepteurs extrinsèques et la voie intrinsèque ou mitochondriale. Ces deux voies peuvent être liées où il est possible que les

molécules d'une voie influencent l'autre. Il existe une troisième voie perforine / granzyme qui induit l'apoptose via le granzyme B/A (figure 8). Deux autres voies sont moins caractérisées et connues : l'une est associée au stress du réticulum endoplasmique (RE) / appareil de Golgi et la seconde dépend d'organelles nucléaires discrètes, appelées Pml domaines oncogéniques (PODs) ou corps nucléaires (NBs) (Hassan et al., 2014).

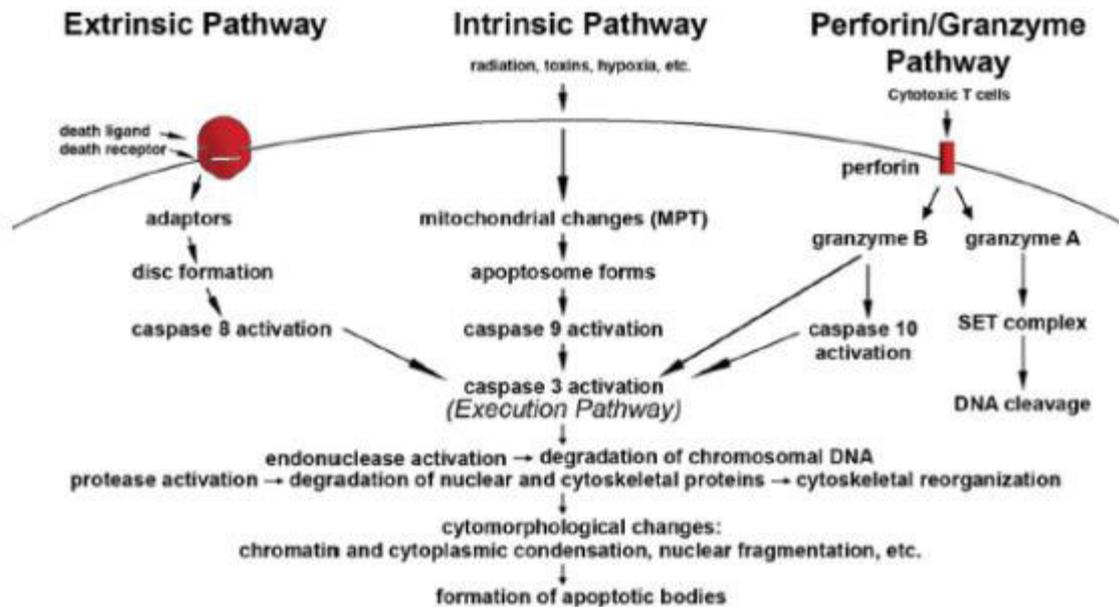


Figure 8. Les différentes voies d'apoptose (Elmore, 2007)

4.1.1. Voie extrinsèque

Les voies de signalisation extrinsèques font intervenir des récepteurs de la mort qui sont membres de la superfamille des gènes du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF). Ces récepteurs partagent des domaines extracellulaires riches en cystéine et un domaine cytoplasmique d'environ 80 Aa appelé «domaine de la mort». Ce dernier joue un rôle critique dans la transmission du signal de mort de la surface cellulaire aux voies de signalisation intracellulaires. Les ligands les mieux caractérisés et les récepteurs de mort correspondants comprennent le FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 et Apo2L / DR5.

La liaison de FasL à FasR entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD. La liaison du ligand TNF au récepteur TNF entraîne la liaison de la protéine adaptatrice TRADD avec le recrutement de FADD et de RIP. FADD s'associe ensuite à la procaspase-8 ou 10 (au

domaine DED). Ce complexe multimoléculaire de mort DISC est formé, entraînant l'activation auto-catalytique de la procaspase-8 et 10. Ainsi, la phase d'exécution de l'apoptose est déclenchée. A ce stade, l'inhibition d'apoptose est possible par la c-FLIP qui se lie au FADD et à la caspase-8. La protéine Toso bloque aussi l'apoptose induite par Fas dans les cellules T.

4.1.2. Voie intrinsèque

Cette voie est stimulée par des signaux intracellulaires positifs ou négatifs. Cette dernière est liée au retrait de facteurs de croissance et la perte de suppression de l'apoptose. Les stimuli positifs incluent par exemple les médicaments chimiothérapeutiques, les rayonnements, les toxines, l'hypoxie, l'hyperthermie, les infections virales et les radicaux libres. Ces facteurs entraînent l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPT), la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération dans le cytosol de deux groupes principaux de protéines pro-apoptotiques. Le premier groupe qui active la voie mitochondriale dépendante des caspases, comprend le cytochrome c, Smac (Second Mitochondrial Activator of Caspases)/ DIABLO et la sérine protéase HtrA2/ Omi. Le cytochrome c lie et active l'Apaf-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) et la procaspase-9, formant un « apoptosome » ce qui active la caspase-9. Cette dernière possède un domaine CARD (Caspase Recrutement Domain) qui est dévoilé lors de la fixation du cytochrome c sur Apaf-1. Smac/ DIABLO et HtrA2/ Omi favorisent l'apoptose en inhibant l'activité des IAP (inhibitor of apoptosis proteins) entraînant leur dégradation par le protéasome (Elmore, 2007; Lanzarotti, 2014). Après que la cellule s'est engagée à mourir, le deuxième groupe de protéines pro-apoptotiques est libéré incluant l'AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'endonucléase G et les CAD (Caspase Activated DNase). AIF et l'endonucléase G sont capables d'induire une apoptose indépendante des caspases (Candé et al., 2002; Li et al., 2001). L'AIF se déplace vers le noyau conduisant à la condensation nucléaire de «stade I» par la fragmentation de l'ADN en ~ 50–300 kb et la condensation de la chromatine nucléaire périphérique. L'endonucléase G se déplace aussi vers le noyau et clive la chromatine nucléaire produisant des fragments d'ADN oligonucléosomiaux. Le complexe ICAD-CAD est clivé par la caspase-3 entraînant l'inactivation d'ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase). En effet, la coupure de ICAD par la caspase-3 au niveau de deux résidus d'acide aspartique, D117 et D224, déstabilise son interaction avec CAD et permet la dimérisation de cette dernière via son domaine N-terminale CIDE (Larsen and Sørensen, 2017). Une fois déplacée vers le noyau, elle conduit à la fragmentation de l'ADN oligonucléosomal et à une condensation de la

chromatine plus prononcée et avancée : condensation de «stade II» (Elmore, 2007). Ces événements sont contrôlés et régulés par les protéines de la famille Bcl-2(B-Cell Lymphoma) partageant entre elles un ou plusieurs domaines BH « domaines d'homologie avec Bcl-2 ». Elles régissent la perméabilité de la membrane mitochondriale et par la suite la libération de cytochrome c. Cette famille contient des protéines proapoptotique (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik et Blk) ou antiapoptotique (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG). La balance entre les pro et antiapoptotiques détermine si la cellule entre en apoptose ou non(Elmore, 2007). Cette voie peut être également inhibée par les protéines chaperonne HSP90, HSP70 et HSP27 (Lanzarotti, 2014).

4.1.3. Voie perforine / granzyme

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) agissent sur les cellules cibles par la voie extrinsèque (l'interaction FasL/ FasR) et moyennant la molécule transmembranaire perforine sur les cellules tumorales et les cellules infectées par un virus avec libération de granule cytoplasmique contenant granzyme A et B. Le granzyme B active la procaspase-10, clive des facteurs comme l'ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase), utilise la voie mitochondriale pour amplifier le signal de mort par clivage spécifique de BID et par induction de la libération du cytochrome c et il peut activer directement la caspase-3. Le granzyme A active la détection de l'ADN par clivage du complexe SET (protéine d'assemblage de nucléosomes) qui est un inhibiteur de la DNase NM23-H1 (suppresseur de tumeur) entraînant ainsi la dégradation de l'ADN apoptotique. Le complexe SET est composé par les protéines SET, Ape1, pp32 et HMG2 qui semblent fonctionner ensemble pour protéger la structure de la chromatine et de l'ADN (Lieberman and Fan, 2003). Son inactivation semble également contribuer à l'apoptose en bloquant le maintien de l'intégrité de la structure de l'ADN et de la chromatine.

4.1.4. Exécution de l'apoptose

Les voies extrinsèque, intrinsèque et granzyme B convergent vers une voie d'exécution initiée par l'activation des caspases effectrices ou d'exécution (caspase-3, 6 et 7) ayant divers substrats comme les cytokératines, la PARP, la protéine plasmatique du cytosquelette alpha-fodrine, la protéine nucléaire NuMA... entraînant ainsi la fragmentation d'ADN, la dégradation des protéines cytosquelettiques et nucléaires, la formation de corps apoptotiques, l'expression des récepteurs phagocytaires... La voie granzyme A active une voie de mort cellulaire parallèle indépendante de la caspase via des lésions de l'ADN monocaténaire. La

caspase-3, activé par les caspase-8, 9 ou 10, est considérée comme la plus importante des caspases effectrices. Elle clive spécifiquement la liaison entre la CAD endonucléase et son inhibiteur ICAD pour l'activer. La CAD activé dégrade l'ADN chromosomique dans les noyaux et provoque la condensation de la chromatine. Un autre substrat de caspase-3 est la gelsoline. Les fragments clivés de cette protéine suite à l'action de caspase-3, clivent à leur tour les filaments d'actine de manière indépendante du calcium. Cela entraîne une perturbation du cytosquelette, du transport intracellulaire, de la division cellulaire et de la transduction du signal.

Les cellules apoptotiques sont caractérisées par l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) à la surface associée à une perte d'activité aminophospholipidique translocase et à un flip-flop non spécifique de phospholipides de diverses classes. Ceci est régulé probablement par Fas, la caspase-8 et la caspase-3. L'exposition des PS facilite ensuite la reconnaissance phagocytaire, permettant l'absorption et l'élimination précoces des cellules tumorales apoptotiques.

4.2. Nécrose

"Nécrose" est issue du grec nekros (νεκροσ) qui signifie "mort". C'est un processus toxique, incontrôlé, désordonné, passif sans consommation d'énergie qui peut avoir lieu suite à l'insuffisance d'apport en oxygène, des agents physiques, chimiques et infectieux, des réactions immunologiques et des déséquilibres nutritionnels (Carmaux, 2008). Les modifications morphologiques que subit la cellule pendant la nécrose sont essentiellement le gonflement cellulaire où elle finisse par la rupture de la membrane cellulaire et le relargage du contenu cellulaire dans les tissus environnants stimulant ainsi une réaction inflammatoire. Les noyaux des cellules nécrotiques subissent la pycnose, la caryolyse (dissolution nucléaire) et la caryorrhesis (Carmaux, 2008).

4.3. Autophagie

L'autophagie désigne en grec « auto » soi-même et « phagie » manger. Ce processus, conservé au cours de l'évolution, se déroule dans toutes les cellules eucaryotes. Il implique le réarrangement dynamique des membranes subcellulaires pour séquestrer le cytoplasme et les organites dans des vésicules doubles ou multimembranaires pour les délivrer au lysosome ou

à la vacuole où ils seront dégradés (Elmore, 2007). Ceci est considéré comme la principale voie inductible pour le renouvellement général des composants cytoplasmiques. Le processus d'autophagie dépend à la fois de la synthèse continue des protéines et de la présence d'ATP. L'autophagie se déroule en 4 étapes: induction, formation de l'autophagosome, fusion avec le lysosome ou la vacuole et dégradation du corps autophagique et recyclage(Elmore, 2007). La régulation de ce processus se produit à travers diverses kinases, phosphatases et guanosine triphosphatases (GTPases). L'autophagie et l'apoptose semblent être interconnectées (au niveau de la mitochondrie). Le rôle de l'autophagie a été discuté par les scientifiques et est considéré comme un mécanisme qui limite la croissance incontrôlée des cellules (cancer) tout en essayant de sauver les cellules de la mort par « inhibition » de l'apoptose (Elmore, 2007). Il permet à la cellule de résister au stress en cas de déficience en nutriments ou carence en facteurs de croissance par recyclage de ses propres composants. Si ce stress est prolongé, les cellules sont conduites à une mort par autophagie (Verneret, 2012).

4.4. *Autres formes de mort cellulaire*

Il existe d'autres types de mort cellulaire possédant des caractéristiques différentes ou un peu mélangées avec les formes précédemment décrites :

- **Aponécrose** : c'est une forme de mort cellulaire présentant certaines caractéristiques morphologiques à la fois de la nécrose et de l'apoptose. Les cellules ont un phénotype nécrotique avec activation de gènes et synthèse protéique. Elle est ainsi considérée comme étant une forme de mort cellulaire programmée (Formigli et al., 2000).
- **Paraptose** : elle est induite par une autre forme d'activité de la caspase-9 indépendante de l'Apaf-1 et elle ne répond pas aux inhibiteurs des caspases ou au BCL-XL. Cette forme est rapportée pendant le développement et dans les modèles transgéniques de la maladie de Huntington et de la sclérose latérale amyotrophique humaine (Khalili and Radosevich, 2018; Sperandio et al., 2000).
- **Nécroptose ou nécrose programmée** : les cellules meurent par nécrose mais tout en faisant intervenir des facteurs de l'apoptose TNF et les kinases RIP (Kim et al., 2019).

4.5. *PARP : marqueur d'apoptose*

PARP, poly (ADP-ribose) polymérase est une glycosyltransférase nucléaire capable de catalyser le transfert de l'ADP-ribose à la protéine cible (poly ADP-ribosylation) consommant ainsi l'équivalent de quatre molécules ATP. Elle constitue une famille d'au moins 18 membres (Morales et al., 2014). PARP-1 est la plus étudiée puisqu'elle représente environ 85% de l'activité totale de PARP cellulaire (Chaitanya et al., 2010). L'ajout du polymère poly (ADP ribose) entraîne la relaxation globale de la structure de la chromatine ce qui facilite par exemple la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN (Morales et al., 2014) jouant ainsi un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome.

PARP, de 113 KDa de taille, est composée d'un domaine catalytique de 54 KDa, un domaine de liaison à l'ADN de 46 kDa (DBD) contenant 2 motifs de doigts de zinc (au terminal NH₂) et un domaine d'auto-modification (AMD) de 22 kDa qui contient le motif BRCT retrouvé chez les protéines impliquées dans la réparation d'ADN (D'Amours et al., 1999).

PARP-1 est un substrat de caspase-3 et 7, calpaines, cathepsines, granzymes et métalloprotéases matricielles. Comme le site d'action de ces enzymes est différent, la catalyse de PARP-1 crée divers domaines structuraux exposés déterminant par la suite le destin de la cellule (Chaitanya et al., 2010) :

- **Caspase** : tous les caspases peuvent modifier PARP-1 mais essentiellement les caspases effecteurs 3 et 7 qui clivent PARP-1 générant deux fragments, le premier est à 89 KD (constitué du fragment catalytique et l'AMD) et le deuxième fragment est à 24 KD (constitué essentiellement du domaine DBD). Ce clivage de PARP-1 par les caspases est un marqueur d'apoptose (Duriez and Shah, 1997).
- **Calpaines** : ce sont des cystéines protéases non lysosomales actives au pH neutre. Le clivage de PARP avec calpaine donne un fragment de 40 KD (contient le domaine DBD). Ce domaine apparaît dans le cas de mort cellulaire par nécrose (McGinnis et al., 1999).
- **Cathepsines** : appartiennent à la famille des protéases lysosomales qui sont actives au pH acide. Les cathepsines peuvent initier la mort d'une cellule apoptotique indépendante des caspases et sont connues pour être des protéases clés dans l'autophagie et la nécrose. Ce dernier est accompagné d'une hyperactivation de PARP-1. Étant donné que l'inhibition de PARP-1 réduit l'angiogenèse, il est possible que la

PARP-1 hyperactivée puisse en partie entraîner une angiogenèse tumorale et une métastase. Les cathepsines et le TGF- β sont également impliqués dans le clivage de PARP-1 indépendant de caspase (un fragment de PARP-1 indépendant de caspase de ~ 85 kD est produit par TGF-b). Les cathepsines-B, D et G produisent un fragment de 50 kD pendant la mort de la cellule nécrotique. Les cathepsines-B et D produisent également des fragments PARP-1 actifs avec des poids moléculaires de 55 kD et 42 kD, semblables aux fragments obtenus à partir des extraits lysosomaux. Des fragments PARP-1 inactifs avec des poids moléculaires de 74 et 62 kD sont également libérés par l'action de ces protéases (Gobeil et al., 2001).

En outre, le fragment PARP-1 de 89 kD qui apparaît pendant la mort de cellules apoptotiques pourrait également être produit par la cathepsine B et D.

- **Granzymes** : comme indiqué ci-dessus, ce sont des protéases toxiques et lytiques appartenant à la famille des protéases à serine secrétées par les lymphocytes T cytotoxiques tels que les CTL et les cellules NK. En présence de perforine, la granzyme A clive PARP-1 après la Lys 498 séparant le DBD du domaine catalytique, d'où la formation d'un fragment inactif C-terminal de 55 kD et d'un fragment N-terminal actif de poids moléculaire similaire, qui peut amener la cellule à subir une mort cellulaire apoptotique indépendante de la caspase, plutôt que la mort cellulaire nécrotique, en diminuant l'efficacité de la ribosylation de l'ADP (Zhu et al., 2009). Le fragment C-terminal et celui généré par l'action de cathepsine B (clive au niveau de la Leu 525) ont la même taille, mais comme leurs sites de coupure sont différents, les fragments obtenus n'auront pas le même mode d'action.

Le granzyme B induit l'apoptose par une voie indépendante de caspase ou par activation directe des caspases ou indirectement par activation de Bid. Il clive PARP-1 à un fragment N-terminal inactif de 64 et 61 kDa et un C-terminal actif de 54 et 42 kDa. Les fragments 61 et 42 kDa sont issus d'un clivage secondaire des fragments 64 et 54 kDa respectivement (Froelich et al., 1996).

- **Métalloprotéases matricielles MMP**: la MMP2 est capable de cliver la PARP-1 en deux fragments : un de 66 kDa et un deuxième > 48 -kDa (Kwan et al., 2004).

5. Immunologie des cancers

Le système immunitaire assure la reconnaissance et la défense contre le non soi en le discriminant du soi. Il assure également l'immunosurveillance du cancer en identifiant et

détruisant les cellules tumorales naissantes. Cette théorie est formulée en 1957 par Burnet et Thomas, mettant en œuvre son importance dans la protection d'hôte par inhibition de la carcinogenèse et maintenance de l'homéostasie cellulaire. Quoique la haute régulation de ce système, les cellules tumorales réussissent à y échapper. Nous parlons dans ce cas de la notion d'immunoédition qui comporte trois phases : première phase d'élimination équivalente à l'immunosurveillance et faisant intervenir l'II et IA, une deuxième phase d'équilibre étant la phase la plus longue et ne faisant intervenir que l'IA et la troisième phase qui est celle d'échappement aux deux précédentes et étant l'échec de la RI.

Différentes populations de cellules immunitaires appartenant à l'II et l'IA sont impliquées dans la réponse antitumorale et la reconnaissance d'antigènes.

5.1. Cellules de l'immunité innée

5.1.1. Les cellules dendritiques (DCs)

Les DCs sont les principales cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elles ont un rôle important dans l'induction et le maintien de l'immunité anticancéreuse. Cependant, leur fonction de présentation d'antigène peut être perdue ou inefficace dans le microenvironnement tumoral (MET). Les DCs pourraient également être polarisés en DCs régulateurs immunosuppresseurs / tolérogènes, ce qui limite l'activité des LT effecteurs et favorise la croissance et la progression tumorale (Ma et al., 2012; Veglia and Gabrilovich, 2017). En effet, ce sont les DCs immatures qui facilitent la tolérance aux cellules cancéreuses, tandis que les DCs complètement matures peuvent fortement favoriser l'immunité anticancéreuse si elles sécrètent les combinaisons correctes de cytokines (Dudek et al., 2013). Cependant, il existe une population intermédiaire de maturation des DCs, appelée DCs semi-matures, qui peut potentialiser la tolérance ou les réponses pro-tumorales (Dudek et al., 2013). Chez les individus sains, les DCs immatures sont caractérisées par une grande capacité de capture des Ag, une faible expression des molécules co-stimulatrices et une sécrétion limitée de cytokines (Veglia and Gabrilovich, 2017). Suite à une stimulation, ces DCs mûrissent et seront marquées par des changements phénotypiques et fonctionnels. Les DCs sont activés par réponse au stimulus comme les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) et DAMPs (damage-associated molecular patterns). Elles migrent vers les tissus lymphoïdes pour interagir avec les cellules T étant donné qu'elles sont des puissants inducteurs de la réponse immunitaire (Ma et al., 2012). Elles sont caractérisées par i) une baisse de l'activité de capture des antigènes, ii) une régulation positive de l'expression des ligands de maturation de surface telles que CD80,

CD83 et CD86, de la molécule CMH II, des molécules de costimulation et des CCR7 iii) une grande capacité de migration active vers des ganglions lymphatiques drainants et de production des cytokines inflammatoires et immunostimulatrices (IL-12, IL-6, IL-1 β) ou immunosuppressives (IL-10, TGF- β) selon le MET (Dudek et al., 2013; Veglia and Gabrilovich, 2017).

Les DCs se différencient dans la moelle osseuse (MO) via des étapes séquentielles impliquant des progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et des progéniteurs de macrophages / DC(MDP). Ces derniers donnent naissance aux précurseurs de monocytes communs (cMOP) et à des précurseurs de DC communs (DCp) qui se différencient par la suite en DC. Les cMOP donnent ensuite naissance à des monocytes qui peuvent se différencier dans les tissus en DCs dans certaines conditions comme le cancer. Les facteurs Flt3L et GM-CSF sont les principales cytokines impliquées dans la différenciation des DCs (Veglia and Gabrilovich, 2017). On distingue principalement trois types de DC : les DC plasmacytoides (pDCs), les conventionnels (cDC) et les DC inflammatoires (DCinf). Les pDCs sont favorisées par le facteur E2-2. Ce type de DC est caractérisé par sa sécrétion essentiellement d'IFN de type I. Elles produisent également IL-12, IL-6, TNF- α et d'autres chimiokines pro-inflammatoires lors du déclenchement de TLR7 / 9. Les DCps murine expriment Siglec-H, B220, Ly6c, en quantité variable les CD8 α et CD4, et une faible quantité de CD11c. A la périphérie, elles expriment CCR9, LY49Q et Sca1. Chez l'homme, ces marqueurs sont différents étant donné que les DCps expriment CD4, HLA-DR, CD123, BDCA-2 et TLR 7, 9 dans les compartiments endosomaux, avec une absence de l'expression de CD11c. Alors que pour les cDCs, elles sont favorisées par un répertoire de facteurs de transcription impliquant des niveaux différents de IRF8 et IRF4 en association avec PU.1, ID2, E2.2, ZEB2, KLF4, IKZF1 et BATF3 (Collin and Bigley, 2018). Récemment, une classification généralisée des cDCs de mammifères a été publiée. Elles peuvent être classées en 2 sous types : les cDC1 exprimant les marqueurs IRF8, ID2, BATF3, CD141/BDCA-1, CLEC9A, CADM1, BTLA, XCR1 et CD26 et les Cdc2 qui sont positifs pour ID2, ZEB2, IRF4 ; KLF4 ; CD1c/BDCA-1, CD11b, Fc ϵ R1n et SIRPA (Collin and Bigley, 2018). Ces DCs sont des stimulateurs puissants des CTL où leur présence dans le microenvironnement tumoral a été corrélée à des meilleurs pronostics (Broz et al., 2014). Gardner and Ruffell proposent que les DCs associées aux tumeurs endocytent les cellules mortes néoplasiques ou les débris cellulaires et transportent les antigènes associés au cancer vers le ganglion lymphatique drainant, où une activation et une stimulation des LT auront lieu (Gardner and Ruffell, 2016). Les DCs (CD103⁺)

migratoires présentent une faible expression des enzymes lysosomales ce qui favorise le transport des Ag intacts vers les ganglions lymphatiques drainant et la présentation croisée de l'Ag (Salmon et al., 2016). Une population de DCc2 est caractérisée par une dépendance aux facteurs IRF4 et ZEB2, une expression préférentielle de CD172a et une présentation améliorée de l'Ag couplé à CMH II activant ainsi les LT CD4⁺ (Gardner and Ruffell, 2016). Un troisième type de DC est celui des DCs inflammatoires (DC inf) qui ont comme précurseur les monocytes Ly6C^{high}. Chez les souris, les DC inf sont identifiées comme étant MHC II⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Ly6c⁺ exprimant les marqueurs CD206 CD115 / GM-CSFR, Mac-3 / CD107b, FcεRI et CD64, ainsi que zbtb46 (Veglia and Gabrilovich, 2017). L'action des DCs peut être inhibée par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), la prostaglandine E2 (PGE2) et l'IL-10 présent dans le MET. La maturation des progéniteurs de la MO ou des monocytes en DCs est inhibée par VEGF, IL-6, IL-10 et CSF-1 d'où les monocytes acquièrent un phénotype suppresseur (Gardner and Ruffell, 2016).

Il est important de noter que les antigènes tumoraux sont de deux classes : les antigènes spécifiques de tumeurs (TSA) qui sont produites que par les cellules tumorales et les antigènes associés aux tumeurs (TAA) qui peuvent également être exprimés par les cellules normales déclenchant ainsi une réaction moins spécifique (Munhoz and Postow, 2016).

5.1.2. *Macrophages*

Les macrophages appartiennent à la fois à l'immunité innée et adaptative, provenant de la différenciation des monocytes dans les tissus (Anusha P et al., 2011). L'origine des macrophages est encore ambiguë. En effet, il a été adopté qu'ils dérivent de la MO mais des études récentes ont montré qu'une population dérive de l'hématopoïèse hépatique fœtale reste présente chez l'adulte et sera juste diminuée après la naissance et remplacée par une hématopoïèse de la MO donnant naissance aux monocytes circulatoires (Ly6c⁻ et Ly6c⁺ inflammatoire chez la souris) (Wynn et al., 2013). La première hématopoïèse utilise des progéniteurs du sac vitellin et donne naissance à la majeure population de macrophage tissulaire (F4/80^{high}) dans la peau, la rate, le pancréas, le foie, le cerveau et les poumons (Wynn et al., 2013). Deux types de macrophages sont différenciés M1 et M2, où les premiers favorisent la réponse des lymphocytes Th1, inhibent la prolifération cellulaire et causent l'endommagement des tissus alors que les deuxièmes favorisent la réponse des lymphocytes Th2, la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire (Mills, 2012). Les macrophages

polarisés M1 sont activés par l'IFN- γ associé à un lipopolysaccharide ou au TNF. Les macrophages polarisés en M2 sont activés par l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 (Maimela et al., 2019). Les M1 expriment les cytokines proinflammatoires, chimiokines et des molécules effectrices telles que l'IL-12, IL-23, TNF- α , iNOS, MHCI/II, CXCL9, CXCL10 et CXCL5. Alors que les M2, expriment des molécules anti-inflammatoires principalement l'IL-10, TGF- β et l'arginase1 (Hao et al., 2012). Les macrophages M2 peuvent être subdivisés en M2a, M2b et M2c. Les M2a sont stimulés par les cytokines Th2, IL-4 ou IL-13 et ils favorisent l'expression des chimiokines de motif C – C : CCL24, CCL17 et CCL22. Les macrophages M2b sont induits par des complexes immuns (IC), LPS, TLR ou l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra) et ils sont capables de sécréter CCL1 qui se combine avec CCR1 favorisant l'infiltration des éosinophiles, Th2 et Treg. Les M2c sont induits par les glucocorticoïdes, TGF- β ou IL-10. Ce dernier stimule la production de CXCL13, CCL16 et CCL18 qui peuvent se combiner avec CXCR5, CCR1 et CCR8 pour favoriser l'accumulation des éosinophiles et de lymphocytes T naïfs. Ces derniers jouent un rôle de premier plan dans la suppression des réponses immunitaires et la promotion du remodelage tissulaire (Hao et al., 2012). Les macrophages associés à une tumeur (TAM) présentent un phénotype de type M2 car ils expriment une série de marqueurs, tels que CD163, le fragment Fc d'IgG, les domaines de la lectine de type C et les protéines de choc thermique. Ce phénotype fournit un microenvironnement immunosuppresseur adéquat pour la croissance tumorale (Hao et al., 2012). Il est supposé que ces TAM sont originaires de la MO et que la majorité provienne de la population Ly6c⁺ (Noy and Pollard, 2014). Ils jouent un rôle pro-tumoral où ils représentent environ 50% de la masse tumorale (Vinogradov et al., 2014). Dans la tumeur primitive, les TAM peuvent stimuler l'angiogenèse et améliorer l'invasion, la motilité et l'intravasation des cellules tumorales. Au cours de la métastase, les macrophages amorcent le site pré-métastatique et favorisent l'extravasation, la survie et la croissance persistante des cellules tumorales. Ils sont également immunosuppresseurs, prévenant l'attaque des cellules tumorales par les cellules tueuses naturelles et les lymphocytes T pendant la progression tumorale et après la guérison d'une chimiothérapie ou d'une immunothérapie (Noy and Pollard, 2014). Les TAM expriment des molécules de CMH-I à savoir le HLA-G qui est parfois exprimé par les cellules tumorales ; ce récepteur est capable d'inhiber l'activation des NK, l'expression de l'IFN- γ et les cellules T activées (Noy and Pollard, 2014). Le recrutement des TAM est favorisé par la présence de CSF-1 (colony-stimulating factor 1), CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CXCL12, VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), IL-10 et l'alarmines (Hao et al., 2012). Ils sont aussi attirés

par les cellules tumorales hypoxiques en favorisant l'inflammation chronique (Anusha P et al., 2011; Hao et al., 2012).

5.1.3. *Granulocytes: les neutrophiles*

Les granulocytes sont des cellules myéloïdes caractérisées par la présence de granules cytoplasmiques et une morphologie nucléaire spécifique (Gabrilovich et al., 2012). Les granulocytes les plus abondants dans le corps sont les neutrophiles polynucléaires (PMN) représentant 50 à 70% de tous les leucocytes ayant un noyau polylobé. Leur maturation dépend des facteurs GM-CSF et G-CSF. Il est à noter que la majorité des neutrophiles restent dans la MO. Par exemple, seulement 1 à 2% circulent dans le sang périphérique des souris (Ocana et al., 2017). La libération de neutrophiles par la MO dépend d'une série de facteurs stimulants et de cytokines, notamment IL-23, IL-17, G-CSF, et les récepteurs de chimiokines CXC (Ocana et al., 2017). Les PMN sont spécialisés pour avoir une action anti-bactérienne avec un mécanisme complexe pour englober et détruire les bactéries (Gabrilovich et al., 2012). Mais en cas de cancer, ces cellules participent à différentes étapes du processus oncogénique, notamment l'initiation de la tumeur, la croissance, la prolifération ou la propagation métastatique (Ocana et al., 2017). Elles sont attirées par des ligands de CXCR2 tels que CXCL1, CXCL2 et CXCL5. Les facteurs qui interviennent dans l'angiogenèse sont VEGFA, prokinétine 2 (PROK2) ou MMP9 (Ocana et al., 2017). Ce dernier provoque la libération d'élastase, qui pénètre dans les compartiments endosomaux des cellules néoplasiques et dégrade le substrat 1 du récepteur de l'insuline (IRS1) (Gabrilovich et al., 2012). Mais dans d'autres études, les chercheurs ont démontré que les PMN peuvent inhiber les métastases des cellules 4T1 dans les poumons grâce aux ROS (Granot et al., 2011). Également, Eruslanov *et al.*, ont déjà démontré que dans les premiers stades du cancer du poumon, les neutrophiles infiltrés dans la tumeur ne sont pas immunosuppresseurs, mais stimulent plutôt la réponse des LT (Eruslanov et al., 2014). Ceci a suggéré l'existence de deux populations de PMN où elles passent d'un phénotype «N1» anti-tumoral à un «phénotype N2» pro-tumoral dans un environnement cancérogène (Fridlender et al., 2009). Ce phénotype est favorisé par la sécrétion de TGF- β et caractérisé par l'expression de l'arginase 1 (ARG-1) et de faibles taux de TNF, CCL3 et ICAM1 (Gabrilovich et al., 2012). La protéine amyloïde A1 sérique induit l'expansion des PMN (sécrétant l'IL-10) capables de supprimer la prolifération spécifique de l'Ag des LT CD8⁺ dans les mélanomes humains (Gabrilovich et al., 2012). Il est à noter que la production d'iNOS peut également être stimulée dans les neutrophiles par la régulation à la hausse du récepteur MET de la tyrosine kinase (Ocana et al., 2017). La

présence de haute concentration de neutrophiles dans le sang ou dans la tumeur des patients est accompagnée d'un faible pronostic et ne répond pas bien aux interventions médicales (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018).

5.1.4. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC : myeloid-derived suppressor cells)

Les MDSC représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures. Elles jouent un rôle important dans la balance de la RI excessive et le désordre auto-immun (Fleming et al., 2018). Mais dans le MET, elles inhibent la RI antitumorale, l'activation et le fonctionnement des cellules T et NK (Fleming et al., 2018). Elles favorisent l'angiogenèse, établissent des niches pré-métastatiques et recrutent d'autres cellules immunosuppressives telles que les LT reg (Fleming et al., 2018). Dans les conditions saines, ces cellules mûrissent et se différencient en macrophages, DCs ou granulocytes (Fleming et al., 2018).

Les MDSC étaient longtemps confondues avec les monocytes et les neutrophiles mais ces dernières années, il s'est avéré qu'elles sont différentes et ont eu plus d'intérêt avec plus de 2500 publications en 10 ans. Elles sont subdivisées en deux sous-populations : la première représente les MDSC monocytiques (MDSC-M) morphologiquement et phénotypiquement similaires aux monocytes et la deuxième est appelée MDSC polymorphonucléaire (MDSC-PMN) précédemment appelé MDSC granulocytaire, morphologiquement et phénotypiquement similaire aux neutrophiles (Gabrilovich, 2017). Les MDSC-M ont le phénotype $CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$ (le même que les monocytes) chez la souris et le phénotype $CD11b^+ CD14^+ CD15^- HLA-DR^{low/-}$ chez l'homme. Elles sont distinguées des monocytes par l'absence de HLA-DR (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018) et des macrophages associés au tumeur (TAM) par une expression relativement accrue de F4/80, une expression faible à intermédiaire de Ly6C et une expression faible ou indétectable de la protéine S100A9, une faible expression de IRF8 et une augmentation du récepteur de M-CSF, CD115 (Gabrilovich, 2017). Les MDSC-PMN représentent plus de 80% de tous les MDSC dans la plupart des cancers. Elles ont le phénotype $CD11b^+ Ly6G^{high} Ly6C^{low}$ ressemblant aux neutrophiles chez les souris contre le phénotype $CD11b^+ CD14^- CD15^+ HLA-DR^-$ ou $CD11b^+ CD14^- CD66b^+$ chez l'homme. De plus, elles expriment le récepteur-1 LDL oxydé (LOX-1) de type lectine qui peut les distinguer des neutrophiles. Ces derniers sont aussi différenciés des PMN-MDSC par leur transcriptome, protéome et les marqueurs cellulaires à leur surface (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018). En effet, les MDSC des souris C57BL/6 expriment les marqueurs CD115 et CD224 et sécrètent plus d' ARG-1, de

myeloperoxydase et de ROS alors que les neutrophiles n'expriment pas ces marqueurs et sécrètent plus de TNF- α , de protéines lysosomales et sont plus phagocytaires (Youn et al., 2012). Les MDSC-PMN et les MDSC-M peuvent également être distingués des neutrophiles et des monocytes par leur réponse élevée au stress du reticulum endoplasmique (Gabrilovich, 2017). MDSC-PMN et MDSC-M sont distingués entre eux aussi par le fait que la première produit des ROS alors que la deuxième produit plus des NO et des iNOS (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018). De plus les MDSC-M ont une plus grande puissance immunosuppressive que les MDSC-PMN (Noy and Pollard, 2014). Un sous-ensemble de MDSC humaines plus immatures ou à un stade précoce (eMDSC), est caractérisé par des cellules Lin⁻ (comportant CD3, CD14, CD15, CD19, CD56) HLA-DR⁻ CD33⁺ (Fleming et al., 2018).

L'expansion et l'activation des MDSC peut être dû à plusieurs facteurs solubles sécrétés par le MET et les cellules immunitaires : CSF, TGF- β , TNF- α , VEGF, PEG2, COX2, S100A9, S100A8, HMGB1, semaphorine 4D, œstrogène, IL-1 β , IL-6 et IL-10 (Fleming et al., 2018; Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018). L'inflammation chronique favorise l'accumulation des MDSC et prolonge leur demi-vie (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018). L'expression de S100A9 et S100A8 est régulée par STAT3 et NF- κ B (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018). L'accumulation de MDSC est aussi influencée par les facteurs de transcription IRF8, IRF4 et C/EBP β (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018). Elles sont également générées par les vésicules extracellulaires dérivées de tumeurs contenant des protéines, des ARN et des microARN qui jouent le rôle de messagers intercellulaires (Fleming et al., 2018; Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018).

Les MDSC sécrètent différentes molécules suppressives pour inhiber l'action des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) comme IL-6, IL-10, TGF- β , ARG-1, iNOS, ROS, IDO, S100A9/A8 et PD-L1. Elles stimulent la progression tumorale par la production de VEGF, bFGF, Bv8 (Gabrilovich, 2017) et de métalloprotéinases matricielles (MMP) essentiellement la MMP9 qui traite la matrice extracellulaire et la membrane basale. Il en résulte à la tumeur de quitter le tissu, d'entrer dans le sang et de migrer vers le site de la métastase ultérieure (Fleming et al., 2018). La séquestration de cystéine et la baisse d'expression de L-selectin (CD62 L) inhibent également la fonctionnalité de LT et NK (Ostrand-Rosenberg and Fenselau, 2018).

5.1.5. Cellules NK

Les cellules « Natural killer NK » ou « tueurs naturels » font partie de l'immunité innée en jouant un rôle crucial dans la protection contre le cancer (immunosurveillance) et les infections virales sans immunisation précoce puis dans la modulation de la RI adaptative. Les NK sont CD3⁻ et elles peuvent être subdivisées en deux populations suivant leur niveau d'expression humaine de CD56 et CD16. Le premier groupe est hautement cytotoxique avec le phénotype CD56^{dim}CD16^{bright} et le deuxième a plutôt une activité immunorégulatrice avec le phénotype CD56^{bright}CD16^{dim} (Grudzien and Rapak, 2018). Les cellules NK constituent environ 10% des lymphocytes circulant dans le sang périphérique, dont 90% de cette fraction est constituée de la première population cytotoxique dite NK conventionnelle (Grudzien and Rapak, 2018). Par contre, la deuxième population est prédominante dans les nodules lymphoïdes (Guillerey et al., 2016). Chez les souris, les NK sont plutôt définies comme étant CD3⁻NK1.1⁺ ou CD3⁻NKp46⁺ (Guillerey et al., 2016). D'autres sous-populations sont catégorisées chez les souris suivant leur expression en CD11b, CD27, KLRG1 et CD226 (DNAM-1) (Guillerey et al., 2016).

Les NK reconnaissent leurs cibles moyennant deux voies : directe et indirecte nommée ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) (Grudzien and Rapak, 2018).

Pour exécuter sa fonction de mort cellulaire, les NK utilisent deux mécanismes : l'exocytose des granules lytiques et l'induction d'apoptose via les récepteurs de mort (FasL et TRAIL). Ces granules cytotoxiques contiennent de la perforine et des granzymes. La perforine génère des pores dans la membrane de la cellule cible, ce qui permet aux granzymes de pénétrer dans la cellule et de déclencher l'apoptose par des voies dépendantes ou non de la caspase (Grudzien and Rapak, 2018). Dans la cytotoxicité à médiation des récepteurs de mort, les ligands de mort produits par les cellules NK se fixent aux récepteurs de mort exprimés à la surface de la cellule cible, activant ainsi la cascade de caspases (Grudzien and Rapak, 2018). Les cellules NK peuvent être activées par les vitamines de classe A, B, C, D et E, les polysaccharides, lectines et d'autres molécules phytochimiques (Grudzien and Rapak, 2018).

Les cellules NK font la discrimination entre les cellules saines et malignes (anormale ou non soi) grâce au mécanisme de « soi manquant ». Des signaux d'activation ou d'inhibitions sont générés lors de la reconnaissance du CMH I par les cellules NK (Grudzien and Rapak, 2018). Les récepteurs d'inhibition des CMH I, exprimés par NK sont Ly49 chez les souris contre KIRs (killer immunoglobulin-like receptors) chez l'homme et l'hétérodimère CD94-NKG2A chez les deux espèces (Guillerey et al., 2016). De plus, les cellules NK

tolèrent aux cellules du soi en se liant au CMH I. Elles attaquent ainsi les cellules qui baissent leur expression en CMH I en absence de signal inhibiteur des NK (Guillerey et al., 2016). Cependant, la présence d'un signal activateur qui surmonte le signal inhibiteur est toujours nécessaire. Les récepteurs activateurs exprimés par NK sont : NKG2D, NKG2C, NKp46, NKp30, NKp44 et CD226 (Guillerey et al., 2016).

Les NKs sécrètent les cytokines et chimiokines tel que IFN- γ , TNF, IL-6, GM-CSF et CCL5 (Guillerey et al., 2016). Les NK peuvent moduler la réponse des DCs et LTs de façon positive ou négative. Dans le site tumoral primaire et aux périphéries, la fonction et l'activation des NK peuvent être inhibées par l'action des Treg, des MDSC et des plaquettes activées qui peuvent sécréter du TGF- β , de l'adénosine, du PGE₂, de l'IDO et d'autres molécules. Elles sont activées après la phase de reconnaissance par les cytokines IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 et IL-21 (Grudzien and Rapak, 2018).

5.2. Cellules de l'immunité adaptative

5.2.1. Les lymphocytes B (LB)

Les LBs se développent dans la MO ayant au début un phénotype naïf caractérisé par : un statut d'Ig non-muté, l'expression d'IgM et IgD, et un phénotype CD27⁻CD38⁻. Après activation des LBs par reconnaissance d'Ag, elles continuent leur maturation et se différencient en cellules plasmiques produisant des Ac de haute affinité et des cellules mémoires CD27⁺CD38⁻ à longue durée de vie. Tous les LBs matures sont CD20⁺ à l'exception des plasmiques (Nelson, 2010). Les LBs résident généralement dans les tissus lymphoïdes conventionnels tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou le sang, mais elles sont également retrouvées dans les tissus non lymphoïdes en agrégats avec d'autres cellules immunitaires appelées structures lymphoïdes tertiaires (TLS) comme les CD4⁺, CD8⁺ et les DCs (Nelson, 2010). Les LBs jouent un rôle important dans la défense de l'organisme contre les pathogènes et elles sont capables de contribuer à différentes maladies d'auto-immunité, la rejection d'allogreffe et le cancer. Son rôle dans cette dernière maladie n'est pas encore bien élaboré mais ils font l'objet de nombreuses recherches actuellement. Certaines études ont montré que leur présence est accompagnée d'un meilleur pronostic et une activation des LT. Les LB s'infiltrant dans la tumeur (TIL-B) apparaissent tôt dans la tumorigenèse du cancer du sein. Elles sont présentes dans environ 25% des tumeurs et représentent jusqu'à 40% des TIL (Nelson, 2010). TIL-Bs pourraient tuer directement les cellules tumorales par le biais de mécanismes indépendants de l'Anticorps. L'activité cytotoxique des LB peut être exécutée

grâce à la sécrétion de granzyme B suite à une stimulation par IL-21 ou *via* la signalisation TRAIL suite à une stimulation par IFN- α ou un agoniste de TLR. Les LB peuvent jouer un rôle essentiel dans l'immunité anti-tumorale en produisant des anticorps, en agissant comme des CPA et en fabriquant des molécules inflammatoires qui régulent d'autres cellules immunitaires. Par contre, d'autres études ont illustré leur rôle dans la suppression de l'immunité antitumorale et l'inhibition du fonctionnement des LT (Nelson, 2010; Seiller and Dubois, 2017; Yuen et al., 2016). Par exemple, certains anticorps antitumoraux sont capables de générer des complexes immuns circulants (CIC) dont leur présence est accompagnée d'un pronostic faible ayant ainsi un rôle dans la prise de cancer et l'induction des MDSC (Yuen et al., 2016). Les LB suppresseurs de la RI sont nommées des cellules B régulatrices (Breg) où certaines sont capables de sécréter IL-10 ou TGF- β et d'autres l'IL-35. La sélection et l'induction de la prolifération de ces cellules peuvent être suite au développement des cellules cancéreuses elles-mêmes produisant des métabolites tels que 5-lipoxygénase. TGF- β produit par les Breg peut convertir les CD4⁺ naïves en Treg Foxp3⁺ inhibant les LT CD8⁺ (Yuen et al., 2016).

5.2.2. *Lymphocytes T cytotoxiques CD8*

Les cellules T naïves sont produites dans la MO. Elles sont transportées au thymus où elles seront matures suite à la sélection négative et positive. Dans la médulla du thymus, les cellules T commencent à exprimer leurs protéines de classification CD4⁺ ou CD8⁺. Les cellules T matures pénètrent dans des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate où elles se multiplient. Les LT sont activées suite à la présentation d'Ag par les CPA au TCR approprié dans ces ganglions. Les cellules T activées quittent les ganglions lymphatiques pour atteindre le canal thoracique, le système circulatoire et enfin atteindre les tissus cibles (Maimela et al., 2019).

Les LTnaïves (CD45RA⁺, CD45RO⁻, CD62L⁺ (L-Selectin⁺), CCR-7⁺) sont différenciées en : cellules T de la mémoire centrale (T_{CM}) (CD45RA⁻; CD45RO⁺; CD62L⁺, CCR-7⁺) qui sont réactivées lors d'une rencontre secondaire avec un Ag et se retrouvent au niveau des ganglions lymphatiques. Cependant, les cellules T mémoires résidentes (T_{RM}) restent dans les sites infectieux ou tumoraux et ne recirculent pas dans le système circulatoire. Les cellules T mémoire effecteurs (T_{EM}) (CD45RA⁻, CD45RO⁺, CD62L⁻, CCR-7⁻) circulent à travers les tissus (Maimela et al., 2019). Les LT effecteurs (T_{EFF}) ont le phénotype (CD45RA⁺; CD45RO⁻; CD62L⁻, CCR-7⁻) (Golubovskaya and Wu, 2016). L'activité anticancéreuse de ces LT CD8⁺ effecteurs dépend de leur différenciation et de leur infiltration

dans la tumeur. En effet, la présence ou l'infiltration de LT CD8⁺ dans le MET est reliée à un bon pronostic pour différents types de cancer tel que le cancer de sein, cancer colorectal, glioblastome, cancer du col de l'utérus et de l'ovaire, mélanome, le carcinome à cellules rénales (RCC) et le cancer de la vessie (Hadrup et al., 2013; Maimela et al., 2019).

Dans le MET, les cellules T cytotoxiques (LTc) produisent IL-2, IL-12 et IFN- γ ce qui favorise la fonction cytotoxique des cellules T CD8⁺ pour la production de TRAIL, ROS et perforine (Maimela et al., 2019). Les cytokines extracellulaires produites par les DCs : IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 stimulent à leurs tours les LT CD8⁺.

L'interaction entre le TCR des LT CD8⁺ et CMHI des CPA (DCs) est l'étape clé pour l'activation des LT CD8⁺. Il existe d'autres signaux co-stimulateurs entre les LTc et les DCs. L'activation de CD95 facilite la croissance, la différenciation et la migration des cellules T CD8⁺ où son interaction avec son ligand CD95L (à la surface des DCs) favorise la différenciation des LT CD8⁺ naïves en LT CD8⁺ mémoires et cytotoxiques. L'activation de CD69 stimule l'influx d'ions calcium (Ca²⁺), l'activation des kinases extracellulaires ERK1/2 et la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ . Les interactions entre CD28 et CD80/86 ; CD27 et CD70/TNFSFS7 stimulent les cellules T CD8⁺. Le trafic et l'infiltration des LT CD8⁺ sont favorisés par les interactions entre les chimiokines et leurs récepteurs à la surface des LT telles que les interactions entre CXCR3/CXCL9, CXCL10 ou CXCL11 ; CX3CR1/fractalkine ; CXCR6/CXCL16 ; CCR5/CCL4 ou CCL5 ; CCR6/CCL20 ; CCR1/CCL3 et celles entre sphingosine-1-phosphates (S1Ps) et ses récepteurs correspondants (Maimela et al., 2019). La circulation des LT CD8⁺ est aussi stimulée par l'interaction entre les molécules d'adhésions ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales et les Ag LFA-1 et VLA-4, respectivement. L'absence de ces molécules d'adhésion empêche la circulation des CD8⁺ jusqu'au site tumoral.

Le fonctionnement des cellules T est inhibé par différents facteurs dont certains sont produits par la cellule tumorale. Une interaction majeure inhibitrice est celle entre les récepteurs co-inhibiteurs PD-L1 et CD80 des cellules tumorales, avec PD-1 et CTLA-4 des LT CD8, respectivement. Ces interactions inhibent également la voie des Akt. De plus, la cellule tumorale peut exprimer les CD39 et CD73 qui facilitent le métabolisme d'ATP et d'ADP extracellulaire en AMP et par la suite en adénosine ayant un rôle immunosuppresseur, inhibant ainsi les CD8⁺. Une autre molécule inhibitrice est le lactate issu de la glycolyse anaérobie. La conversion de la tryptophane en kynurenine par IDO inhibe l'activation et la prolifération des CD8⁺ et facilite la production des Treg (Maimela et al., 2019). L'interaction entre le récepteur CCR2 et la chimiokine CCL2 produite par les MDSC, est corrélée avec une

faible infiltration des LT CD8⁺. La régulation de ces cellules est aussi modulée par la signalisation Notch (Tsukumo and Yasutomo, 2018). Les LTc utilisent les mêmes mécanismes d'action que les NK pour éradiquer les cellules cancéreuses. Même si l'apoptose est bloquée, les LTc continuent à tuer leur cibles (Martinez-Lostao et al., 2015).

5.2.3. *Lymphocytes T CD4*

Comme pour les CD8⁺, les cellules CD4⁺ sont activées suite à la reconnaissance de leur TCR d'un Ag présenté par les CMH II afin de se différencier de LT naïves à des CD4 mémoires ou effecteurs (Golubovskaya and Wu, 2016). Les cellules T CD4 jouent un rôle central dans la réaction immunitaire grâce à leur capacité à aider les LB à fabriquer des Anticorps, à inciter les macrophages à développer une activité microbiocide accrue, à recruter des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles sur des sites d'infection et d'inflammation (par leur production de cytokines et de chimiokines) et à coordonner la panoplie complète de la RI (Zhu and Paul, 2008). Selon le type de signaux qu'elles reçoivent au cours de leur interaction initiale avec l'Ag et les molécules secrétées, différents types de cellules T CD4 sont différenciées (Golubovskaya and Wu, 2016) :

- Les Th (T helper)1 sont responsables de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et les réactions d'hypersensibilité de type retardée. Elles sont différenciées sous l'action des signalisations IFN- γ / STAT1, IL-2 / STAT5, IL-12 / STAT4 et les signaux des TCR. Les cellules Th1 sont le plus souvent définies par leur production d'IL-2 et d'IFN- γ . De plus, il a été rapporté qu'elles produisent un certain nombre de cytokines, notamment: le TNF, la lymphotoxine (LT α) et le GM-CSF. Les effecteurs Th1 engagés expriment le facteur de transcription T-bet (Raphael et al., 2015).
- Th2 induites par l'IL-4 et elles sont bien connues pour leur production d'IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, IL-10, IL-25 et l'amphireguline (Zhu and Paul, 2008). Les cellules Th2 sont responsables de l'immunité à médiation humorale et sont connues par leur implication dans les allergies et les maladies atopiques (Raphael et al., 2015).
- Th9 dont le développement dépend de la combinaison de l'effet d'IL-4 et TGF- β pour produire IL-9
- Th17 induites par IL-1, IL6, IL23 et TGF- β . Elles sont capables de sécréter IL-17 (A et F), IL-21, IL-22, IL-25 et IL-26. IL-17 a un rôle important dans la défense contre les bactéries extracellulaires, les champignons et d'autres agents pathogènes eucaryotes (Raphael et al., 2015).

- Th22 induites par IL-6 et TNF pour sécréter IL-22 pouvant avoir un rôle anti ou pro-inflammatoire.
- Treg (LT régulatoire) sont essentielles au maintien de l'auto-tolérance et de l'homéostasie immunologique. Elles empêchent les maladies auto-immunes en supprimant les cellules T auto-réactives. Elles peuvent également contribuer au développement de la tolérance immunitaire envers les tumeurs et la suppression de l'immunité anti-tumorale. Leur présence dans le MET est accompagnée d'un faible pronostic. Elles peuvent inhiber la fonction des cellules LT $CD4^+$, $CD25^-$, $LT CD8^+$, DCs, NK, NKT et les LB. Les cellules Treg sont des $CD4^+$, $CD25^+$ et $FoxP3^{+/-}$ exprimant de façon constitutive GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) et le récepteur CTLA-4 qui a des fonctions inhibitrices des lymphocytes effecteurs et des CPA à travers les CD80 et CD86. Elles sont induites par les facteurs TGF- β et IL-2 et elles sont capables de synthétiser les cytokines immunosuppresseurs IL-10, IL-35 et TGF- β (X. Chen et al., 2016; Golubovskaya and Wu, 2016). Elles peuvent être dérivées de quatre sources : i) par migration des systèmes lymphatiques ou circulatoires vers le TME sachant que leur circulation est facilitée par la production de CCL22 à travers les cellules tumorales et les macrophages ;ii) par différenciation résultante de la suppression des CPA ;iii) par expansion suite à une stimulation par les DCs et les molécules comme TNF- α et IDO ;iv) par la conversion de LT_{eff} en cellules Treg par TGF- β (Maimela et al., 2019). Les Treg sont classées en nTreg (Treg naturels, dérivés du thymus ($Foxp3^+$)) et iTreg induites par maturation post-thymique se développant à la périphérie. Ces dernières ont été par la suite discriminées en Th3 ($Foxp3^+$) et Tr1 ($Foxp3^-$, majeur producteur d'IL-10) (Raphaël et al., 2015). Chez l'homme, trois sous populations sont différenciées : rTreg (Treg au repos) $CD45RA^+Foxp3^{low}$, aTreg (Treg activées) $CD45RA^+Foxp3^{high}$ et des cellules T non suppressores sécrétant des cytokines $CD45RA^+Foxp3^{low}$ (X. Chen et al., 2016).
- Tfh (follicular helper T cells) jouent un rôle important d'aide aux lymphocytes B et se différencient sous l'action de l'IL-6 et IL-21 pour produire de l'IL-21. Ils sont localisés dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires et le rôle de ces cellules dans la RI est en train d'être disséqué à l'heure actuelle.

5.2.4. Les lymphocytes $T\gamma\delta$

Ces lymphocytes sont caractérisés par l'expression à leur surface de récepteurs (TCR) de type $\gamma\delta$ à la différence des LT CD4 et CD8 ayant un TCR $\alpha\beta$. Elles peuvent être classées en trois populations suivant l'expression de la chaîne δ ($V\delta 1$, $V\delta 2$ et $V\delta 3$) aboutissant ainsi à différents rôles et sites de localisation (Wu et al., 2014). La population $V\delta 2$ est la plus majoritaire des LT $\gamma\delta$ en circulation chez l'adulte en bonne santé. La chaîne $V\delta 2$ s'apparie presque exclusivement avec $V\gamma 9$ (également appelée $V\gamma 2$) formant ainsi $V\gamma 9V\delta 2$. Elles peuvent servir de CPA (Wu et al., 2014). La diversité du TCR $\gamma\delta$ est assurée par recombinaison somatique aléatoire des segments géniques V-(D)-J des gènes codants pour les chaînes γ et δ (Catros et al., 2010).

Les cellules $T\gamma\delta$ reconnaissent une variété de ligands et d'Ag non conventionnels comprenant les antigènes non peptidiques, les molécules de surface cellulaire MHC (CD1 a, b, c, d) et non MHC, les protéines solubles et les protéines sulfatées (Wu et al., 2014). Les cellules T $V\gamma 9V\delta 2$ sont capables de lyser les cellules tumorales par l'action des granzymes A/B et la perforine après reconnaissance à la surface de ces cellules des phosphoantigènes PAg. Ces derniers sont principalement les IPP chez les cellules cancéreuses où leur biosynthèse est accrue (Catros et al., 2010).

Elles possèdent des activités cytolytiques et participent à la régulation de la RI en aidant les LB, présentant les Ag au LT $\alpha\beta$, recrutant des macrophages et induisant la maturation des DCs (Wu et al., 2014). De plus, elles sécrètent diverses cytokines et chimiokines, y compris $IFN-\gamma$ et $TNF-\alpha$, l'IL-4, IL-10, IL-17, KGF, CTGF et cathelicidine/LL37 (Wu et al., 2014).

5.2.5. Les lymphocytes TNK

Ces lymphocytes font partie de l'immunité adaptative et servent de premiers intervenants dans la réaction immunitaire. Deux types de NKT sont distingués : les NKT de type I et de type II. Les premiers appelés NKT classiques ou iNKT pour invariant NKT, possèdent le récepteur cellulaire T semi-invariant $TCR\alpha$ qui reconnaît l'Ag lipidique α -galactosylcéramide (α -GalCer) présenté par CMHI(CD1d). Ce type de NKT favorise l'immunité antitumorale. Les principaux mécanismes impliqués dans cette activité (élimination des cellules exprimant CD1d) sont : la production d' $IFN-\gamma$, l'activation de DCs pour produire de l'IL-12 et devenir des CPA plus efficaces, l'activation et le recrutement des LB, NK et des LT $CD8^+$, l'expression de granzymes et perforine, l'interaction Fas-FasL ou

par voies cytotoxiques médiées par le TNF- α (Nair and Dhodapkar, 2017; Terabe and Berzofsky, 2018). Elles sont capables de tuer les TAM exprimant CD1d, de supprimer l'activité des MDSC et de convertir les MDSCs immatures en CPA matures. Par analogie avec les LT CD4⁺, les NKT type I peuvent être divisées en NKT1, NKT2 et NKT17. Elles peuvent être également classées selon leur expression en CD4⁺ ; CD8⁺ ou CD4⁻CD8⁻ (Nair and Dhodapkar, 2017). Par contre, les NKT II, appelées aussi cellules NKT diverses ou variantes, sont restreintes à CD1d. Elles ne reconnaissent pas le galactosyl ceramide alpha (α -GalCer) mais plutôt les sulfatides dérivés de myéline, les lysosulfatides, β -glucosylcéramide (β GlcCer), les lysophosphatidylcholine (LPC) et son produit désacylé glucosylsphingosine (Nair and Dhodapkar, 2017). Elles sont immunosuppressives et sont capables de promouvoir les Treg et les MDSC en les induisant à sécréter le TGF- β . Elles inhibent l'activité proinflammatoire et protectrice des NKT I, des LT et les DCs. L'équilibre entre les Treg et les NKT II est déterminé par une cellule NKT I, à son tour pouvant être inhibée par les NKT II (Terabe and Berzofsky, 2018).

5.3. Mécanisme d'échappement : anomalie du système immunitaire

Le développement du cancer est en relation avec l'échappement des cellules endommagées à l'apoptose et à la surveillance immunitaire étant donné que les patients immunodéprimés sont plus susceptibles à développer certains types de cancer (Dietrich and Walker, 2000). Ceci est dû à différentes raisons en considérant que les tumeurs sont immunogènes. Cependant, ce signal est parfois faible pour pouvoir rejeter une tumeur à croissance rapide (P et al., 2011). De plus, l'activation des lymphocytes T (LT) nécessite deux signaux : le premier est l'association entre le TCR des lymphocytes et le système CMH-Ag-tumoral, le deuxième est délivré par les molécules de co-stimulation (famille B...) qui est nécessaire pour éviter l'anergie des lymphocytes. En général, les cellules tumorales sont dépourvues de ce deuxième système ce qui fait que le signal tumorigène soit faible. Ce signal peut être renforcé par la présentation d'Ag par les CPA et leur rôle dans l'activation des LT par la suite (Dietrich and Walker, 2000). Parmi les anomalies affectant la RI on peut citer : la perte d'expression des molécules CMH dues à l'absence des TAP (Transporter associated with Antigen Processing) qui participent au transport des peptides du cytoplasme au RE où elles s'associent aux molécules du CMH ; les altérations du CMH dues à la perte de l'haplotype, du locus ou d'un simple allèle (Dietrich and Walker, 2000).

La réponse antitumorale est influencée par la nature des Ag et le type de CPA qui leur présente, leur taux d'expression et le micro-environnement. Ce dernier peut contenir des facteurs solubles qui inhibent la RI. Par exemple, certaines tumeurs sur-expriment le TGF- β 2 qui a un effet immunosuppresseur, diminuant l'expression de CMH II, et la synthèse des granzymes et perforines. D'autres facteurs inhibant la RI sont l'IL-10, les prostaglandines ou les gliosides membranaires (Dietrich and Walker, 2000).

5.4. *Les TILs*

En cas de développement du cancer dans un tissu, les lymphocytes s'infiltrent dans cette tumeur dans le but d'améliorer son pronostic. Si ces infiltrats contiennent des LT CD8⁺ ou NK, ils auront un effet bénéfique (destruction tumorale). Les CD4⁺ T-helper 1 (Th1) facilitent également la présentation de l'antigène par la sécrétion de cytokines et l'activation des CPA. L'infiltration des lymphocytes est néfaste au cas où ce sont les Treg (CD4⁺ FOXP3), Th17 (des pro-inflammatoires) et les Th2 (T auxiliaires CD4⁺ de type 2) sont présents.

Les TILs sont en relation avec une amélioration des résultats cliniques dans la majorité des sous-types du cancer du sein. Les TNBC sont considérés comme un cancer de sein à prédominance lymphocytaire puisqu'il est caractérisé par un infiltrat lymphocytaire supérieur à 50% et une amélioration de survie ayant été enregistrée avec chaque augmentation de 10% des TIL (Stanton and Disis, 2016). Les cancers HER⁻/ER⁺/PR⁺ ont un pronostic défavorable avec l'augmentation de l'infiltration de cellules T régulatrices FOXP3 et présentant en général le moins d'infiltrat immunitaire. Les autres types de cancers du sein HER2⁺ montrent moins d'amélioration de survie par augmentation des TILs par rapport au TNBC. Le TNBC démontre la réponse clinique la plus robuste au traitement par les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire PD-L1. L'expression de ce marqueur dans la tumeur indique qu'il est immunologiquement actif (Stanton and Disis, 2016).

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. *Microalgues*

Ce travail s'est focalisé sur l'étude de *Dunaliella* sp isolée à partir du biotope marin tunisien : Sebka de Sidi El Hani (Sousse, Tunisie). L'isolement de cette souche a été effectué par l'équipe de Biotechnologie des algues (UBA) à l'École Nationale d'Ingénieurs de Sfax au département de Génie Biologique (Ben Amor et al., 2017).

1.2. *Milieu de culture de Dunaliella*

Le milieu de culture de la microalgue utilisée est le milieu f/2 à base d'ASW (Artificial SeaWater) dont les compositions sont les suivantes.

ASW (1L): NaCl 27 g ; MgSO₄ 6,6 g ; MgCl₂ 5,6 g ; CaCl₂ 1,5 g ; KNO₃ 1 g ; KH₂PO₄ 0,07 g ; NaHCO₃ 0,04 g ; 20 ml Buffer Tris (pH7,6) 1 M.

f/2 (1L): 996,5 ml ASW ; 1ml de NaNO₃ (75 g/l); 1 ml de NaH₂PO₄ (5 g/L) ; 1 ml de trace de métaux ((100 ml) : 0,98 g CuSO₄.5H₂O, 2,2 g ZnSO₄.7H₂O, 1 g CoCl₂.6H₂O, 18 g MnCl₂.4H₂O, 0,63 g Na₂MoO₄.2H₂O) ; 0,5 ml solution vitaminique ((1L) : 1 mg Biotine, 1 mg B12 et 20 mg Thiamine HCl).

1.3. *Les lignées cellulaires sélectionnées*

1.3.1. *Cellules 4T1 comme modèle de cancer de sein*

Les cellules 4T1 ont été obtenues chez ATCC (ATCC® CRL-2539™, Rockville MD, Etats-Unis). Ce sont des cellules du carcinome mammaire au stade IV du cancer de sein dérivant des souris Balb/c. Ces cellules ont été isolées par GH Heppner en 1978 (Heppner et al., 1978). Elles sont hautement tumorigènes et invasives, caractérisées par un pouvoir de métastase spontané dans les poumons, le foie, le sang, les os, les ganglions lymphatiques et le cerveau étant donné que la tumeur primaire continue sa croissance *in situ*. Les 4T1 sont résistantes au 6-thioguanine qui agit comme un anti-métabolite. La tumeur formée à partir de ces cellules est similaire au cancer de sein triple négatif TNBC humain.

1.3.2. *Cellules A549 comme modèle de cancer de poumon*

Les cellules A549 (ECACC) sont des cellules épithéliales basales alvéolaires d'adénocarcinome humain. Elles ont été isolées d'un patient caucasien âgé de 58 ans en 1972

par Giard et ses collaborateurs (Giard et al., 1973). Elles sont hypotriploïdes dont 24% des cellules ont 66 chromosomes, 22% ont 64 chromosomes et d'autres à 65 ou 67 chromosomes à des fréquences relativement élevées.

1.3.3. *Cellules HeLa comme modèle de Cancer du col de l'utérus*

Les cellules HeLa (CCI-2-ATCC, Rockville MD, USA) ont été isolées d'un prélèvement de métastase d'une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus âgée de 31 ans en 1951 par George Otto Gey. Ces cellules aneuploïdes sont caractérisées par la présence d'un petit chromosome télocentrique dans 98% des cellules. C'est la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine.

1.4. *Milieux de cultures des cellules cancéreuses*

Le milieu correspondant aux cellules 4T1 est le milieu complet de culture de tissu Roswell Park Memorial Institute medium RPMI 1640 (Sigma). Quant aux cellules A549 et HeLa, elles sont cultivées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Sigma). Les deux milieux de cultures sont supplémentés par 10% FBS (Sigma) décomplémenté par traitement à (60 °C, 45 min) et 1% de mélange de pénicilline 100 U·mL⁻¹ et streptomycine 100 µg·mL⁻¹ (Sigma).

1.5. *Les souris*

Des souris BALB/c, femelles âgées de 8 semaines ont été fournies par « Elevage Janvier ». 5 lots expérimentaux de 5 souris chacun ont été utilisés pour effectuer les analyses statistiques.

2. **Méthodes**

2.1. *Conditions de culture de *Dunaliella**

2.1.1. *Dans les conditions 'Contrôles'*

Dunaliella sp. est cultivée dans de l'eau de mer artificielle (ASW), enrichie en nutriments du milieu f/2 (Guillard, 1975). Le milieu ASW assure une composition stable en nutriments pour les microalgues. La microalgue isolée est cultivée dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture. Le milieu est inoculé stérilement avec 10% d'une pré-culture fraîchement préparée. Les cultures croissent à 25 °C et à un éclairage

continu de $80 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fourni par des lampes fluorescentes pendant en moyenne 20 jours.

2.1.2. Optimisation de la production de caroténoïdes par plan d'expérience

Dans le but d'une surproduction de caroténoïdes par la souche isolée, la méthode des surfaces de réponse (RSM) a été utilisée selon la conception de Box-Behnken à trois facteurs et trois niveaux (Box and Behnken, 1960). Pour cela, *Dunaliella* cultivée dans les conditions précédemment décrites, en milieu de la phase exponentielle, est utilisée comme inoculum à 10% pour les nouvelles cultures du plan d'expérience.

Dans une étude précédente au sein de l'équipe UBA (Ben Amor et al., 2017), l'effet de la salinité, la concentration en azote et l'intensité lumineuse a été étudié pour améliorer le taux d'accumulation de caroténoïdes par la souche isolée. Ce travail vient en continuité avec ce qui a été fait précédemment dans le but d'explorer l'effet d'élargir les intervalles d'étude du plan d'expérience sur la réponse de la microalgue. Ainsi, les mêmes facteurs sont conservés avec élargissement de leur domaine d'investigation.

2.2. Approches de modélisation pour les simulations et les prédictions du plan d'expérience

Les RSM offrent l'avantage d'étudier l'effet simultané et l'interaction entre les facteurs à étudier, en réduisant le nombre d'expériences et en améliorant les possibilités d'interprétation statistique (Imamoglu et al., 2014). Le modèle quadratique (Eq.2) donnant la relation entre la réponse calculée et les facteurs choisis a été obtenu par régression des moindres carrés. Pour chaque facteur, trois niveaux codés (-1, 0, +1) ont été attribués (tableau 6).

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum_i \beta_i \cdot X_i + \sum_i \sum_{j \neq i} \beta_{ij} \cdot X_{ij} + \sum_i \beta_{ii} \cdot X_i^2 \quad (2)$$

\hat{Y} est la variable de réponse calculée, β_0 est la constante du modèle, β_i ($i = 1, 2$ ou 3) est l'effet linéaire du facteur d'entrée X_i , β_{ij} est l'effet d'interaction linéaire entre les facteurs d'entrée X_i et X_j , β_{ii} est l'effet quadratique du facteur d'entrée X_i .

Tableau 6. Variables codées et gamme expérimentale de facteurs sélectionnés pour l'optimisation de la production de caroténoïdes

facteurs	Variabes codées	unité	-1	0	+1
Salinité	X ₁	M	2	3,5	5
Intensité lumineuse	X ₂	μmol photon.m ⁻² .s ⁻¹	200	370	540
Azote NaNO ₃	X ₃	mM	0	0,5	1

Un total de 15 essais a été réalisé avec trois expériences au centre pour estimer l'erreur expérimentale. La matrice expérimentale adoptée est présentée dans le tableau 7. Le traitement des résultats est effectué par le logiciel «STATISTICA». Pour estimer la signification statistique du modèle, l'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée. Pour évaluer la qualité du modèle développé, le coefficient de détermination R² et le coefficient de détermination ajusté R²_{ajusté} ont été calculés.

Tableau 7. Plan expérimental de la matrice Box-Behnken et évaluation de la quantité de caroténoïdes produits

Expériences	X1	X2	X3	Caroténoïdes (μg/ml)
1	-1	-1	0	8,23
2	+1	-1	0	0,26
3	-1	+1	0	17,45
4	+1	+1	0	0,08
5	-1	0	-1	14,57
6	+1	0	-1	0,04
7	-1	0	+1	18,36
8	+1	0	+1	1,10
9	0	-1	-1	5,60
10	0	+1	-1	10,95
11	0	-1	+1	6,66
12	0	+1	+1	15,51

13	0	0	0	9,15
14	0	0	0	10,39
15	0	0	0	10,62

2.3. *Suivi de la croissance*

Le suivi de la croissance de *Dunaliella* est fait par comptage des nombres de cellules avec un hémacytomètre (cellule de malassez) tous deux jours. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (concentration finale de 2%), puis comptées au microscope optique (Nikon Diaphot 300).

2.4. *Extraction des pigments*

Les pigments ont été extraits à partir de 2 ml de cultures cellulaires. A leur culot, 2 ml d'éthanol à 96% ont été ajoutés et le mélange est soumis à une sonication de 40 kHz pendant 20 min, puis incubé une nuit à 4 °C. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation et les pigments ont été rassemblés dans le surnageant. Les chlorophylle a, b et les caroténoïdes ont été dosés par spectrophotométrie (T60 UV-visible spectrophotometer) contre l'éthanol 96% comme blanc en utilisant les équations données par (Wellburn and Lichtenthaler, 1984). Comme le β -carotène est le caroténoïde dominant chez *D. salina*, la concentration des caroténoïdes totaux calculée est un bon indicateur de sa teneur en ces pigments (Mendoza et al., 2008).

2.5. *Analyse des cellules algales par cytométrie en flux*

L'analyse des cellules algales par cytométrie en flux est en croissance accrue ces dernières années étant donné qu'elle est une méthode non invasive permettant d'analyser l'échantillon qualitativement et quantitativement dans des conditions non toxiques. Elle permet l'étude précise des caractéristiques intrinsèques et extrinsèques des cellules de microalgues. L'analyse des différents composants de la microalgue est effectuée grâce à leur autofluorescence ou moyennant l'utilisation de fluorochromes pour cibler les molécules d'intérêts. Ainsi, cette technique peut être utilisée pour isoler des cellules surproduisant des composés cibles et/ou trier les cellules pour la préparation de culture micro-algale axénique (Hyka et al., 2013).

Les paramètres structurels intrinsèques ont été évalués grâce au FSC (Forward Scatter) SSC (Side Scatter) évaluant la taille / le volume des cellules dans le plan du faisceau laser et le deuxième paramètre donne une idée sur la morphologie, la granularité, ou l'irrégularité de la surface et est mesuré à 90 ° du faisceau (Cutzu et al., 2013). Les propriétés cellulaires extrinsèques en matière de composant cellulaire nécessitent l'excitation de la cellule avec une sonde fluorescente particulière. Les pigments (chlorophylles et caroténoïdes) sont des composants auto-fluorescents ce qui facilite leur détection (Hyka et al., 2013).

Les analyses de cytométrie ont été effectuées à l'aide d'un BD LSR (Becton Dickinson) équipé de deux lasers: Argon ($\lambda_{ex}488nm$) et Hélium-Néon ($\lambda_{ex}633nm$). Il est associé au logiciel CellQuest Pro. Les diagrammes présentés ont été traités en ligne (<https://www.cytobank.org/>). La sonde d'argon ($\lambda_{ex}488nm$), dont on a besoin, est associée aux canaux d'émission FL1 (FITC), FL2 (PE) et FL3 (PerCP) qui émettent respectivement aux longueurs d'onde 530/30, 575/26 et 682/13 nm. Les intensités de signal de fluorescence ont été calculées à partir de l'intensité de fluorescence moyenne de 10 000 événements.

2.6. Observations au microscope épi-fluorescent

Dunaliella. sp a été fixée au milieu de la phase exponentielle par le paraformaldéhyde à une concentration finale de 2%. Les observations sont effectuées avec l'aide de M.Gosset (Responsable technique du Plateforme de Cytométrie et imagerie cellulaire - P@CYFIC du Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans) moyennant le microscope à fluorescence ZEISS AXIOVERT 200 associé au logiciel AxioVision. Le grossissement objectif est de 20 ×.

2.7. Extraction des ARN totaux

Les cellules cultivées dans les deux conditions de culture, à différents stades d'incubation (0, 4, 24, 48 et 72 h) ont été récoltées par centrifugation à 1800 xg pendant 10 min. Le protocole est optimisé pour éviter la perte des ARN_t des cellules stressées fragilisées. L'extraction des ARN_t à partir des culots de *Dunaliella* est faite via le TRIzol® (Invitrogen) avec broyage dans le but d'obtenir un lysat cellulaire. Après incubation pendant 30 min dans la glace, 100µl de chloroforme sont ajoutés par 1ml de TRIzol. Le mélange est incubé 5 min dans la glace puis vortexé 30 sec. Les ARN_t sont récupérés dans la phase aqueuse après centrifugation à 12000 g, 15 min à 4 °C. Un volume équivalent d'éthanol 70% est ajouté puis mélangé doucement par renversement du tube. Ce mélange est transféré dans les colonnes du

kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) et centrifugé à 12500 rpm, 15sec à 4 °C puis lavé 3 fois par le tampon de lavage RPE fournie avec le kit. Les ARN_t sont élués dans l'eau RNase free. La concentration et la qualité d'ARN ont été déterminées par mesure de l'absorbance (260 nm / 280 nm) en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). La pureté des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Environ 1 µg d'ARN_t résultant a été utilisé pour la synthèse d'ADNc par le kit TaKaRa PrimeScript™ RT avec gDNA Eraser selon le protocole donné par le fabricant. Les ARN_t sont conservés à -80 °C et les ADNc sont préparés sous forme des aliquots de 100 ng/µl et conservés à -20 °C.

2.8. qRT-PCR

2.8.1. Conception et validation des amorces

Pour notre étude transcriptionnelle, l'expression de différents gènes a été suivie par qRT-PCR. Pour cela, les paires d'amorces suivantes ont été conçues (Tableau 8) moyennant Primer-BLAST de NCBI et Primer 3 Input 4.0: *l'alpha tubuline (α-TUB)*, *la bêta tubuline (β-TUB)*, *l'énoïase (Eno)*, *la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)*, *la lycopène β-cyclase (LCYB)*, *la protéine de choc thermique (HSP70)* et *la ribulose phosphate-3-épipimérase chloroplastique (RPE)*. Ils ont été conçus sur la base des séquences de nucléotides de *D. salina* dans la base de données GenBANK. Les amorces du gène codant pour la *Cgp (carotène globule protein)* sont conçues suivant la séquence disponible de *Dunaliella bardawil* étant donné qu'elles ne sont pas disponibles chez *D. salina*. Les paires d'amorces utilisées pour l'*Actine (Act)* et l'*ARNr 18S* sont celles citées par (H. Chen et al., 2011; X.-J. Chen et al., 2016) respectivement. L'ensemble des amorces et les caractéristiques des amplicons sont représentés dans le Tableau 8. La conception des amorces a obéi aux critères suivants: une longueur comprise entre 18 et 24 nucléotides, une longueur d'amplicon de 100 à 200 pb et une température (T_m finale) choisie d'environ 60 °C. La spécificité des amorces conçues a été vérifiée d'une part par blast sur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et d'autre part par amplification et migration sur gel d'agarose suivie d'une analyse des courbes de fusion obtenues par qPCR. La concentration optimale des amorces a également été optimisée pour la qPCR (100 à 200 nM) pour éviter les amplifications non spécifiques et / ou des artefacts d'amorce-dimère.

2.8.2. Sélection du gène de référence

Les gènes codants pour *Act*, l'*ARN 18S*, l'*α-TUB* et le *β-TUB* ont été utilisés pour le criblage du gène le plus stable dans toutes les conditions des expériences réalisées. Les valeurs des C_q obtenues ont été importées sur le site RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>) qui intègre les programmes d'évaluation des gènes de référence couramment utilisés, y compris geNorm, NormFinder, Bestkeeper et la méthode comparative delta Ct (Li et al., 2015; Xie et al., 2012). Les résultats élaborés par RefFinder ont été confirmés par GeNorm, disponible par fichier Excel.

Tableau 8. Amorces utilisées et leurs caractéristiques : taille des amplicons correspondants, température de fusion T_m (° C) basée sur l'analyse de la courbe de fusion, l'efficacité d'amplification E (%) et référence ou numéro d'accès

Gènes	abréviations		séquence des amorces (5'→3')	Taille d'amplicon (bp)	T_m (°C)	E (%)	Référence/ numéro d'accès
<i>Actine</i>	<i>Act</i>	F	ACCACACCTTCTTCAACGAG	150	86,76	111,35	(H. Chen et al., 2011)
		R	GGATGGCTACATACATGGCA				
<i>18S RNA</i>	<i>18S</i>	F	TTGGGTAGTCGGGCTGGTC	--	83,2	92,6	(X.-J. Chen et al., 2016)
		R	CGCTGCGTTCTTCATCGTT				
<i>Alpha tubuline</i>	<i>α-TUB</i>	F	GAGATCACCAACGCTGCCTTTGA	105	86,03	106,2	JF346103.1
		R	CACCACATCACCGCGGTACAT				
<i>Beta tubuline</i>	<i>β-TUB</i>	F	AGGAGGGCGAGTTTGAGGGT	137	83,12	92,4	DQ080916.1
		R	AGCGCGGTGGACTTGAACAG				
<i>Enolase</i>	<i>Eno</i>	F	TGAAGGGCATGGACCCAGG	123	85,66	97,23	KM008612.1
		R	TGGCAGTTGCCAGGGAGACA				
<i>1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase</i>	<i>DXS</i>	F	AGGACTTACGCCTGGCCACAT	102	85,67	94,86	FJ469276.1
		R	GCAGCAACCAGGCCAGTGTT				
<i>Lycopene β-cyclase</i>	<i>LCYB</i>	F	CCTGCAATCACACAGGCGG	130	87,91	97,1	EU327876.1
		R	GGGGGTTTCTGGCGTCCTCT				
<i>carotene globule protein</i>	<i>Cgp</i>	F	GGCAACCGAGGCAGTGACTACCA	104	85,18	111	JX646677.1
		R	GGAACTCCGGTGGACATCTGGTT				
<i>chloroplast-localised heat shock protein</i>	<i>HSP70</i>	F	TGCAGGCTGGTGTGCTGTCT	124	87,88	99,03	AJ271605.2
		R	AGGGTGGTGTGCGGGTGAT				
<i>chloroplaste ribulose phosphate-3-epimerase</i>	<i>RPE</i>	F	TGATCAAGGACCTGGGCTGCAA	120	85,96	97,33	JF346108.1
		R	AGCCAGGGTTCACGGACATGA				

2.8.3. Paramètres utilisés en q-PCR

La q-PCR a été réalisée en utilisant le kit PCR StepOne QuantiFast SYBR Green (Qiagen) conformément au manuel du fabricant en utilisant la machine LightCycler 480 II (Roche). Les paramètres pris en considération sont les suivants : une dénaturation initiale (activation) à 95 °C pendant 5 min suivie de 40 cycles à 95 °C pendant 10 s et 60 °C pendant 30 s. Une étape de fusion par chauffage à 95 °C suivie de refroidissement à 60 °C, a été ajoutée pour vérifier la spécificité de chaque paire d'amorces. La présence de pic unique à la température de fusion calculée au niveau de la courbe de fusion confirme la spécificité de l'amplicon obtenu. L'acquisition et l'analyse des données ont été effectuées par le logiciel LightCycler® 480, version 1.5 (Roche). L'expression génique relative a été calculée en utilisant α -TUB comme gène de référence. Les valeurs de Cq ont été corrigées par calcul de l'efficacité PCR pour chaque gène. Cette dernière est évaluée à l'aide d'une courbe standard à partir de quatre solutions de concentration connue d'ADNc préparées par une série de dilutions de 2. Toutes les qPCR ont été répétées 3 fois avec trois répétitions par puits. La quantification relative de l'échantillon stressé à différents temps a été normalisée par rapport à l'échantillon non stressé à T0. Le calcul du rapport est calculé à l'aide de l'équation suivante (Eq.3):

$$\text{Rapport} = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta C_{\text{Pcible}}(\text{control}-\text{échantillon})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control}-\text{échantillon})}} \quad (3)$$

2.9. Analyse des protéines in silico : modélisation moléculaire

L'approche de la modélisation moléculaire permet la prédiction de structures 3D des protéines qui ne sont pas résolues par les méthodes expérimentales (cristallographie, RMN...). Cette approche fait appel à l'homologie avec d'autres protéines identifiées, à la reconnaissance de repliement ou à l'approche « Ab-initio » pour les petites molécules et protéines. Dans notre étude, la prédiction par homologie a été utilisée en commençant par la recherche de la structure matrice dans la banque PDB, prédire une structure 3D et par la suite étudier ses interactions et les modifications post-traductionnelles possibles.

2.9.1. Choix et alignement des séquences de LCYB et Cgp

Le choix de la séquence peptidique de LCYB de *D. salina* (ACA34344.1) est fait par correspondance à la séquence d'ARNm EU327876.1 précédemment utilisée pour le design

des amorces de ce gène. De même pour Cgp, la séquence protéique prise (AFU62958.1) est celle correspondante l'ARNm codé par JX646677.1. Dans un premier temps, ces deux séquences ont été alignées, contre les séquences de la base de données NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) pour déterminer les pourcentages d'identité avec d'autres séquences. L'alignement multiple a été fait *via* Clustalw (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) (Sievers et al., 2011) et formaté avec Esript 3.0 qui donne des informations sur la structure secondaire à partir des séquences alignées (Robert and Gouet, 2014). Le serveur TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) (Xia et al., 2004) a été utilisé pour prédire les hélices transmembranaires.

2.9.2. Recherche et vérification de la protéine SUMO

Pour la recherche de la séquence SUMO chez *Dunaliella*, on a utilisé la séquence de la protéine SUMO décrite chez *Arabidopsis thaliana* (AAN03848.1). Cette séquence de 108 Aa a été blastée contre la base de données EST de *D. salina*. Ensuite, des séquences ORF ont été générées à partir de l'ADNc correspondant (GenBank: HO848823.1) en utilisant ORFfinder de NCBI et les protéines obtenues ont été blastées contre une base de données de protéines non redondantes. La recherche du motif est effectuée moyennant <https://www.genome.jp/tools/motif/>.

2.9.3. Génération des modèles tridimensionnelles

La modélisation par homologie a été réalisée avec le serveur SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/>). Pour le modèle LCYB, la structure cristalline de la géranylgeranyl réductase (PDB ID 4OPL) a été utilisée comme modèle car aucune structure de LCYB n'a été trouvée dans la base de données (X. Chen et al., 2011). La structure modélisée a ensuite été validée en effectuant une analyse par le diagramme de Ramachandran à l'aide du serveur PROCHECK (Laskowski et al., 2012). Le choix du modèle était basé sur la similarité maximale et la couverture de séquence maximale de la cible. Cependant, le modèle généré a été tronqué aux extrémités N-terminale et C-terminale. Pour la protéine SUMO, la structure de SUMO de *Trypanosoma brucei* a été utilisée comme matrice (PDB ID 2k8h.1) et le modèle généré a été également validé. Les modèles ont été visualisés à l'aide du logiciel Discovery Studio [Dassault Systemes BIOVIA, version 4.5, 2015] et du système graphique moléculaire PyMol v1.2r3 pre (Schrödinger, LLC, New York, NY, États-Unis). Les sites actifs possibles de LCYB ont été déterminés à l'aide du serveur Web CASTp (Tian et al., 2018).

2.9.4. Amarrage de ligand FAD

L'amarrage du FAD a été effectué à l'aide du programme Galaxyweb où les paramètres sont définis par défaut. GalaxyDock effectue une optimisation globale pour trouver la pose de liaison optimale d'un ligand à la fois en mode récepteur rigide et en mode récepteur souple (Shin et al., 2013).

L'amarrage moléculaire du lycopène a été réalisé à l'aide de Mcule, une plateforme de découverte de médicaments (Kiss et al., 2012). Le ligand a été préparé avec Chemdraw (Mendelsohn, 2004) et des atomes d'hydrogènes non polaires ont été fusionnés sur en utilisant Auto Dock Tools avant d'effectuer les simulations d'ancrage. La boîte de grille était centrée entre les résidues Arg 303 et Gln442 (x: -16,472, y: 15.0, z: -19,556) et la taille de la grille pour l'amarrage du ligand s'étend sur 30 Å dans chaque direction. Seules les poses les mieux classées ont été utilisées pour les analyses structurales et énergétiques. Les conformations finales produites dans cette simulation ont été vérifiées à l'aide du logiciel Pymol.

2.9.5. Prédiction des modifications post-traductionnelles

Cette prédiction a été réalisée avec les outils bioinformatiques SIB du portail de ressources en bioinformatique Expasy (www.expasy.org). La sumoylation a ensuite été évaluée à l'aide de l'outil SUMOplot (<http://www.abgent.com/tool/sumoplot>).

2.10. Préparation des extraits

Des extraits de polarités différentes ont été préparés dans différents solvants dans le but d'extraire un maximum de molécules présentes dans les lyophilisats de microalgues suivant le protocole modifié (Maadane et al., 2015). Cette extraction est effectuée de la même manière dans l'éthanol, un mélange éthanol/eau (V/V) ou dans l'eau distillée. L'extraction dans ce dernier solvant est suivie d'une sonication de 15 min. L'extraction est répétée deux fois pour récupérer le maximum de composé. Le lyophilisat est mis en contact avec le solvant selon le ratio 1g de biomasse lyophilisée pour 100 ml d'éthanol. Le mélange est broyé et bien homogénéisé puis macéré à 4°C, pendant 2 h. L'extraction est réalisée à l'obscurité afin de préserver les pigments photosynthétiques de la photo-oxydation. Après extraction, l'extrait obtenu est séparé des microalgues par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant éthanolique est concentré par évaporation sous un flux d'azote alors que les deux autres extraits sont lyophilisés. Les extraits secs sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.11. *Culture cellulaire*

Les cellules 4T1, A549 et HeLa sont cultivées en flasques à bouchon filtrant dans leur milieu de cultures correspondantes, précédemment mentionnées, et incubées à 37 °C avec 5% de CO₂ et 80% d'humidité.

La détermination de la concentration des cellules est réalisée par comptage *via* la cellule de Malassez. Les cellules sont colorées au bleu de Trypan pour distinguer les cellules mortes apparaissant en bleu.

Dans des plaques à 96 puits, 100 µl de suspension cellulaire à une concentration de 10⁴ cellules/puits sont mis en culture. Après 24 h, le milieu de culture est retiré et les cellules sont incubées en présence de 100 µl d'extraits aux concentrations (1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,2 ; 0,1, 0,05 mg extrait/ml). Les extraits aqueux sont dilués dans le milieu de culture cellulaire aux différentes dilutions. Ceux à l'éthanol et mélange éthanol/eau sont préalablement solubilisés dans du DMSO en raison de leur caractère insoluble dans le milieu de culture. La teneur en DMSO dans les solutions à tester est de 2%.

Après 24 et 48 h, le nombre de cellules viables a été déterminé. Comme contrôle négatif, les cellules sont incubées soit en présence du milieu de culture uniquement (pour les extraits aqueux) soit du milieu contenant 2% de DMSO (pour les extraits éthanoliques et mélange éthanol/eau). Les contrôles négatifs et chaque concentration sont testés en triplicata.

2.12. *Test XTT : test de viabilité*

L'activité antiproliférative des extraits est déterminée par l'utilisation du kit XTT (Cell Proliferation Kit II, Roche). Ce test repose sur la propriété des cellules vivantes à réduire le sel de tetrazolium XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) en un dérivé du formazan de couleur orange par des déshydrogénases mitochondriales. L'intensité de la coloration est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes. En effet, après incubation des cellules avec les extraits pendant 24 ou 48 h, les puits sont lavés 2 fois au PBS et 100 µl de mélange réactionnel de XTT (0,1 ml du réactif d'activation avec 5 ml du réactif XTT dilué 3 fois dans le milieu de culture) sont rajoutés. Après 3 h d'incubation, l'absorbance est mesurée pour chaque puits à une longueur d'onde de 450 nm en utilisant un lecteur de microplaques multilabel (VICTOR 3V Perkin Elmer). Les

mesures sont faites contre un blanc qui est le mélange XTT sans les cellules. Les pourcentages de viabilité sont calculés suivant l'Eq.4 :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{moyenne d'absorption des cellules en présence d'une concentration donnée d'extrait}}{\text{moyenne d'absorption à 450 nm du controle négatif}} \times 100 \quad (4)$$

2.13. Dosage de la Lactate Déshydrogénase : test de cytotoxicité

La lactate-déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique, exprimée de façon omniprésente dans le cytoplasme, catalysant l'oxydation réversible du lactate en pyruvate. Son relargage dans le milieu de culture signifie une perte de l'intégrité membranaire suite à une lésion ou une lyse cellulaire d'où le dosage de son activité dans le surnageant permet de déterminer la cytotoxicité de l'extrait. Le test est plutôt un dosage colorimétrique indirect où la quantité de formazan formée est proportionnelle à celle du LDH relarguée (soit le nombre de cellules lysées). En effet, le sel de tetrazolium est réduit en formazan orange par le NADH produite suite à la réduction du NAD. Cette dernière est synthétisée lors de la déshydrogénation du lactate en pyruvate par La LDH libérée dans le milieu (Chan et al., 2013).

Le dosage de cytotoxicité est fait en utilisant un kit non radioactive CytoTox 96® (Promega, Madison, WI, USA). 1×10^4 cellules / puits sont cultivées sur une plaque à 96 puits. Après 24 h de traitement avec des extraits aqueux de DSC et DSS à (0,75 ; 0,5 ; 0,2 ; 0,1 et 0,05 mg / ml), les surnageants ont été recueillis et les cellules adhérentes aux puits sont lavées avec du PBS et lysées par incubation pendant 45 min à 37°C avec une solution de lyse cellulaire. 50 ul de mélange de substrats ont été ajoutés aux 50 ul de surnageant et au 50 ul de lysat cellulaire puis incubé pendant 30 min à température ambiante avec une protection contre la lumière. L'absorbance est lue à 490 nm moyennant le lecteur de microplaques multilabel (VICTOR 3V Perkin Elmer) après arrêt de la réaction par la solution stop. Le milieu de culture et l'extrait sans cellules ont été utilisés comme témoins négatifs. La LDH totale a été calculée comme la somme des LDH libérées dans le surnageant et celui dans le lysat cellulaire. Ce test a permis de calculer le pourcentage de cytotoxicité par l'équation suivante (Eq.5) :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{LDH libéré (DO}_{490})}{\text{LDH totale (DO}_{490})} \times 100 \quad (5)$$

2.14. Test au Cristal violet

Cristal violet (ou violet de gentiane) colore les cellules qui restent adhérentes aux puits par liaison à leurs protéines et ADN étant donné que celles mortes se détachent du puits (Feoktistova et al., 2016). Cette caractéristique permet ainsi une quantification indirecte de la mort cellulaire.

Les cellules 4T1 sontensemencées à 1×10^5 cellules/ puits dans une plaque à 24 puits. 24 h après l'ensemencement, les extraits sont ajoutés pour un traitement de 48 h. Les cellules sont par la suite lavées deux fois au PBS, fixées au méthanol froid pendant 10 min, relavées au PBS 2 fois puis colorées au cristal violet (0,5% w/v préparé dans 25% méthanol) pendant 10 min à température ambiante. Les puits sont lavés jusqu'à décoloration complète du surnageant.

2.15. Dosage des ROS

La détection des radicaux libres intracellulaires (ROS : reactive oxygen species) a été faite moyennant la sonde Dihydrorhodamine 123 (Sigma Aldrich, France). La présence des ROS oxyde la sonde en son dérivé fluorescent rhodamine 123 en présence d'un catalyseur (peroxydase ...). Les cellules 4T1 sontensemencées dans la plaque 96 à raison de 10^4 cellules/ puits. Après traitement des cellules par les extraits aqueux de DSS et DSC, les puits sont rincés 2 fois au PBS puis 100 μ l de la sonde diluée dans le milieu de culture à une concentration finale de 10 μ M sont rajoutés à chaque puits. Une incubation de 45 min à 37 °C à l'obscurité précède la lecture de la plaque au Victor. La fluorescence de cellules non-traitées est soustraite de celle de cellules traitées. Des essais d'optimiser ce protocole ont été effectués en utilisant comme contrôle positif un traitement au H₂O₂ ou à l'UV et en récoltant les cellules et les analysant par cytométrie.

2.16. Evaluation de l'apoptose par le kit Annexine V/PI

Pour la détection d'apoptose, le kit Annexine V/PI (ABD Serotec Bio-Rad) a été utilisé. Il est basé sur le principe que les cellules qui entrent en apoptose, exposent à leur surface les phosphatidylsérines qui se lient ainsi à l'annexine V. Pour ce test, l'incubation des cellules avec le formaldéhyde 3% pendant 30 min dans la glace est utilisée comme contrôle positif. Les cellules sontensemencées dans les plaques 24 puits à raison de 2.10^5

cellules/puits. Après traitement aux extraits aqueux pendant différents temps d'incubation, les cellules sont lavées 2 fois au PBS et récoltées à la trypsine. Les cellules sont resuspendues dans le tampon de liaison (1x) de manière à obtenir environ $2-5 \cdot 10^5$ cellules/ml. 5 μ l d'Annexine V-FITC sont rajoutés à 195 μ L de la suspension cellulaire dans un tube FACS. Une incubation pendant 10 min à température ambiante dans le noir a eu lieu. Les cellules sont récupérées et resuspendues dans 190 μ l de tampon de liaison (1x). L'ajout de 10 μ l d'Iodure de Propidium (PI) se fait au dernier instant avant l'analyse en cytométrie.

2.17. Mesure de la fluorescence

La détermination des spectres de fluorescences des deux extraits aqueux a été faite moyennant le fluorimètre (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer) à une longueur d'excitation à 488 nm. Les extraits ont été solubilisés dans du PBS.

2.18. Microscopie à épifluorescence

Pour détecter la fluorescence des extraits au niveau des cellules 4T1, des observations à la microscopie en épifluorescence ont été effectuées. Ce microscope contient un jeu de filtres d'excitation permettant de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission (ou d'arrêt) pour sélectionner les radiations émises par l'objet excité permettant ainsi de visualiser la fluorescence primaire (autofluorescence) ou secondaire. De plus, la lumière arrive à l'objet par le haut d'où l'appellation «épi ».

En effet, 1×10^5 cellules/puits ont été cultivées dans une plaque 24 puits. Après 24 h, les cellules sont traitées aux extraits DSC et DSS pendant 6 h. Avant observations, les cellules sont bien lavées au PBS. Le microscope est utilisé par excitation à 534 nm et émission à 593 nm TRITC couplé à une caméra AxioCam MRm.

2.19. Microscopie confocale

Pour mieux visualiser la localisation de ces extraits au niveau de la cellule, on a eu recours à la microscopie confocale qui donne accès à la récolte des informations à l'intérieur de la cellule. L'avantage de ce microscope c'est qu'il permet d'atteindre une meilleure résolution, de réaliser des images en trois dimensions de l'objet et de réaliser des coupes optiques d'épaisseur inférieure à 0,8 μ m à l'aide d'un diaphragme.

Pour cet égard, les cellules 4T1 ont étéensemencées à raison de 1×10^5 cellules/ puits dans une plaque 24 puits contenant des lamelles de verre. Après 24 h, les cellules ont été traitées avec les extraits DSC et DSS pendant 2 et 6 h puis lavées deux fois au PBS. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 20 min. Ensuite, les lamelles sont montées sur des lames en utilisant le milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories, USA). Les observations sont réalisées en utilisant un système de balayage LSM 510 META couplé à un microscope Axiovert 200 (Carl Zeiss, Allemagne) comme décrites par (Simion et al., 2017).

2.20. *Le test TUNEL*

Dans le but de déterminer le mode de la mort cellulaire induite par les extraits aqueux, la technique colorimétrique TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling) a été adoptée en utilisant le kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega, USA). Ce kit repose sur la propriété des nucléotides biotinylés à s'incorporer moyennant l'enzyme Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, (rTdT) aux extrémités 3'-OH au niveau des ruptures d'ADN double brin générées lors de l'apoptose. La streptavidine marquée à la peroxydase de raifort (Streptavidine HRP) est ensuite liée à ces nucléotides biotinylés et sont détectés en utilisant le substrat peroxydase, le peroxyde d'hydrogène et la diaminobenzidine (DAB). Les noyaux apoptotiques sont ainsi colorés en brun foncé. Quelques modifications ont été apportées aux instructions du kit à savoir un marquage effectué directement sur plaque 48 puits. Pour ce test, il est recommandé d'utiliser le traitement à la DNase I (Sigma, US) à 10U pendant 20 min comme contrôle positif. Quant au témoin négatif, il est obtenu par retrait de l'enzyme TdT terminale du mélange réactionnel TUNEL. Brièvement, $5,10^4$ cellules / puits ont étéensemencées sur une plaque à 48 puits. Après traitement avec les extraits à 0,5 et 0,2 mg / ml, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 20 min à température ambiante (TA). Les cellules ont été ensuite perméabilisées avec 0,02% de Triton X-100 pendant 5 min à TA. Après étalonnage avec le tampon d'équilibrage, elles ont été traitées avec le mélange réactionnel rTdT pendant 1 h à 37 °C dans une chambre humidifiée. Le tampon SSC 1x a été appliqué pendant 15 min avant d'éteindre la peroxydase endogène avec 0,3% de H₂O₂. Les puits ont été incubés avec de la streptavidine HRP pendant 30 min à TA. La couleur se développe suite à l'ajout du substrat DAB, le chromogène DAB et le peroxyde d'hydrogène. Finalement, les puits ont été lavés avec de l'eau déionisée et contre-colorés à

l'hématoxyline. Les observations microscopiques sont faites au microscope (Nikon Diaphot 300).

2.21. Fragmentation de l'ADN

L'ADN génomique des cellules apoptotiques se présente sous forme d'échelle sur gel d'agarose. Afin de pouvoir le visualiser, une étape d'extraction a été faite selon le protocole modifié de (Long et al., 1989). Brièvement, 1×10^6 cellules / puits ont été cultivées dans une plaque à 6 puits. Après 48 h de traitement, les cellules sont lysées grâce au tampon de lyse contenant EDTA 20 mM ; Tris HCl à 50 mM et pH 7,4 ; saccharose 400 mM. 100 μ l de SDS à 10% sont ajoutés et le mélange est incubé à 65 °C pendant 30 min. Ensuite, Il est mélangé avec de l'acétate de potassium 5 M et maintenu dans la glace pendant 60 min. Après centrifugation à 14 000 x g pendant 10 min à 4 °C, le surnageant est recueilli. Un volume d'éthanol absolu froid est ajouté et le mélange est ensuite stocké pendant une nuit à -20 °C. Après centrifugation à 13 000 tr / min pendant 30 min à 4 °C, l'ADN est lavé une fois avec de l'éthanol à 70% et redissous dans du tampon TE contenant 1 μ g / ml de RNase A. Le mélange est incubé à 65 °C pendant 10 min, puis à 37 °C pendant 30 min. Après incubation, un volume égal de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25: 24: 1, v / v) est ajouté. La phase aqueuse a été séparée par centrifugation à 12000 x g pendant 5 min, transférée dans un nouveau tube et précipitée avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M avant de précipiter avec 2,5 volumes d'éthanol absolu froid à TA pendant 5 min. L'ADN est concentré à 13 000 tr / min pendant 15 min à 4 °C. Le culot a été lavé une fois avec de l'éthanol à 70%, séché et redissous dans du tampon TE.

L'ADN est migré sur un gel d'agarose 1,5% à 25 V, documenté et comparé au témoin positif qui consiste au traitement des cellules pendant 18h avec la staurosporine à 10 μ M. L'ADN des cellules non traitées a été pris comme témoin négatif.

2.22. Transfert des protéines sur membrane (Western blot)

2.22.1. Extraction des protéines totales

L'apoptose se passe à travers diverses voies et une multitude de protéines. Pour cela, une extraction de protéines totales a été réalisée suivie d'un transfert sur membrane. En effet, les cellules sontensemencées à raison de 10^5 cellules/puits dans un flasque 24 puits pendant 24 h. Les cellules sont mises en contacts avec les extraits de DSC et DSS à la concentration

0,5 mg/ml pendant 2, 4, 6, 8 et 12h puis lavées deux fois avec du PBS froids avant d'être lysées au tampon de précipitation radioimmune (RIPA) contenant 1% de cocktail inhibiteur de protéase et 1% de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle). Les cellules récupérées sont vortexées pendant 3 min puis incubées 30 min dans la glace. Les protéines ont été récupérées par la suite par centrifugation à 12500 rpm pendant 10 min à 4 °C. Ce surnageant a été aliquoté pour éviter les congélations/décongélation des protéines.

2.22.2. *Dosage des protéines*

Ce dosage est fait en utilisant le kit BC Assay: Protein Assay Kit (intrechim, France). La quantification des protéines présentes dans les lysats cellulaires a été effectuée moyennant un courbe étalon établi en utilisant des concentrations connues de serum albumine bovine (BSA).

2.22.3. *Western Blot*

Approximativement 20 µg de protéines totales ont été migrés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Suivant le poids moléculaire de la protéine cherchée deux types de gel ont été préparés : Un premier gel à 10% pour détecter PARP-1 (116 et 89 KDa) et Caspase-9 (37 KDa) et un gel à 14% pour détecter Caspase-3 (17 KDa). Le premier gel a été migré à 150V alors que le deuxième à 100 V pendant 3 h. Les protéines ont été chauffées 10 min à 95°C en présence du tampon de Laemmli comme dénaturant. Après migration, les protéines sont électrotransférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) par Trans-Blot® Système de transfert Turbo™ (Biorad) (15 min, 25 V). Après saturation avec du lait écrémé à 5% dans du TBS-T (solution saline tamponnée Tris, 0,05% Tween 20) pendant 1 h à température ambiante, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires (β-actine (ab1801) (1: 5000), PARP-1 (# 9542), caspase-3 (# 6992) caspase-9 (# 9504)) pendant une nuit à 4 °C. Les anticorps ont été utilisés à une concentration de 1:1000 selon les recommandations du fournisseur Cell Signaling Technology. La membrane a été par la suite incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Enzo life sciences). Après chaque incubation, les membranes ont été lavées trois fois pendant 10 min avec du TBST. Les bandes de protéines ont été visualisées en utilisant la chimiluminescence ECL (Bio-Rad) et révélées à l'imageur de gels Syngene Pxi (Ozyme) contrôlé par le logiciel d'acquisition GeneSys. Les bandes de protéines ont été

quantifiées en utilisant le logiciel image j. L'intensité des bandes a été normalisée par rapport à la β -actine.

2.23. *Test in vivo*

Cette partie a été réalisée avec l'assistance de M. Rudy Clemençon (Technicien animalier) et du Dr. Patrick Baril. Elle a été effectuée dans le but de valider les activités anticancéreuses observées *in vitro* sur les cellules 4T1. Le protocole a été soumis au comité d'éthique locale et a reçu un agrément autorisant l'expérience. (Loi87848-Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale, Campus d'Orléans, France, CECCO 03, dossier n°1043).

L'expérience est réalisée au CBM sur des souris femelles Balb/c. Le choix de cette espèce revient :i) d'une part au fait que les cellules 4T1 soient de même fonds génétique que les souris BABL/C ce qui nous assure que la greffe des cellules serait opérationnelle ii) D'autre part parce que les cellules tumorales 4T1 développent suite à la prise de la greffe des tumeurs primaires solides. Ces derniers sont capables ensuite de coloniser spontanément les poumons des animaux pour y développer des métastases. Par conséquent, ce modèle murin mine au plus la situation post-clinique et constitue un modèle privilégié pour évaluer l'effet de traitement anticancéreux contre le cancer du sein. Les extraits ont été administrés aux souris par injection intratumorale. L'administration des extraits de *Dunaliella* par cette voie n'a pas été décrite auparavant sachant que cette voie offre plusieurs avantages tels que l'augmentation des concentrations intratumorales des médicaments, l'amélioration de l'effet antitumoral et la diminution de la toxicité systémique.

Les souris ont été hébergées à l'animalerie du CBM (accreditation n° D-45-234-12, Chantal Pichon). Comme une période d'adaptation d'une semaine avant les expérimentations, la température de la salle a été fixée à 22 °C et avec une phase nyctémérale (12/12 h). Les souris ont été épilées 2 jours avant les injections des cellules. Après anesthésie par l'isoflurane, les souris ont reçu $5 \cdot 10^5$ cellules 4T1 dans un volume total de 50 μ l par injection sous-cutanée dans la glande mammaire. 10 jours après implantation, le développement d'une tumeur primaire a eu lieu d'où le début de traitement. Ainsi, les extraits aqueux de DSC et DSS ont été administrés aux souris anesthésiées par injection intra-tumorale aux doses de 2,5 et 5 mg/kg de souris. Etant donné que les extraits soient dilués dans du PBS, le groupe de témoin négatif a reçu 50 μ l de PBS par injection. Par la suite, les traitements ont été effectués aux jours 10, 18, 21 et 24 post-implantation. La croissance des tumeurs a été suivie par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats des volumes mesurés à

chaque fois sont normalisés par rapport au volume de la tumeur au jour 0 (qui correspond au J10 post-implantation) de traitement moyennant la formule (6) exprimant le volume relatif des tumeurs (RTV). Les souris ont été également suivies par observation individuelle et pesées au cours de l'expérimentation. Les animaux ont été mis à mort par élongation cervicale en fin de protocole.

$$RTV = \frac{\text{volume tumoral au jour } n}{\text{volume tumoral au jour } 0} \times 100 \quad (6)$$

2.23.1. Analyse des TIL

15 jours après le début du traitement, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été récupérées. Une partie a servi pour l'analyse des lymphocytes infiltrés dans la tumeur (TIL) et dans la rate puisqu'elle est considérée comme un organe lymphoïde secondaire. Les organes ont été récupérés dans du PBS, immédiatement découpées en des petits morceaux (3-4 mm) et centrifugés à 350xg pendant 10 min. Le culot obtenu est par la suite suspendu dans la collagénase I (Gibco) à une concentration de 1 mg/ml avec ajout de CaCl₂ à 3 mM et incubé pendant 1 h à 37 °C avec agitation. La suspension est filtrée et lavée au PBS. Les cellules sont ensuite incubées 1 h à TA à l'obscurité avec la solution de marquage contenant les Ac dilués au 1/100 dans du BSA 1%. Le tableau 9 présente la liste des Ac utilisés. Avant d'analyser les cellules au FACS, elles ont été refiltrées et resuspendus dans du PBS. En parallèle, une solution d'isotype contenant des Ac « non spécifiques aux cellules de souris » avec le fluorochrome a été préparée. Le paramétrage du FACS est fait moyennant des Multicolor CompBeads (BD Bioscience, France).

Tableau 9. Liste des anticorps utilisés pour la détection des TILs

anticorps	fluorochrome	Clone	Type de cellules marquées	Reference BD Pharmingen
CD45	APC	A20	Tous les lymphocytes	558701
CD3	PerCP/Cy5.5	145-2C11	LT	551163
CD8	BV510	341	LT	742916
CD4	BV650	RM4-5	LT	563747
CD19	PE-Texas Red	1D3	LB	562329

NK1.1	BV605	PK136	NK	563220
F4/80	BV421	T45-2342	Granulocyte, macrophage	565411
CD11c	BV711	HL3	DC, CD4-CD+IEL, quelque NK et macrophage	563048
CMHII	PE/Cy7	L243	CMHII	335830
CD80	FITC	16-10A1	DC, monocyte, macrophage péritonéal	553768
CD107a	BV786	1D4B	Marqueur de NK, T CD8+, quelque cellule tumorale maligne	564349
Gr-1	APC-Cy TM 7	RB6-8C5	Granyloocyte, monocyte	557661

IEL : intestinal intraepithelial lymphocytes

2.23.2. Extraction des ARN totaux et qPCR

Une seconde partie de tumeurs a servi pour analyser les changements d'expressions de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Les organes sont récupérés et conservés dans du RNA later (RNAlaterTM Stabilization Solution, Invitrogen) jusqu'à utilisation. Les tissus sont découpés en des petits morceaux dans le TRIzol® (Invitrogen), incubés 10 min à -80°C avant d'être broyés au Precelyss 24 (Precelyss, Bertin, France) en utilisant le programme 5500 vibrations, 3 cycles de 30 secondes chacun. Le surnageant est transféré dans des tubes 2 ml pour enlever les billes. La suite de l'extraction est procédée comme décrit dans le paragraphe (2.7.) avec un petit changement, le lavage au tampon RPE est répété 2 fois. 1 µg de l'ARN_t obtenu a été utilisé pour la synthèse d'ADNc en utilisant le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific).

La qPCR a été réalisée à l'aide de TB GreenTM Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (Takara) conformément au protocole du fabricant en utilisant la machine Applied biosystem StepOnePlusTM. Les paramètres pris en considération sont les suivants : une dénaturation initiale (activation) à 95 °C pendant 30 s suivie de 40 cycles à 95 °C pendant 5 s et 60 °C pendant 30 s. Une étape de fusion par chauffage à 95 °C suivie de refroidissement à 60 °C, a été aussi programmée pour vérifier la spécificité de chaque paire d'amorces. La présence de pic unique à la température de fusion calculée au niveau de la courbe de fusion confirme la spécificité de l'amplicon obtenu. Les amorces utilisées sont citées dans le tableau 10. La quantification relative a été calculée à l'aide de l'équation donnée par Pfaffl (Pfaffl, 2001) par normalisation au tumeur non traitée et en utilisant comme gène de référence GAPDH.

Tableau 10. Liste des amorces utilisées dans la caractérisation de la réponse immunitaire des souris

Gènes (mouse)	Amorces (5'→3')	amplicon (bp)	Références
<i>COX-2/PTGS2</i>	F: TGAGTACCGCAAACGCTTCT R:CTCCCCAAAGATAGCATCTGG	169	Rong et al, 2016
<i>NOS-2</i>	F: CCAAGCCCTCACCTACTTCC R:CTCTGAGGGCTGACACAAGG	127	
<i>Arginase-1</i>	F: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG R: AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	185	
<i>GAPDH</i>	F :TCTCCCTCACAATTTCCATCCCAG R :GGGTGCAGCGAACTTTATTGATGG	--	(Lai et al., 2018)

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Réponse de *Dunaliella* sp. à la condition de caroténogénèse au niveau transcriptionnel

1. Optimisation des conditions de cultures de *Dunaliella* sp. pour une sur-production de caroténoïdes

Dans le but d'une sur-production de caroténoïdes par la souche nouvellement isolée, une optimisation des conditions de culture a été faite moyennant la méthode de surface de réponse (RSM) selon la conception de Box-Behnken à trois facteurs et trois niveaux.

1.1. Estimation du modèle

Un modèle polynomial quadratique est construit pour analyser la relation entre la réponse (concentration en caroténoïdes) et les trois facteurs choisis (salinité, luminosité et disponibilité en azote). Les résultats ont été ajustés par régression linéaire dans le modèle des unités codées en utilisant le logiciel STATISTICA (Eq. 7). Le modèle prend en compte l'effet simple et double de chaque facteur, ainsi que l'interaction entre les différents facteurs.

$$\hat{Y} = 10.053 - 7.141 \cdot X_1 + 2.905 \cdot X_2 + 1.309 \cdot X_3 - 2.355 \cdot X_1^2 - 1.193 \cdot X_2^2 + 0.820 \cdot X_3^2 - 2.350 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.682 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0.875 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (7)$$

\hat{Y} est la réponse prévue: caroténoïdes ($\mu\text{g/ml}$), X_1 la salinité (M), X_2 intensité lumineuse ($\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et X_3 disponibilité d'azote (mM).

Le modèle établi a montré que la variation de la salinité (X_1) dans le domaine 2 - 5 M, ait la plus grande influence sur les niveaux de production de caroténoïdes ($p < 0,001$). L'intensité lumineuse (X_2) a un effet modérément significatif ($p < 0,01$). La disponibilité d'azote (X_3), les effets quadratiques de la salinité (X_1^2) et l'interaction entre la salinité et l'intensité lumineuse (X_{12}) présentent un effet marginalement significatif sur la réponse ($p < 0,05$) (tableau 11). Cependant l'effet quadratique de la luminosité (X_2^2) et de l'azote (X_3^2), l'interaction entre la salinité et l'azote (X_{13}), et l'interaction entre la lumière et l'azote (X_{23}) ont été considérés comme des facteurs non significatifs ($p > 0,05$).

Ces facteurs sont représentés dans l'ordre décroissant de leur influence sur la réponse dans le diagramme de Pareto et le diagramme normal (figure 9).

Tableau 11. Coefficients estimatifs et statiques de l'optimisation des caroténoïdes : Tableau de Student ; les facteurs significatifs sont présentés en gras ;
 (p <0,001) Très significatif; (p <0,01) modérément significatif; (p <0,05) marginalement significatif; L: terme linéaire; Q: terme quadratique;

Facteur	Coeff. de Régression	Err. Std.	t.exp	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Moy/Interc.	10,05	0,81	12,40	0,000060	7,97	12,14
(1) Salinité (L)	-7,14	0,50	-14,38	0,000029	-8,42	-5,87
Salinité (Q)	-2,36	0,73	-3,22	0,023357	-4,23	-0,48
(2) Lumière (L)	2,91	0,50	5,85	0,002062	1,63	4,18
Lumière (Q)	-1,19	0,73	-1,63	0,163420	-3,07	0,69
(3) Azote (L)	1,31	0,50	2,64	0,046146	0,03	2,58
Azote (Q)	0,82	0,73	1,12	0,312886	-1,06	2,70
1L by 2L	-2,35	0,70	-3,35	0,020371	-4,15	-0,54
1L by 3L	-0,68	0,70	-0,97	0,375525	-2,49	1,12
2L by 3L	0,88	0,70	1,25	0,267751	-0,93	2,68

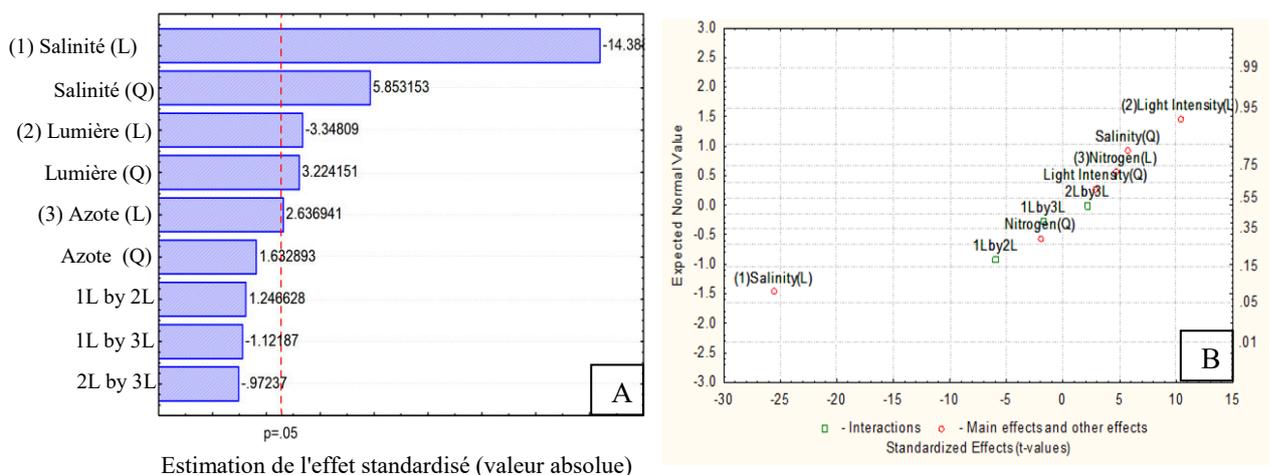


Figure 9. Ordre d'influence des facteurs testés et leurs interaction sur la réponse, (A) Diagramme de Pareto d'estimation de l'effet normalisé ; (B) Diagramme normal

1.2. Analyse statistique et validation du modèle

L'analyse statistique basée sur ANOVA du modèle proposé est présentée dans le tableau 12. La somme des carrés de régression est statistiquement significative au niveau de l'intervalle de confiance à 95%. Le manque d'ajustement « lack of fit » n'est pas significatif ($p > 0,05$). La somme des carrés due à l'erreur est très faible comparée à l'erreur total. Cela indique que le modèle de conception corrèle bien avec les données expérimentales.

La qualité de l'ajustement du modèle a été évaluée en utilisant le coefficient de détermination R^2 et le coefficient de détermination ajusté $R^2_{\text{ajusté}}$. La valeur R^2 est de 0,982. Elle est si proche de 1 signifiant que 98,224% de la variabilité de la réponse pourrait être expliqué par le modèle. De plus, la valeur de $R^2_{\text{ajusté}} = 95,026\%$ s'avère également élevée, confirmant le bon accord entre les données expérimentales et les données prédites.

Tableau 12. Analyse de variance (ANOVA) de l'optimisation des caroténoïdes chez *Dunaliella*

Source	DF	SS	MS	F	P
(1) Salinité (L)	1	407,98	407,98	652,52	0,001529
Salinité (Q)	1	20,48	20,48	32,76	0,029192
(2) L. Lumière (L)	1	67,51	67,51	107,98	0,009134
L. Lumière (Q)	1	5,25	5,25	8,40	0,101244
(3) Azote (L)	1	13,70	13,70	21,92	0,042726
Azote (Q)	1	2,48	2,48	3,97	0,184639
1L by 2L	1	22,09	22,09	35,33	0,027156
1L by 3L	1	1,86	1,86	2,98	0,226438
2L by 3L	1	3,06	3,06	4,90	0,157345
Manque d'ajustement	3	8,60	2,87	4,59	0,184192
Erreur Pure	2	1,25	0,63		
SS Totale	14	554,65			

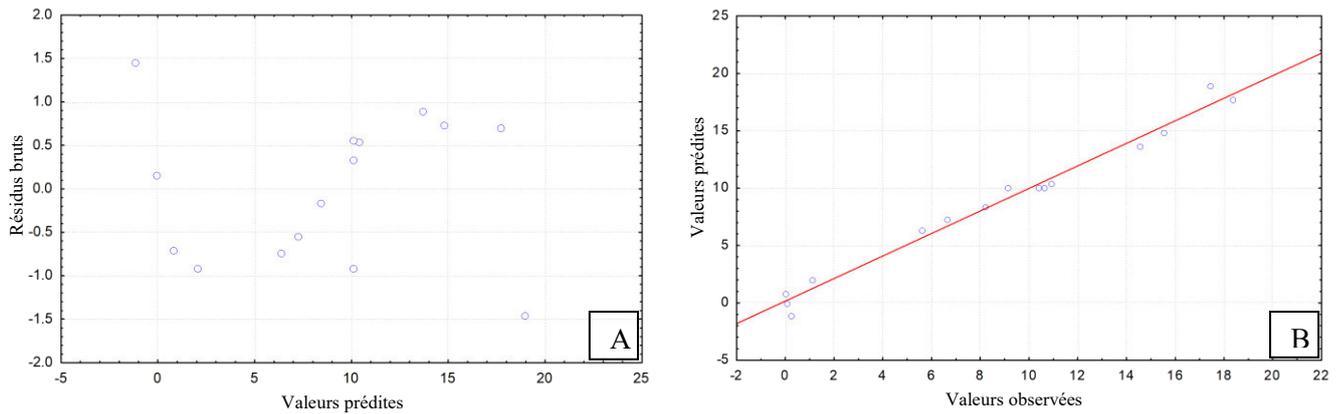


Figure 10. Les résidus bruts vs les valeurs prédites (A); Les valeurs prédites vs les valeurs observées (B)

La figure 10A montre les valeurs résiduelles en termes de celles ajustées. Ce diagramme convient à la détection de mesures aberrantes et à la visualisation de la bonne répartition des résidus. Dans notre cas, il ne montre aucune structure bien définie et aucune mesure aberrante.

Le diagramme de dispersion représentant les valeurs prédites par rapport aux valeurs observées de production de caroténoïdes (figure 10B) a l'apparence d'une droite permettant de considérer le modèle utilisé comme acceptable et bien ajusté.

1.3. Interprétation du modèle de surface de réponse

La figure 11 montre les profils bidimensionnels et tridimensionnels du modèle présentant les interactions entre divers facteurs sur la production de caroténoïdes. Les facteurs sont pris par paires, le troisième facteur est fixé à son niveau zéro. L'effet d'interaction de la salinité et la disponibilité en azote sur la quantité de caroténoïdes chez *Dunaliella* sp est présenté par la figure 11A. De ces résultats, il en ressort que la diminution de la salinité et l'augmentation de la quantité d'azote augmentent la réponse cherchée. La quantité de caroténoïdes augmente également par élévation de la luminosité (Figure 11B). D'après la figure 11C, une maximisation de la production de caroténoïdes est atteinte lorsque la luminosité s'approche de son niveau +1 et la salinité de son niveau -1.

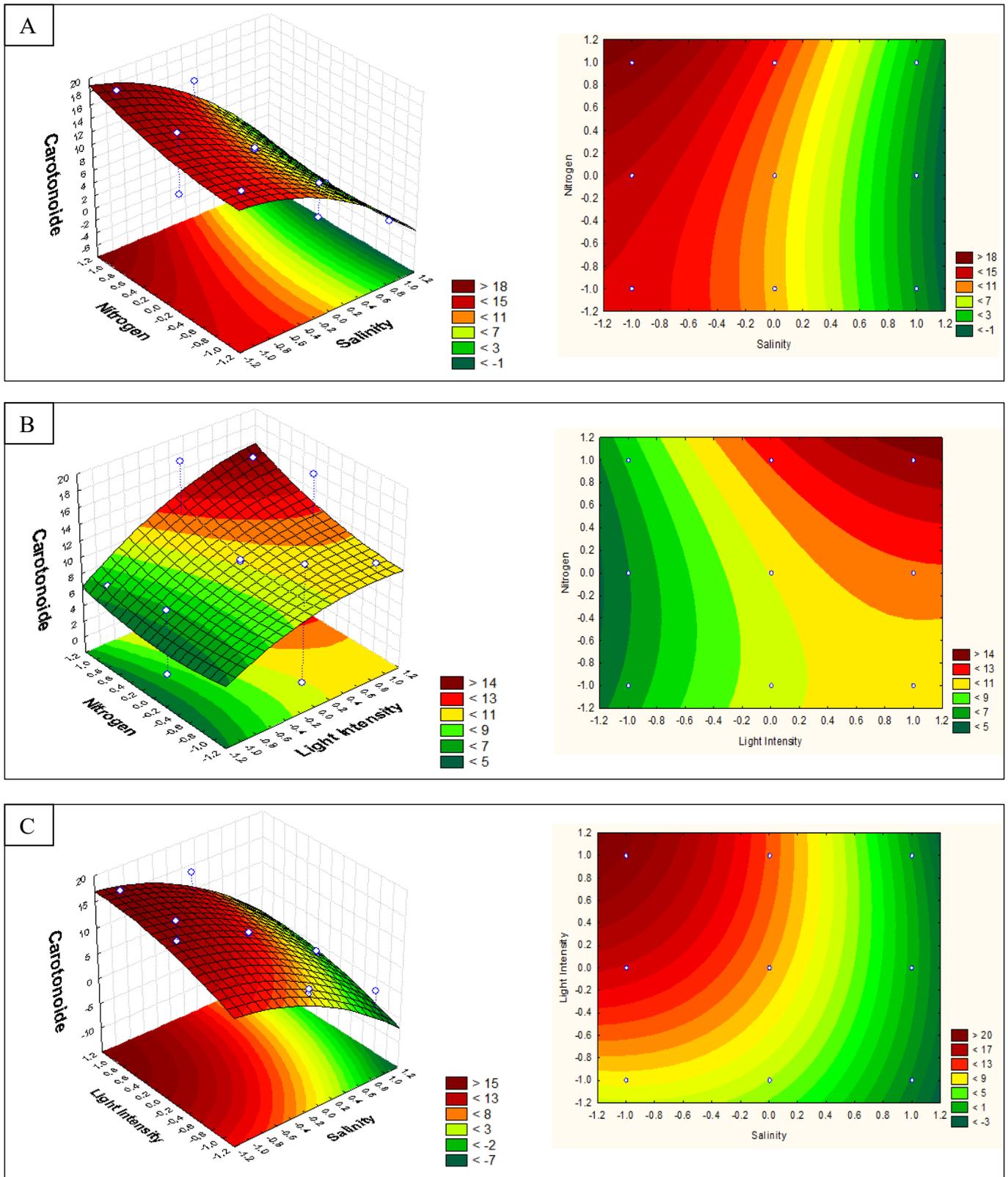


Figure 11. Tracés de contour et tracé de surface de réponse 3D correspondant aux effets des divers facteurs sur la production de caroténoïdes chez *Dunaliella sp*: (A) réponse par rapport à l'azote et la salinité avec intensité lumineuse fixée à son niveau 0, (B) réponse contre azote et intensité lumineuse, la salinité a été fixée à son niveau 0 (C) réponse par rapport à la variation de la salinité et à de l'intensité lumineuse tout en maintenant le niveau d'azote à 0

Le tracé des moyennes marginales (figure 12) montre la manière d'évolution de chaque facteur dans le modèle étudié. La réponse diminue lorsque la salinité augmente de -1 à +1 alors qu'elle augmente en augmentant l'intensité lumineuse de -1 à +1. Pour la concentration de NaNO_3 , les quantités de caroténoïdes ne semblent pas être affectées par l'augmentation de l'azote de -1 à 0, mais elles commencent à augmenter au-delà du niveau 0.

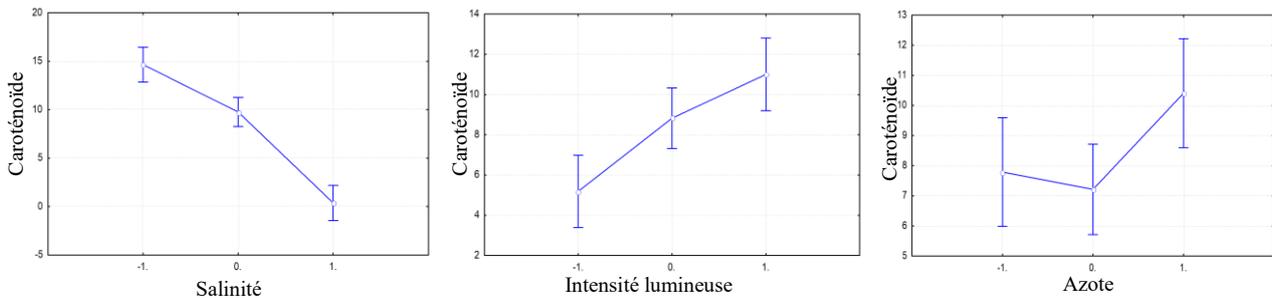


Figure 12. Tracé des moyennes marginales et des limites de confiance à une erreur de 5%

1.4. Condition optimale

La condition optimale pour la production de caroténoïdes à partir de *Dunaliella* sp est déterminée par le logiciel STATISTICA. Elle a été fixée à 2 M de salinité (NaCl), $540 \mu\text{mol photon. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et 1 mM d'azote (NaNO_3).

1.5. Validation du modèle

Pour valider ce modèle, *Dunaliella* a été cultivée dans les conditions ainsi déterminées. Les résultats ont montré que la concentration expérimentale en caroténoïdes à la phase exponentielle est égale à $25,46 \mu\text{g/ml}$, contre $19,53 \mu\text{g/ml}$, valeur prédite par le modèle. Ce résultat indique la bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et celles théoriques et la validité du modèle pour prédire les conditions optimales de caroténogenèse.

1.6. Comparaison de cette condition optimale à la littérature

1.6.1. Effet de salinité

Dans notre étude, la salinité est apparue comme le facteur le plus important en influençant négativement la réponse. L'optimum de la réponse calculé est à de 2 M. En effet, la concentration de NaCl a été variée dans un domaine aussi vaste [2 - 5 M] en partant avec

des pré-cultures préparées dans un milieu à 0,46 M (en NaCl). Cette influence négative pourrait être expliquée par deux raisons : le premier est que l'induction de l'accumulation de caroténoïdes n'a pas nécessité une très haute concentration de NaCl et deuxièmement est que le passage de 0,5 M à 5 M s'avère insupportable par les cellules de *Dunaliella* qui meurent ainsi par choc osmotique (choc par hyper-salinité). Par conséquent, une très faible concentration en caroténoïdes a été enregistrée dans les expériences au seuil +1 (5 M de NaCl). Des études précédentes ont montré que l'utilisation d'une très grande salinité (au-delà de 3 M) n'améliore pas la caroténogénèse et qu'un optimum d'accumulation de ces pigments a été obtenu à 2 M (Ahmed et al., 2017; Farhat et al., 2011; Gómez et al., 2003; Rad et al., 2011). Donc le passage des cultures de 0,46 à 2 M était suffisant pour induire la caroténogénèse. On souligne aussi chez *Dunaliella* sa capacité à croître à des concentrations élevées de sel par rapport à d'autres cellules végétales. Ceci est expliquée par son aptitude à éliminer les ions Na^+ et à maintenir de faibles concentrations de Na^+ internes même à une concentration de NaCl externe de 3 à 4 M. Cette capacité a été attribuée à trois transporteurs Na^+ distincts identifiés dans ses membranes plasmiques. Cette microalgue utilise également un gradient électrochimique de Na^+ via les symporteurs Na^+/Pi et Na^+/SO_4 . De plus, elle recycle les ions Na^+ , au lieu des protons dans les processus de transport (Katz and Avron, 1985; Pick et al., 2006). D'autres études montrent que *D. salina* maintienne la concentration interne de Na^+ faible jusqu'à 1,5 à 2 M seulement mais elle augmente au-delà de ces concentrations (Farhat et al., 2011; Mishra et al., 2008). Pour avoir un meilleur équilibre entre son milieu intérieur et extérieur face à une haute salinité, les cellules de *Dunaliella* accumulent des osmoprotectants comme le glycérol qui contribue au maintien du statut osmotique de la cellule et de l'activité enzymatique dans des conditions de faible activité de l'eau (Oren, 2005). En effet, il a été reporté que *Dunaliella* possède une membrane avec une perméabilité exceptionnellement faible au glycérol (Oren, 2005). Les cellules de *Dunaliella* produisent également dans les conditions de stress salin des Aa, des sucres, des lipides (Ahmed et al., 2017) et des antioxydants. En effet, la concentration des ROS augmente avec l'augmentation rapide de la photosynthèse nécessaire pour la fabrication de plus d'unité de G3P, précurseur du glycérol, déclenchant ainsi l'accumulation de β -carotène (antioxydant) pour se protéger contre les ROS accumulées (Ye et al., 2008).

1.6.2. Effet de l'intensité lumineuse

Suivant le tableau de Student (Tableau 12), l'effet de l'intensité lumineuse est classé comme le deuxième facteur influençant la réponse. Son augmentation au niveau +1 dans notre

plan d'expérience améliore l'accumulation de caroténoïdes. Des études antérieures ont convenu qu'il s'agit du facteur clé dans la photosynthèse et que son élévation augmenterait la production de caroténoïdes (Kim et al., 2013; Wu et al., 2015; Z. Wu et al., 2016). En effet, un stress oxydatif peut avoir lieu quand la quantité de lumière fournie dépasse l'énergie nécessaire par la cellule pour saturer sa photosynthèse. Sous très forte irradiation, la cellule peut être détruite suite à une photoinhibition par l'évolution d'O₂ et une photodestruction des caroténoïdes en commençant par le 9-cis-β-carotène, all-trans-β-carotène et les chlorophylles (Raja et al., 2007). Aussi, cette photoxydation est à l'origine d'un excès de ROS ce qui endommage les PSII et dégrade essentiellement la protéine D1 (Ye et al., 2008). La microalgue sur-accumule ainsi des caroténoïdes vus leur activité antioxydante en plus d'autres molécules antioxydantes (Haghjou et al., 2009) et du glycérol (Xu et al., 2016) lui permettant de maintenir l'efficacité de la photosynthèse. On note que ce mécanisme dépend de la qualité et de la quantité de lumière.

1.6.3. Effet de la concentration d'azote

La déficience en azote améliore l'accumulation de caroténoïdes chez *Dunaliella* (Lamers et al., 2012; Sánchez-Estudillo et al., 2006), ce qui nous a poussé à faire varier la fraction minoritaire de la source d'azote dans le milieu en absence totale de KNO₃ (1g). Le modèle établi après analyse du plan d'expérience montre qu'un maximum de caroténoïdes est obtenu en présence d'une concentration de 1 mM NaNO₃ (niveau +1 de la matrice d'expériences). En effet, ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le taux de caroténoïdes intracellulaires augmente en manque d'azote contre un nombre de cellules qui diminue par manque d'éléments nutritionnels engendrant ainsi une diminution de la quantité générale de caroténoïdes dans la culture. L'azote est un élément clé pour la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) durant les cycles de division (Boussiba and Vonshak, 1991; Chen et al., 2015; Mojaat et al., 2008). La déprivation totale du milieu de culture en azote ne permet le maintien de la viabilité cellulaire que quelques jours grâce aux réserves intracellulaires (Mojaat et al., 2008). Lv et ses collègues montrent dans leur étude que le taux de croissance de *D. salina* en privation d'azote diminue et s'arrête au bout de 3 jours (Lv et al., 2016). En outre, une augmentation d'azote peut améliorer l'accumulation de caroténoïdes et préserver la viabilité des cellules pendant une plus longue période (Wu et al., 2015). Pour satisfaire à ces deux conditions de réserver le plus longtemps la viabilité cellulaire et au même temps augmenter la production de caroténoïdes en créant un

stress oxydatif, il convient d'utiliser une concentration intermédiaire ou minimale en azote, mieux qu'une déprivation totale (Mojaat et al., 2008).

1.7. Caractérisation de *Dunaliella* en fonction des conditions de culture :

1.7.1. Courbes de croissance

La croissance de *Dunaliella* dans la condition de culture dite contrôle ou non stressée (DSC) et dans la condition optimale de caroténogenèse ou stressée (DSS) a été suivie pendant un mois de culture (figure 13). Nous avons remarqué que la souche stressée maintienne le même rythme de croissance que celui de DSC durant les six premiers jours de culture. Par la suite, DSC continue à croître alors que DSS semble arrêter de se diviser. Ceci est peut-être dû à l'épuisement de la source d'azote dans le milieu (la culture est faite en déficience d'azote). Ainsi, la concentration de 1 mM utilisée au début de la culture a permis de maintenir la multiplication des cellules durant environ une semaine.

Des résultats similaires ont également été trouvés par (Sánchez-Estudillo et al., 2006) ayant montré que *D. salina* cultivée sous limitation en azote (absence de KNO_3 et présence de NaNO_3 dans le milieu) conserve le même taux de croissance que celui sous suffisance azotée pendant 8 jours, puis le nombre de cellules diminue de moitié.

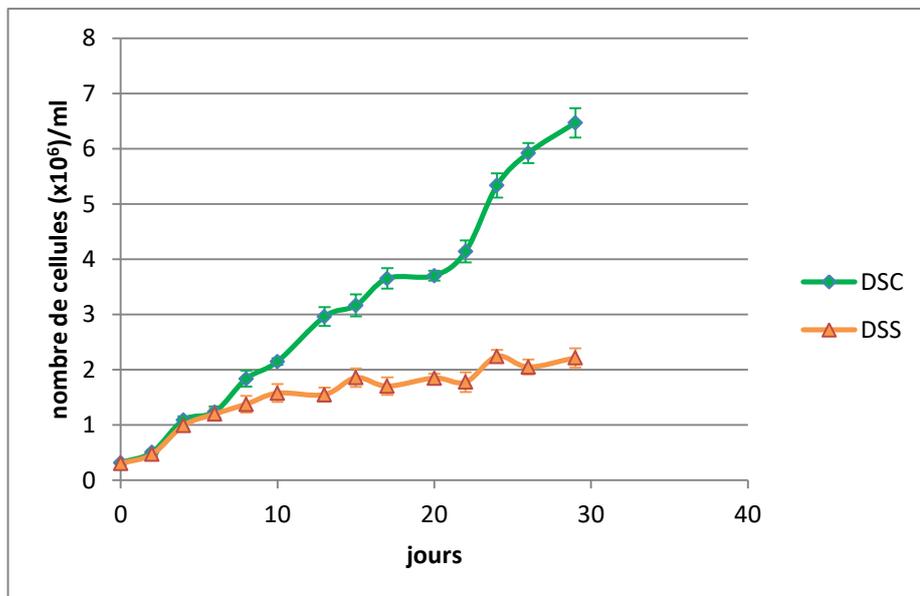


Figure 13. Courbe de croissance de DSC et DSS au bout de 30 jours de culture par comptage cellulaire sur cellule de Malassez

1.7.2. *Suivi de la production de pigments : analyse biochimique*

La production de pigments par DSC et DSS durant un mois de culture a été suivie par dosage biochimique. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ et corrélés (ou normalisés) par rapport au nombre de cellules (pg/cellule).

Pour DSC (figure 14A), il en ressort que les concentrations de chlorophylles et de caroténoïdes augmentent proportionnellement dans la culture pour atteindre au 29^{ème} jour $32,47 \pm 0,66$ et $23,79 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Par contre, ces concentrations varient très légèrement au niveau intracellulaire. Ce résultat signifie que la production de pigments chez DSC soit proportionnelle à l'augmentation du nombre de cellules dans la culture. En d'autres termes, l'augmentation de la concentration en pigments n'est régit que de l'augmentation du nombre de cellules et non pas d'une suraccumulation intracellulaire. Ces deux pigments servent comme antenne collectrice des rayons solaires (source d'énergie) pour la cellule.

En ce qui concerne DSS, le suivi montre que la machinerie de synthèse de pigments est totalement orientée vers l'accumulation de caroténoïdes suite au stress appliqué. La production de chlorophylles aussi bien dans la culture ($\mu\text{g/ml}$) qu'à l'échelle intracellulaire (pg/cellules) est maintenue à un niveau basal pour presque s'annuler à la fin de la culture (figure 14B). Tant qu'à la production de caroténoïdes, elle augmente simultanément dans la culture et à l'échelle intracellulaire. Ceci suggère que la cellule a dû changer son appareil collecteur de lumière en remplaçant la chlorophylle par les caroténoïdes dans le but de se protéger contre les fortes intensités lumineuses et les stress oxydatifs. Lv et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'épuisement nutritionnel sur la production de caroténoïdes et ils ont montré qu'en manque d'azote, cette production a passé d'environ 2 pg/cellule en milieu complet à 9 pg/cellule au jour 15 (Lv et al., 2016).

Les cinétiques de croissance valident les résultats trouvés par le modèle et montrent l'accumulation de caroténoïdes par DSS tout au long de la cinétique par rapport à celle par DSC. Après 17 jours de culture, la quantité de caroténoïdes produite chez DSC est $3,38 \pm 0,33$ contre $17,96 \pm 0,67$ pg/cellule chez DSS, soit cinq fois de plus. Dans ce cas, le rapport caroténoïdes / chlorophylles dans la culture DSS par celui de DSC est d'environ 12 fois pour atteindre 18 à la fin de la phase exponentielle.

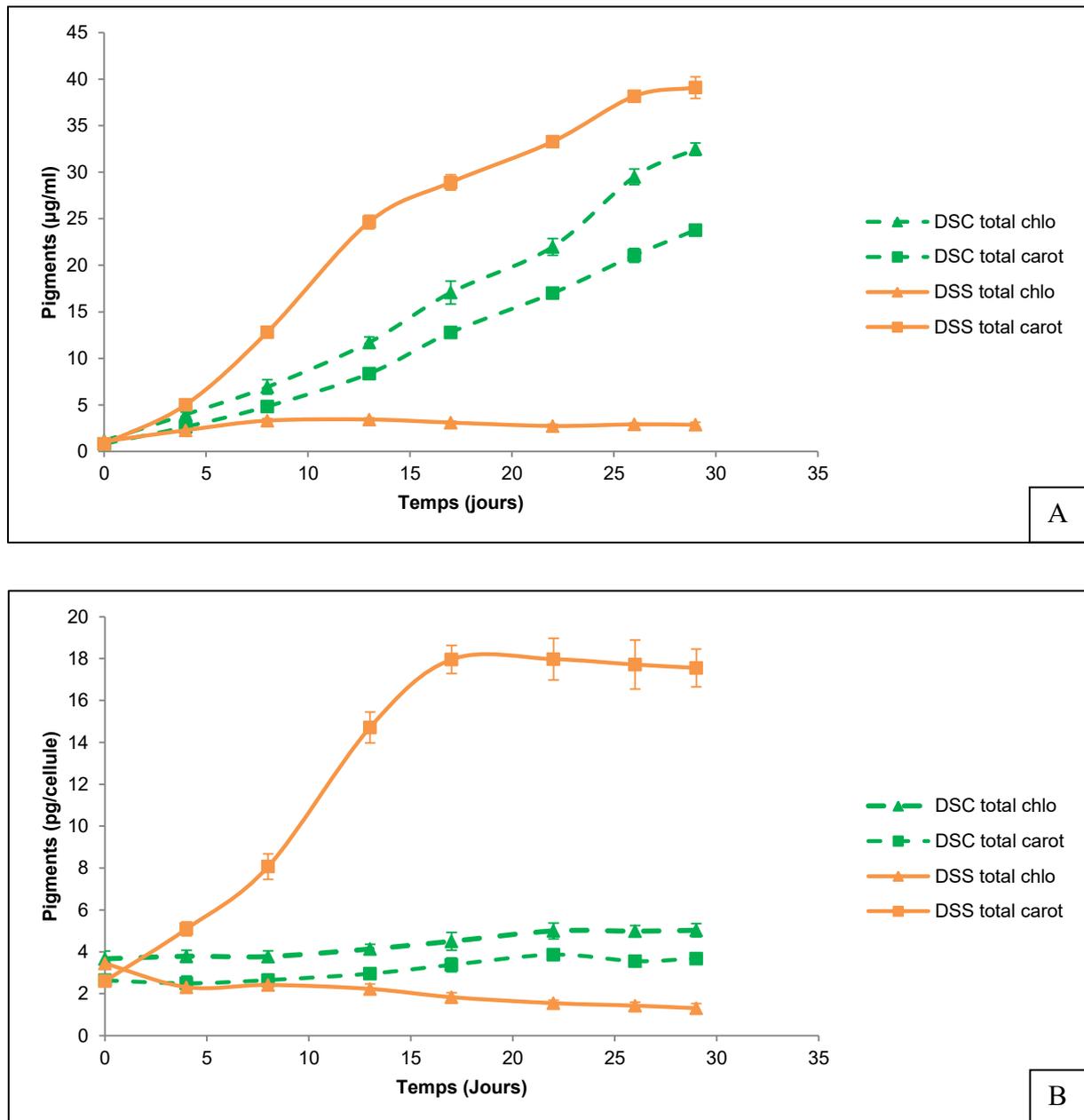


Figure 14. Suivi de la production des pigments de DSC et DSS pendant un mois en μg de pigments/ml de culture (A) et par pg de pigments/cellules (B)

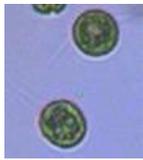
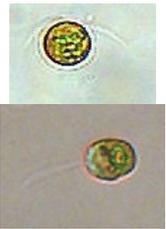
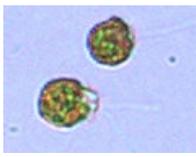
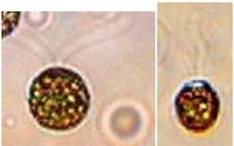
1.7.3. Observations microscopiques de *Dunaliella* sp.

1.7.3.1. Observation au microscope optique

Des observations microscopiques ont été faites à différents points de la croissance de DSC et DSS (tableau 13) en vue de confirmer de point de vue morphologique les résultats des analyses précédentes. Sur la courbe 14B, l'augmentation de la concentration en caroténoïdes au détriment de celle des chlorophylles est observée dès les premiers jours de culture de DSS.

Ceci a été bien confirmé par les observations microscopiques de DSS (Tableau 13). L'aspect de ces cellules à 3 et 8 jours montre le début de l'accumulation des caroténoïdes encore mélangées avec les chlorophylles. A partir de 17 jours, les cellules sont dotées d'aspect rond et de couleur orange. A la fin de la phase exponentielle de DSS, il y a apparition de cellules de petite taille, des cellules déformées, allongées et parfois des cellules éclatées.

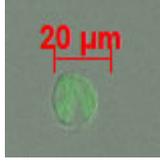
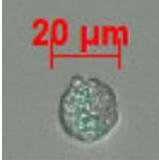
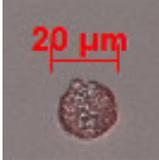
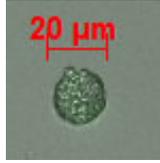
Tableau 13. *Observations microscopiques de Dunaliella sp. à différents stades de sa croissance*

	J3	J8	J17	J20	J24
DSC					
DSS	 			 	 

1.7.3.2. Observation au microscope à épifluorescence

Grâce à la propriété des pigments d'être fluorescents, des observations au microscope à épifluorescence ont été effectuées (tableau 15). Celles-ci montrent la différence en structure intracellulaire entre DSC et DSS à l'exemple de l'apparition de structure globulaire chez DSS correspondant théoriquement aux globules huileux d'accumulation de caroténoïdes. De plus, il s'est avéré que les cellules DSC fluorescent plus en présence de la lumière verte et n'émettent presque aucune fluorescence en rouge et inversement pour les cellules DSS.

Tableau 14. Observation des cellules DSC et DSS au microscope à épifluorescence

Lumière d'excitation	Toutes les lumières	Lumière rouge	Lumière verte
DSC			
DSS			

1.7.4. Analyse par cytométrie en flux de l'accumulation des pigments

La cytométrie en flux fournit des analyses multiparamétriques de nombreux échantillons en peu de temps et avec précision. Elle permet d'analyser le contenu des cellules en pigments, lipides et corps gras, carbohydrates, protéines, acides nucléiques, activités enzymatiques et autres grâce à l'autofluorescence des molécules cibles ou à des marquages par des fluorochromes correspondants des composés non fluorescents (Hyka et al., 2013). Les pigments sont autofluorescents et sont ainsi facilement identifiables et quantifiable par cytométrie en flux. Cette technique permet ainsi d'étudier la capacité photosynthétique des microalgues et d'identifier et d'isoler les cellules surproductrices d'un composé défini.

Les populations cellulaires ont été sélectionnées en fonction de la taille des cellules (FSC) et de la granulation (SSC) (figure 15A). Les cellules de DSC sont réparties en deux sous-populations de caractéristiques granulométriques différentes, une sous-population majeure de 65% avec un signal SSC élevé et une autre de 35% moins granuleuse. Cependant, une seule sous population de haute granulosité a été observée pour les cellules de DSS. Ceci est en conformité avec les observations microscopiques de DSS ayant montré un aspect granuleux et de DSC ayant montré une hétérogénéité des cellules dépendante probablement de leur stade de développement. Il a été décrit que les cellules augmentent en volume et en granulosité pendant les premiers jours/heurs de stress (phase d'adaptation) puis diminuent proportionnellement à la diminution du niveau de stress dans la cellule en raison de l'accumulation croissante de carotène. On obtient ainsi des cellules presque identiques à celles non stressées à la fin de la culture (Davidi et al., 2014; Fachet et al., 2016).

Les intensités moyennes de fluorescence de DSC et DSS ont également été déterminées (figure 15B). La fluorescence a été détectée sur les canaux FL1, FL2 et FL3. Le canal d'émission de la fluorescence rouge FL3 (682/13 nm) est adéquat pour détecter la fluorescence de la chlorophylle *a* puisque son spectre d'émission de fluorescence contient un pic majeur à 683/20 nm attribuable à l'activité du PSII (Pedrós et al., 2008). Les cellules de DSS ont eu une émission réduite sur FL3 correspondant à une régression des contenus intracellulaires en chlorophylles. En revanche, une augmentation importante de la fluorescence émise a été détectée sur les canaux FL1 (530/30 nm) et FL2 (575/26 nm) pour DSS, ayant probablement comme origine, les caroténoïdes. (Nonomura and Coder, 1988) ont isolé des cellules mutantes de *D. salina* surproductrices de carotène par trie cellulaire. Ces cellules ont été dotées d'une taille plus grande et une fluorescence plus importante par excitation à 488nm et émission à 590 nm. De même, (Ukibe et al., 2008) ont isolé des mutants de *Xanthophyllomyces dendrorhous* surproductrices d'astaxanthine. Ces auteurs ont remarqué que pour certains clones, l'augmentation de la fluorescence sur FL1 (490-550 nm) et FL2 (570-580 nm) a été accompagnée d'une surproduction de β -carotène. Cependant, il est un peu délicat de détecter l'astaxanthine chez les algues en raison de sa fluorescence à 675 nm qui coïncide avec la forte émission de chlorophylles.

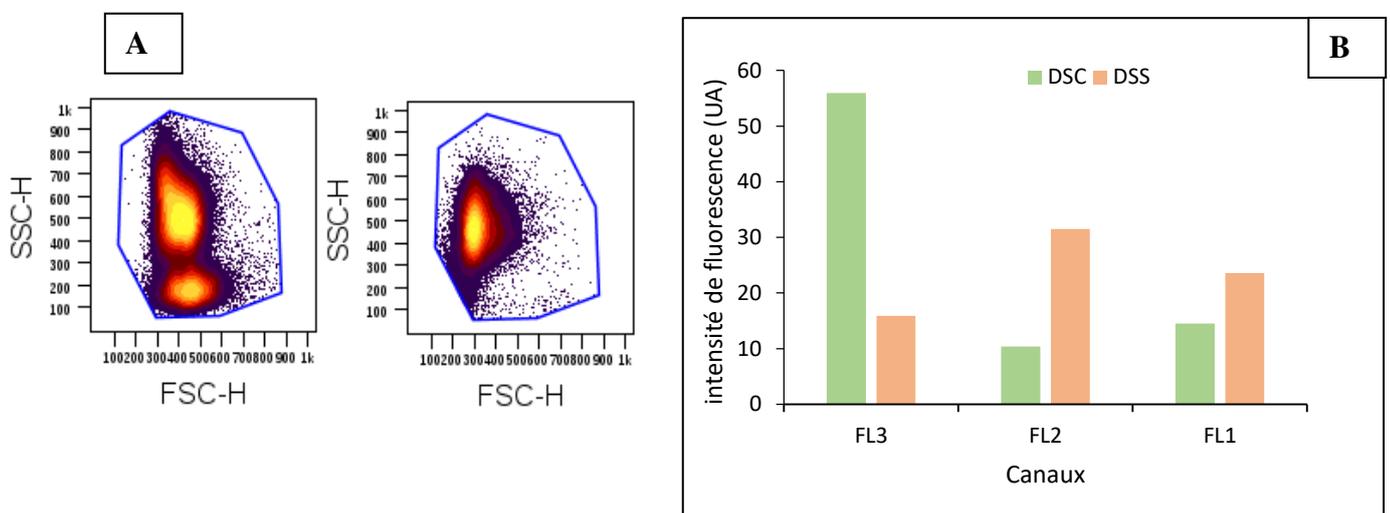


Figure 15. Analyse en cytométrie en flux: définition des populations de DSC (A.gauche) et DSS (A.droite). (B) Intensités moyennes de fluorescence de *Dunaliella* sp. par excitation avec les lasers FL1 (530/30 nm), FL2 (575/26 nm) et FL3 (682/13 nm).

1.7.5. Mise en évidence de l'accumulation de lipides par cytométrie en flux

Plusieurs auteurs ont préalablement détecté les lipides par marquage au rouge de Nile (Nile Red (NR)) comme indicateur indirect d'accumulation de caroténoïdes chez *D. salina* (Fachet et al., 2016; Mendoza et al., 2008). Le fluorochrome rouge de Nile permet de distinguer entre les lipides membranaires polaires et les globules lipidiques neutres. En effet, par une excitation à la lumière bleue (488 nm), le premier type de lipide émet dans le rouge alors que le deuxième émet dans les régions vert et orange correspondantes à FL1 et FL2 (Fachet et al., 2016). La caroténogenèse se fait dans les globules huileux d'où cette relation entre lipides et caroténoïdes. Nous pouvons différencier la fluorescence due au NR sur FL2 en considérant négatives les cellules non marquées (Figure 16). Sur FL1, il y a un certain chevauchement entre les cellules marquées et non marquées (ne sont pas présentées). Moyennant cette méthodologie d'analyse, nous avons remarqué que les cellules de DSS émettent plus de fluorescence en NR que DSC ce qui signifie qu'elles contiennent plus de lipides neutres servant à la formation des globules de carotène.

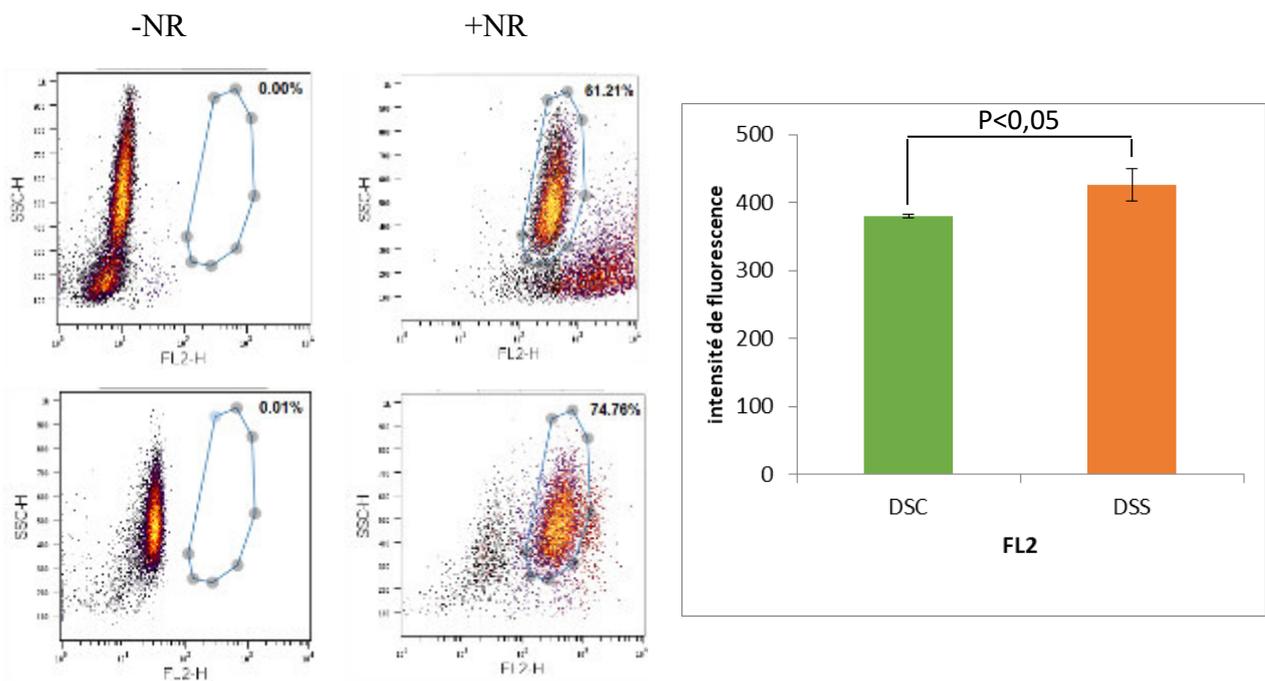


Figure 16. Analyse des cellules marquées au NR par cytométrie en flux

2. Etude transcriptionnelle

Dans le but de comprendre l'origine de ces changements observés à l'échelle transcriptionnelle suite au stress appliqué, un suivi de l'expression de certains gènes impliqués dans la caroténogénèse et la réponse au stress au cours des premiers 72 h a été fait.

2.1. Optimisation de la méthodologie d'extraction des ARN totaux

L'extraction d'ARN est une technique sensible, délicate mais déterminante pour la quantification de l'expression des gènes. Pour cela, une mise au point des différentes étapes d'extraction a précédé l'étude. En effet, nous avons mis en évidence que la rigidité de la paroi de DSS ait été affectée suite au stress appliqué (culture à une salinité de 2 M). Cette fragilité membranaire a abouti à un éclatement rapide des cellules par choc osmotique après centrifugations et lavages du culot cellulaire à l'eau distillée engendrant ainsi une perte des ARN dans le surnageant. Pour résoudre ce problème, nous avons essayé dans un premier temps d'utiliser le PBS à la place de l'eau distillée et de diminuer le nombre de lavages et la vitesse des centrifugations. Comme le montre la figure 17, le meilleur rendement d'extraction est obtenu à 0 lavage du culot de DSS. Cependant, les résidus du sel ont limité la qualité du dépôt et la migration des échantillons au niveau du gel. Ainsi, le nombre de lavages au tampon RPE s'est élevé à 3 et 4. La figure 17 révèle l'amélioration apportée à la qualité des ARNs extraits.

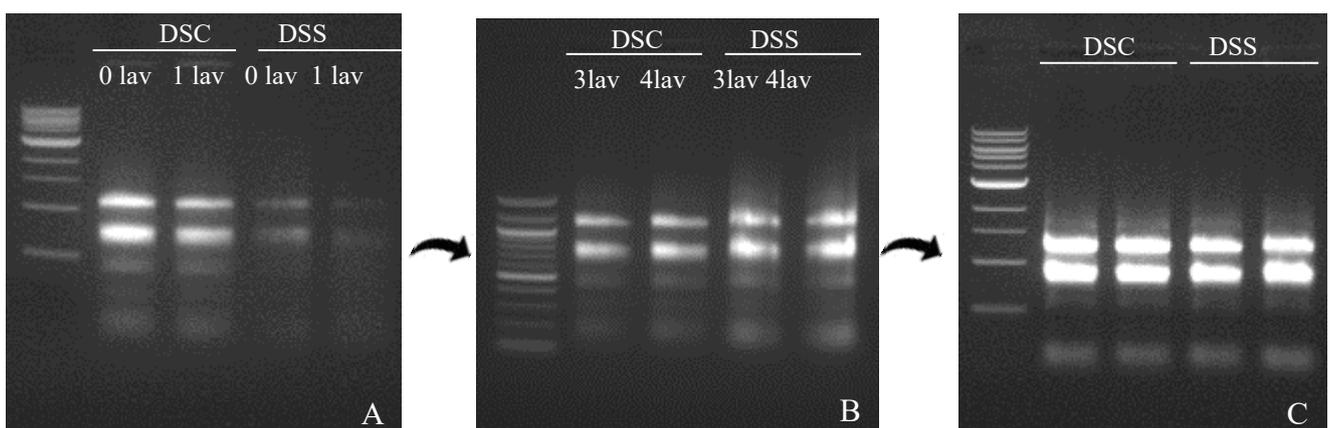


Figure 17. Mise au point de l'extraction des ARNt chez DSC et DSS. (A) 1 ou 0 lavage du culot de *Dunaliella*, (B) Elimination des étapes de lavages et ajout de lavage de l'ARN piégé dans la colonne, 3 ou 4 lavages, (C) extraction d'ARN sans lavage du culot et avec 3 lavages d'ARN au tampon RPE

2.2. *Validation des amorces choisies*

La spécificité des amorces codant pour les gènes *Eno*, *HSP70*, *RPE*, *Cgp*, *DXS*, *LCYB*, α -*tub*, β -*tub*, *18S* et *Act* a été validée dans un premier temps par migration sur gel d'agarose et par analyse des courbes de fusion obtenues par qPCR. La figure 18A montre l'obtention d'une seule bande pour chaque couple d'amorces à la taille correspondante. Les courbes de fusion (melting curves) montrent également un pic unique d'amplification, ce qui valide bien la spécificité des amorces.

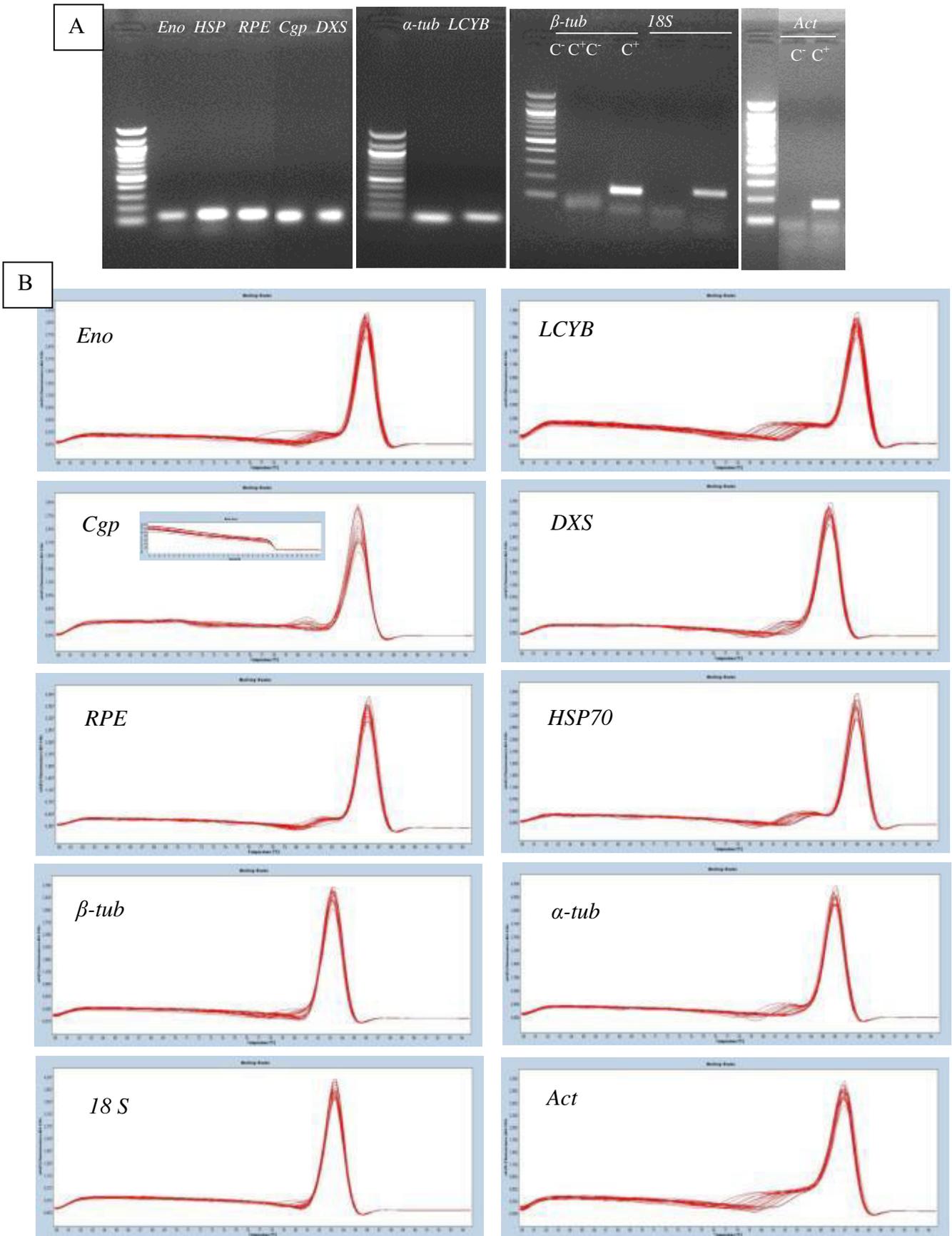


Figure 18. Validation de la spécificité des amorces codant pour les genes *Eno*, *HSP70*, *RPE*, *Cgp*, *DXS*, *LCYB*, *α-tub*, *β-tub* *18S* et *Act* ; (A) par migration sur gel d'agarose, (B) par analyse des courbes de fusion

2.3. *Efficacité d'amplification*

Dans un deuxième temps, l'efficacité d'amplification des gènes a été déterminée étant donnée son impact sur la formule de calcul des niveaux d'expression des gènes (Pfaffl, 2001). En effet, cette valeur permet la normalisation des données évitant ainsi l'effet de variabilités issues des différences aux moments de l'extraction des ARNt, de transcription reverse (enzyme et type d'amorces utilisées « amorces hexamères aléatoires, amorces poly-dT, amorces spécifiques à un gène ») et de la PCR (mixte, appareil ...). La figure 19 présente les efficacités des PCR amplifiant les différents gènes utilisés calculés par le logiciel LightCycler® 480, Version 1.5 (Roche). Ces efficacités varient entre 90 et 110% ce qui est considéré comme des indices d'amplification satisfaisants. Les valeurs présentées dans le tableau des amorces dans M&M représentent la moyenne des trois essais.

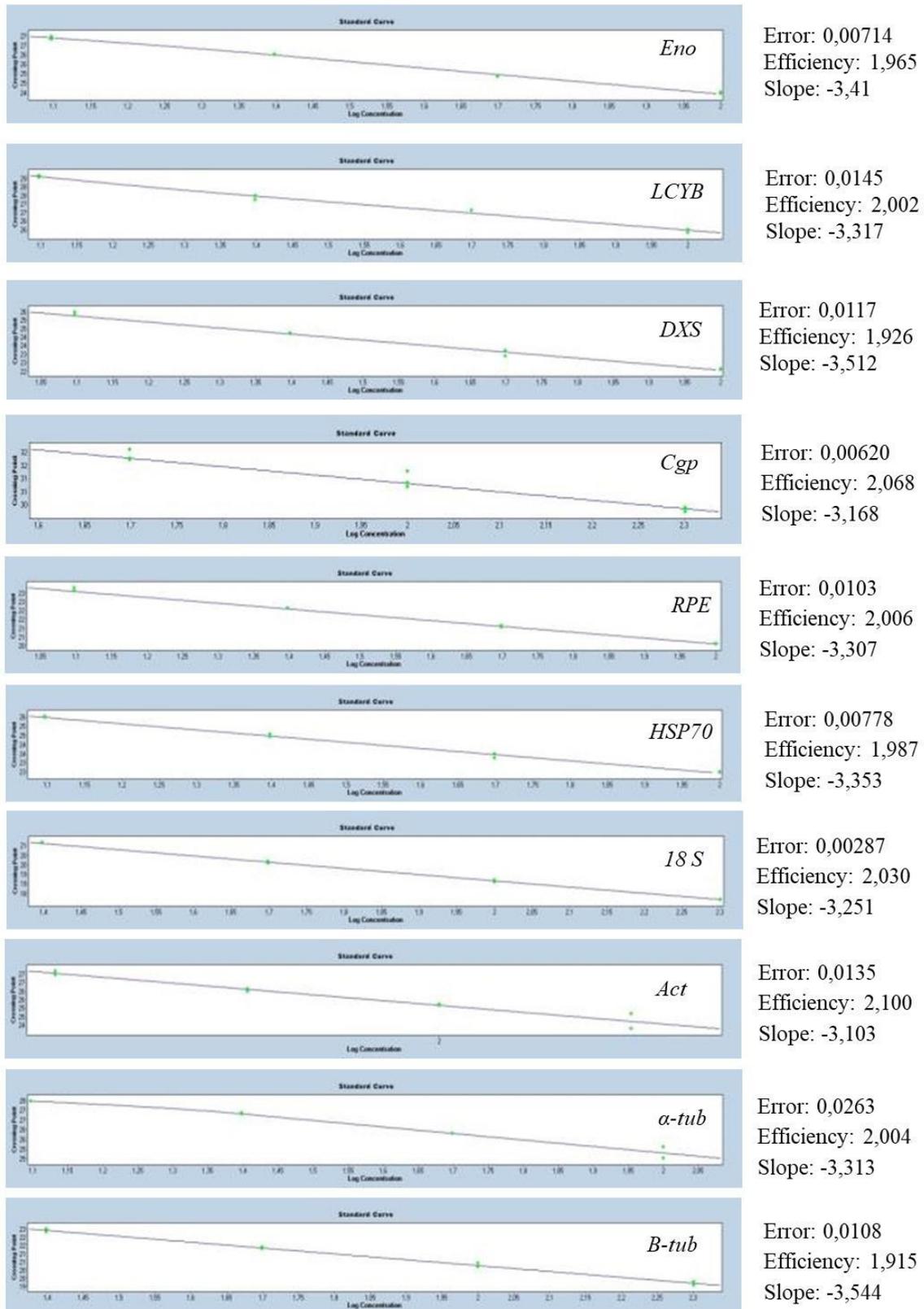
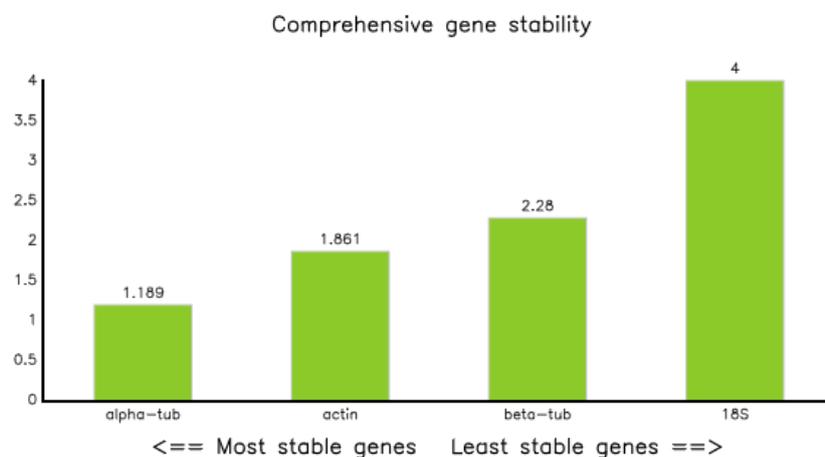


Figure 19. Calcul des efficacités des PCR amplifiant les gènes *Eno*, *HSP70*, *RPE*, *Cgp*, *DXS*, *LCYB*, *α-tub*, *β-tub*, *18S* et *Act* par le logiciel *LightCycler® 480*, Version 1.5 (Roche).

2.4. Criblage du meilleur gène de référence

Le choix du gène de référence ou « housekeeping gene » est très important pour le calcul des changements des niveaux d'expression des gènes cibles surtout que plusieurs chercheurs ont déjà montré que l'expression de quelques gènes de ménage pourrait être affectée par les conditions de stress (Li et al., 2019, 2015; Tian et al., 2015). A partir des diverses conditions de culture, l'analyse des Ct obtenus suite à l'amplification des gènes α -Tub, β -Tub, 18S et Act par RefFinder a révélé que α -Tub s'avère le gène le plus stable suivi par Act alors que 18S a été le gène le moins stable (figure 20A). L'analyse via GeNorm a montré une valeur de stabilité de l'expression (M) inférieure à 1,5 pour tous les gènes testés, ce qui indique qu'ils sont tous acceptables en tant que gène de référence. GeNorm classe α -Tub et Act comme les meilleurs gènes de référence stables et 18S le moins stable (figure 20B) en étant la valeurs de M la plus faible (Li et al., 2015). Deux autres études ont également signalé la stabilité du gène α -Tub dans des conditions de stress. L'une a été réalisée chez *Dunaliella* sp. cultivée sous forte intensité lumineuse (Park et al., 2006). La deuxième étude réalisée sur *Syntrichia caninervis* sous stress abiotique, a révélé que α -Tub soit le plus stable parmi 15 gènes de référence et que 18S demeure le moins stable (Li et al., 2015).



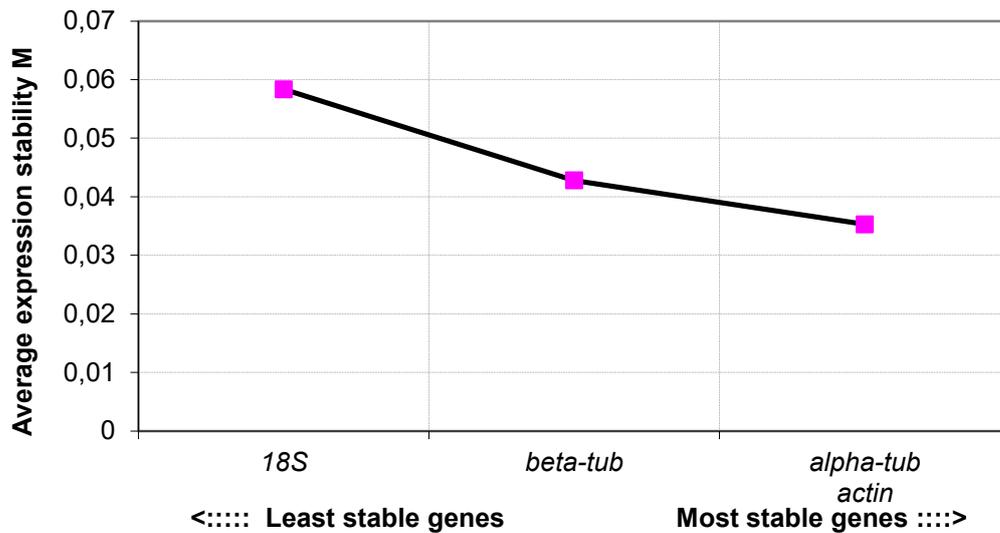


Figure 20. Criblage du meilleur gène de ménage parmi α -Tub et β -Tub, 18S et Act moyennant (A) RefFinder et (B) GeNorme

2.5. Profil d'expression génique dans les conditions de stress

Après la vérification de la spécificité des amorces choisies et la stabilité du gène de ménage, nous avons opté à la quantification relative de l'expression des gènes impliqués dans la caroténogénèse dans le but de mieux comprendre ce mécanisme en réponse au stress appliqué. Ceci est fait moyennant un suivi de l'expression de *ENO*, *DXS*, *LCYB*, *Cgp*, *HSP70* et *RPE* pendant les premières 72 h de culture par qPCR.

2.5.1. Suivi de la variation d'expression d'*ENO*

Le niveau de transcription de l'énolase, enzyme catalysant l'avant dernière étape réversible de la glycolyse (déshydratation unique du D-2-phosphoglycérate (2-PGA) en phosphoénolpyruvate (PEP)), montre une diminution de 0,48 fois au cours des premières 24 h de culture. Cette observation est en accordance avec celle de Xia et ses collaborateurs qui ont trouvé une diminution de l'expression de l'ARNm et de l'activité de l'ENO pendant 12h de stress d'hyperosmolarité (Xia et al., 2014). L'expression de l'*ENO* tend à réaugmenter et se restabiliser à 72 h de culture par un niveau d'expression relative proche de 1 (figure 21 A) et similaire à celui de DSC à 72h (figure 22). Sous un stress hypersalin (3 M), le niveau d'expression de la protéine énolase et de son activité diminue après 3h de stress chez *D. salina* et se rétablit à 6h dans une étude à (Ruan et al., 2009). Cette variation du niveau

d'expression d'*ENO* fait qu'elle est une enzyme clé dans l'orientation du métabolisme de l'organisme vers la formation de glycérol ou d'acide tricarboxylique (Polle et al., 2014). En effet, la baisse d'expression d'*ENO* inhibe la transformation de 2-PGA en PEP et par la suite en pyruvate ce qui diminue la quantité de carbone disponible pour le cycle de l'acide tricarboxylique. Sachant que *D. salina* est capable de survivre sous un stress hypersalin grâce à l'accumulation rapide d'osmoprotecteurs, elle dégrade ainsi l'amidon réservé dans le chloroplaste en glucose pour qu'il soit converti en glycérol. D'où elle privilège l'accumulation de 2-PGA et indirectement la DHAP au milieu de la voie de la glycolyse (voir schéma). La DHAP est ensuite transformée en glycérol. Le contenu en proline, glycine bétaine, protéine et sucre totaux augmentent aussi suite à la choc osmotique (Mishra et al., 2008). La restitution de l'énolase permet un apport suffisant en carbone pour la synthèse du PEP puis du pyruvate essentiel pour la synthèse des isoprénoïdes.

2.5.2. Suivi de la variation d'expression de *DXS*

Le deuxième gène suivi est celui codant pour *DXS* qui catalyse la première réaction de la voie MEP par conversion du pyruvate et de G3P en DXP. Il est impliqué dans la synthèse de thiamine et des isoprénoïdes tels que les caroténoïdes, les chlorophylles, les substances volatiles et le squalène (Kajikawa et al., 2015; Matsushima et al., 2012; Peng et al., 2013). Dans notre étude, on remarque que le niveau d'expression de ce gène augmente significativement après 24 h (figure 21B) puis diminue. En effet, on remarque que ce gène est plus exprimé en DSC qu'en DSS à 72h de culture (figure 22). De même Sánchez-Estudillo et ses collaborateurs (2006) signalent que le niveau d'ARNm de *DXS* diminue sous limitation d'azote, en expliquant ce phénomène par les données suivantes ; le ralentissement de la croissance en condition de stress, le faible développement des chloroplastes et du niveau d'activité photosynthétique nécessaires. Mais étant donné que la teneur en caroténoïde par cellule augmente ceci suggère que la formation de pigments photosynthétiques est dépendante de la régulation des enzymes caroténogènes situées dans les étapes finales de la voie MEP (Sánchez-Estudillo et al., 2006). Par contre, une autre étude a constaté que le niveau de transcription du *DXS* augmentait sous privation d'azote pour fournir davantage de substrat nécessaire à la synthèse de carotène (Lv et al., 2016). Dans notre étude, quoique sa diminution, *DXS* continue à être exprimé (1,47 à 72h) permettant un approvisionnement en substrat. Des études affirment que l'expression de *DXS* peut subir une rétro-inhibition par IDP et DMADP (Banerjee et al., 2013; Ghirardo et al., 2014) de plus des régulations traductionnelles, post-traductionnelles et post-transcriptionnelles modulant les enzymes de la

voie MEP et en particulier DXS (Ghirardo et al., 2014; Guevara-García et al., 2005). Une dernière explication des divergences en résultats entre les publications de l'expression de DXS chez *Dunaliella* est la possibilité d'existence de plus d'une isoforme de DXS comme chez les plantes (tomate, Arabidopsis, le riz, le maïs, les agrumes) et la microalgue verte *Botryococcus braunii* ayant des profils d'expression et des fonctions différentes (Matsushima et al., 2012; Peng et al., 2013).

2.5.3. Suivi de la variation d'expression de LCYB

Le troisième gène impliqué dans la caroténogénèse est le LCYB qui catalyse la cyclisation du lycopène linéaire en β -carotène. L'accumulation de cet isoprène est directement liée à la régulation et au contrôle moléculaires du gène LCYB et à l'activité de l'enzyme codée (Zhu et al., 2008). L'expression de ce gène a augmenté progressivement durant les premier 48 h pour avoir une hausse à 72 h (figure 21C). De plus en comparant cette expression par rapport à celle chez DSC, il s'est révélé être 3,5 fois plus exprimé (figure 22). Ceci pointe la déviation du métabolisme de la cellule vers la production de β -carotène après 3 jours en répondant au stress appliqué. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par Ramos et son équipe (Ramos et al., 2008) qui ont constaté que le niveau de transcription du LCYB était maximal dans les cellules soumises à un épuisement des nutriments associées à une augmentation de salinité ou d'intensité lumineuse. Aussi Lv et ses collaborateurs révèle une augmentation de l'expression de ce gène sous manque d'azote (Lv et al., 2016). Le promoteur de ce gène a été étudié par Liang et son équipe montrant qu'il contenait divers éléments impliqués dans la réponse au stress chez *D. bardawil*. La régulation au stress salin est modulée par l'élément SRE (GT1GMSCAM4) et la région riche en GT dans la séquence génomique (Liang et al., 2017). Quant au réponse au stress lumineux, le promoteur contient les éléments (GATABOX, CGCGBOXAT, SORLIP1AT) et des W-boxes qui est un domaine de liaison au facteur de transcription WRKY (Liang and Jiang, 2017). La famille de facteurs de transcription WRKY présente un grand intérêt étant donné qu'elle est impliquée dans diverses réponses au stress biotique, abiotique et dans des processus de développement physiologiques (Liang et al., 2017).

2.5.4. Suivi de la variation d'expression de Cgp

Cette orientation est confirmée aussi par la cinétique d'expression du gène *Cgp* chez DSS durant ces 72h. *Cgp* code pour une protéine qui entre dans la structure des β C-plastoglobules jouant ainsi un rôle important dans le maintien de leur stabilité puisqu'elle

empêche la coalescence des globules de β -carotène en fournissant une couche hydrophile recouvrant le noyau de pigment hydrophobe (Davidi et al., 2014, 2015; Katz et al., 1995). Dès les premiers heurs de stress l'expression de ce gène à augmenter d'environ 10 fois pour s'explorer au bout de 72h par un rapport de plus de 50 fois (figure 21D). Chez DSC, ce rapport est d'environ 0,8 fois seulement (figure 22). En accordance avec nos résultats, une augmentation de l'expression de *Cgp* a été constatée au cours des premières heures de déficience en azote ou d'augmentation de lumière chez *D.bardawil* (Davidi et al., 2014; Katz et al., 1995). Cette augmentation d'expression de *Cgp* qui est parallèle à la production de β -carotène, est aussi associée à une accumulation de Triacyl glycérol (TAG) (Davidi et al., 2014; Rabbani et al., 1998). En effet, *D. bardawil* mobilise le TAG du cytoplasme dans les chloroplastes pour former davantage de plastoglobules (Davidi et al., 2014). En l'absence de caroténogénèse, ces globules lipidiques sont aussi absents.

2.5.5. Suivi de la variation d'expression de HSP70

L'influence de ce stress sur l'expression du gène codant pour une protéine de choc thermique HSP70B a été aussi étudiée. Cette protéine de 70 kDa fait partie de famille de chaperonnes moléculaires dépendants de l'ATP, hautement conservées et codées par un seul gène chez les algues vertes (Chiu et al., 2013; Trösch et al., 2015). Le niveau d'expression de *HSP70*, augmente significativement dès 4 h de stress (figure 21E). La différence de son expression est significative entre DSC et DSS à 72 h avec des 'fold change' de 2,27 et 3 respectivement (figure 22). Cette élévation de l'expression de *HSP70* peut s'expliquer par un besoin cellulaire en molécule chaperonne où dans des résultats similaires obtenus par Yokthongwattana et al en 2001 montrent que le niveau d'expression du gène *HSP70* augmentait immédiatement suite au déplacement des cellules de basse intensité lumineuse à une très forte luminosité chez *D. salina*. Ceci cause une accélération de l'endommagement du PSII et la perte de D1. Cette dernière sera remplacée par accumulation de HSP70B, conférant ainsi une protection conformationnelle au complexe PSII dissemblé (stabilisation) et jouant un rôle important dans la régulation de la réparation (Yokthongwattana et al., 2001). Sous un stress salin, *D. salina* exprime plus *HSP70* (Mosaviazam et al., 2016). En générale, le stress oxydatif provoque de multiples modifications protéiques ce qui entraînent une expression accrue des chaperons moléculaires et des protéases (Trösch et al., 2015). Par exemple, DXS peuvent subir des modifications sous stress pour devenir inactive. Pulido et ses collaborateurs montrent que chez *Arabidopsis*, la protéine J20 identifie les formes de DXS non pliées ou mal

pliées (endommagées) et les cible vers le système HSP70 pour un repliement correct (Pulido et al., 2013).

2.5.6. *Suivi de la variation d'expression de RPE*

Le dernier gène qui a été suivi est celui qui code pour le chloroplaste ribulose phosphate-3-épimérase (RPE) responsable de la catalyse de l'épimérisation réversible du ribulose 5-phosphate (Ru5P) en xylulose 5-phosphate (Xu5P) au cours du cycle de Calvin. Le niveau de transcription du RPE ne présente pas de variation significative au cours des premières 72 h de stress (figure 21F). La différence entre son expression à 72 h chez DSC et DSS est significative (figure 22). De même, mais au niveau protéomique, la quantité de cette enzyme a également diminué chez *Dunaliella* sous condition de stress (Ben Amor et al., 2017) et chez *Nannochloropsis oceanica* sous privation d'azote (Dong et al., 2013). Cet auteur conclut que l'efficacité de la photosynthèse est affectée par la quantité d'azote. La diminution d'expression de cette enzyme permet en même temps l'accumulation de xylulose-5P, qui servira probablement de substrat pour la production de G3P dans le cycle du pentose phosphate (Ben Amor et al., 2017).

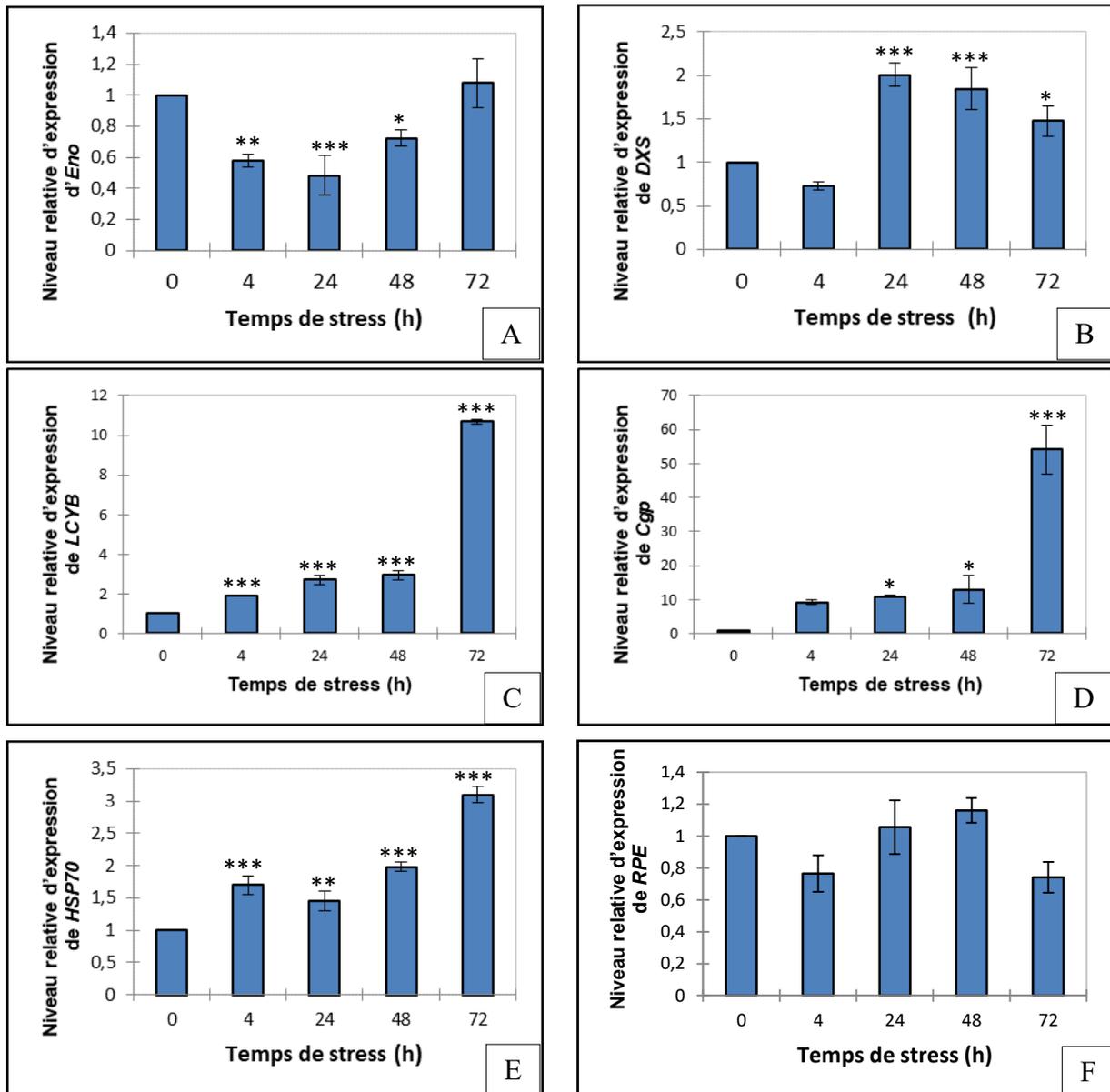


Figure 21. Niveaux d'expression des gènes : (A) ENO, (B) DXS, (C) LCYB, (D) Cgp, (E) HSP70, (F) RPE en fonction du temps de stress appliqué. Les quantifications ont été normalisées par rapport au gène α -Tub. L'astérisque indique une différence significative entre les expressions des gènes à différents moments de stress, selon le test ANOVA unidirectionnel suivi par le test de Tukey. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$. Les données sont exprimées en tant que moyennes \pm SD ($n = 3$).

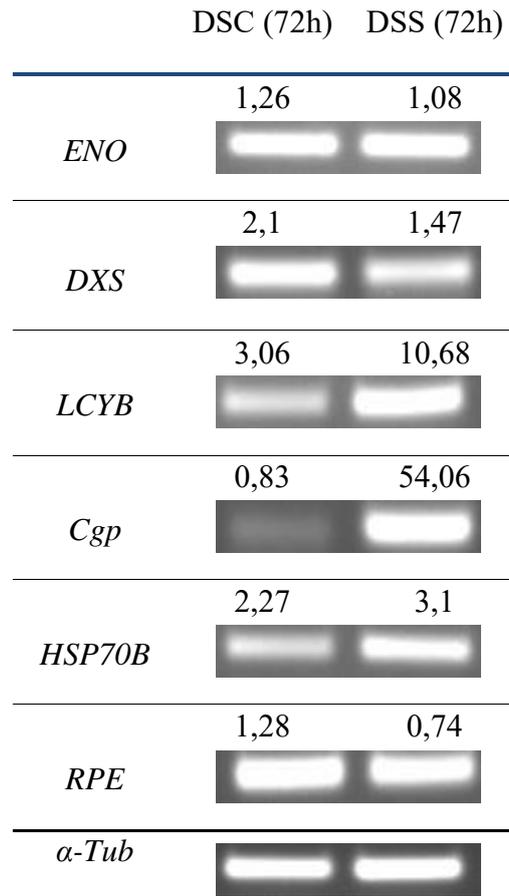


Figure 22. Visualisation sur gel d'agarose des bandes des gènes *ENO*, *LCYB*, *DXS*, *Cgp*, *HSP70*, *RPE*, *α -Tub* chez *DSC* et *DSS* après 72h de culture cellulaire. L'intensité des bandes sont en corrélation avec les valeurs trouvées par PCR quantitative

2.6. Modélisation moléculaire

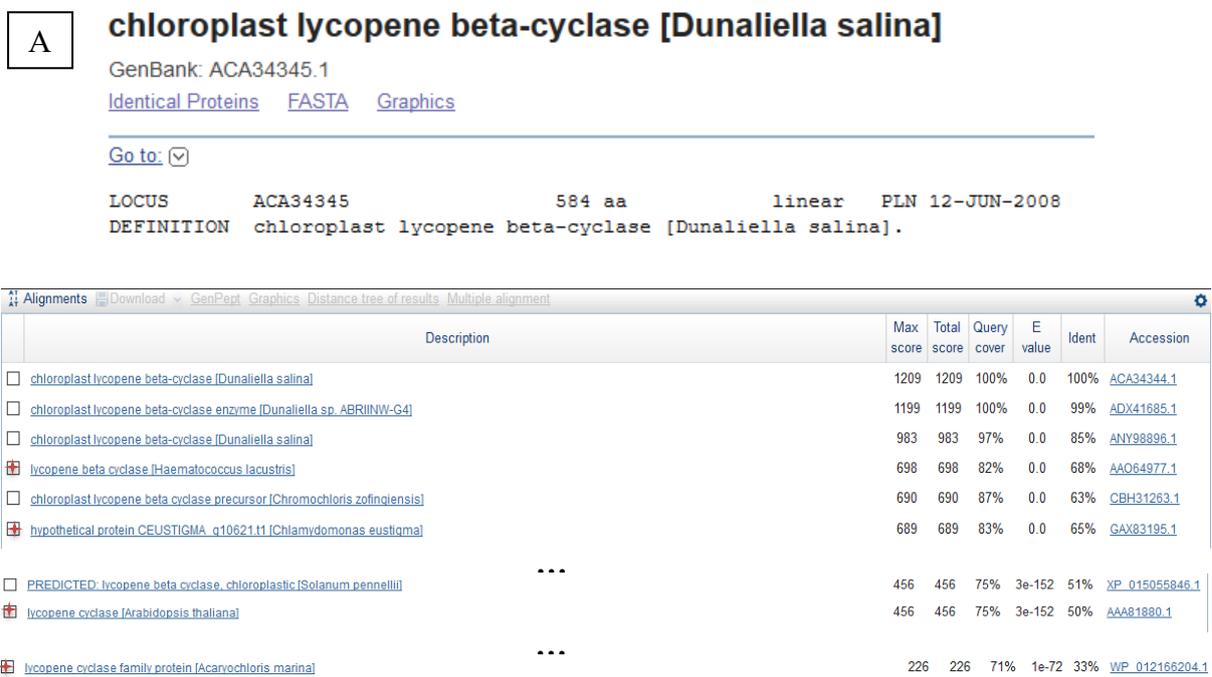
2.6.1. Modélisation de la Lycopène bêta-cyclase

D'après le suivi de l'expression de ces six gènes, nous avons remarqué que ceux codant pour *LCYB* et *Cgp* ont subi les modifications les plus importantes vues que les enzymes correspondantes sont directement impliquées dans la caroténogénèse. Cette étude moléculaire nous aidera à mieux comprendre la structure des protéines et prédire les interactions et les types de régulations qu'ils peuvent subir.

2.6.1.1. Choix et Analyse d'alignement de la séquence *LCYB*

Dunaliella sp isolée et étudiée dans le présent travail présente 97% d'identité de séquence avec *D. salina*, *D. quartolecta* et *D. polymorpha*. Parmi ces trois espèces, seule la

séquence de LCYB de *D. salina* (ACA34345.1) était disponible dans la base de données (figure 23A). Etant le holotype de ce genre, nous avons utilisé la séquence peptidique de cette protéine pour l'élaboration du modèle. Sa comparaison avec d'autres séquences homologues connues de LCYB a montré une forte homologie avec de nombreuses LCYB d'autres microalgues. Par exemple, elle possède 68 et 65% d'identité de séquence avec celle de *Haematococcus lacustris* (AAO64977.1) et *Chlamydomonas eustigma* (GAX83195.1), respectivement. En revanche, seulement 50% d'identité de séquence a été observée avec LCYB d'*Arabidopsis thaliana* (AAA81880.1) et une identité plus faible avec celle des cyanobactéries (33% pour *Acaryochloris marina* (WP_012166204.1)) (figure 23B).



séquences conservées on site PTFLYAM et FLEETSL (colorés et entourés en rouge sur la figure 24) sont impliquées dans la formation des brins β 12 et β 13. Afin de mieux comprendre le rôle de ces régions conservées dans l'activité enzymatique, nous nous sommes proposé de poursuivre les recherches sur le modèle 3D couplé à des expériences d'amarrage moléculaire.

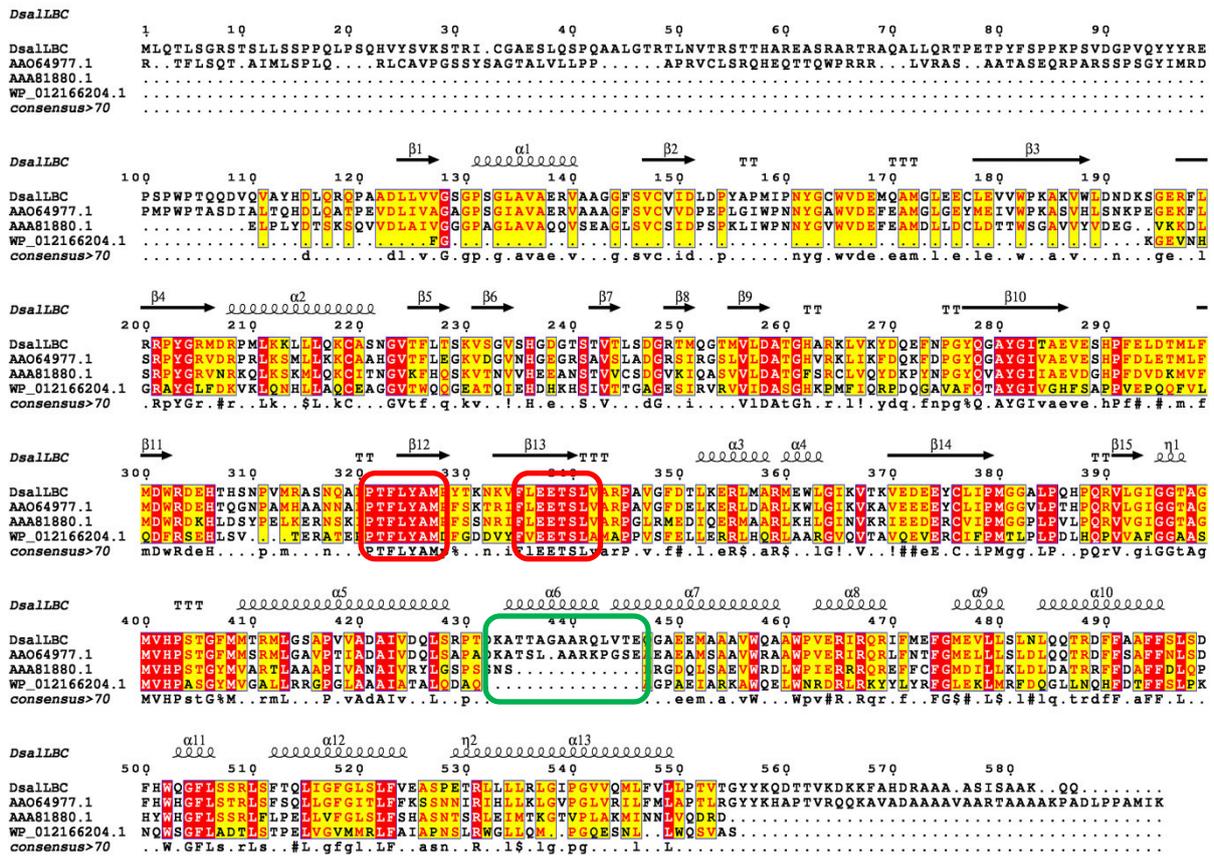


Figure 24 . Alignement de séquences multiples de LCYB de *D. salina* par rapport à d'autres LCYB.

ACA34344.1 : numéro d'accès de LCYB de *Dunaliella salina* ; AAO649777.1: numéro d'accession de LCYB de *Haematococcus lacustris* ; AAA81880.1: numéro d'accession de LCYB d'*Arabidopsis thaliana* ; WP_012166204.1: numéro d'accession de LCYB d'*Acaryochloris marina*.

2.6.1.3. Modèle 3D global de *D. salina* LCYB

La structure globale de l'enzyme pourrait être divisée en deux domaines distincts: un domaine catalytique impliquant un site de liaison au cofacteur FAD ainsi qu'un site de liaison au substrat et un domaine transmembranaire (figure 25).

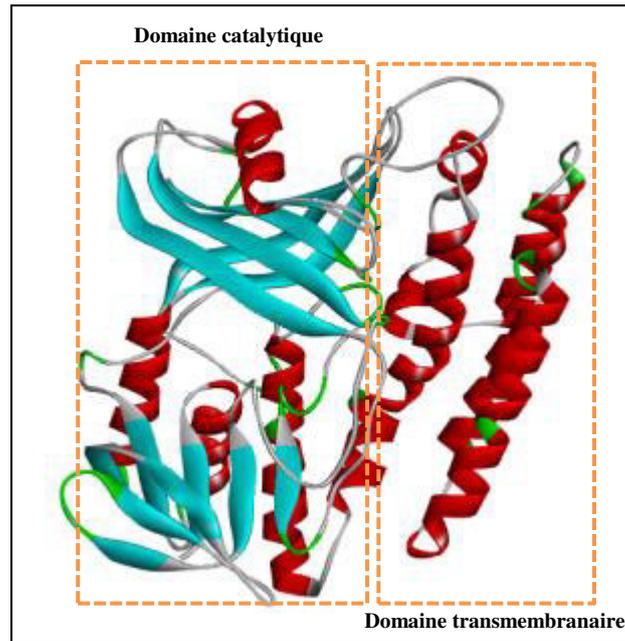


Figure 25. Représentation en ruban du modèle 3D LCYB montrant les deux domaines (le domaine catalytique et le domaine transmembranaire)

- **Domaine transmembranaire**

Ce domaine est constitué par les 80 derniers Aa du côté C-terminal constituant ainsi la partie transmembranaire de l'enzyme, comme prédit par le serveur TMHMM (figure 26). Il est composé uniquement en trois longues hélices couvrant la longueur totale de l'enzyme.

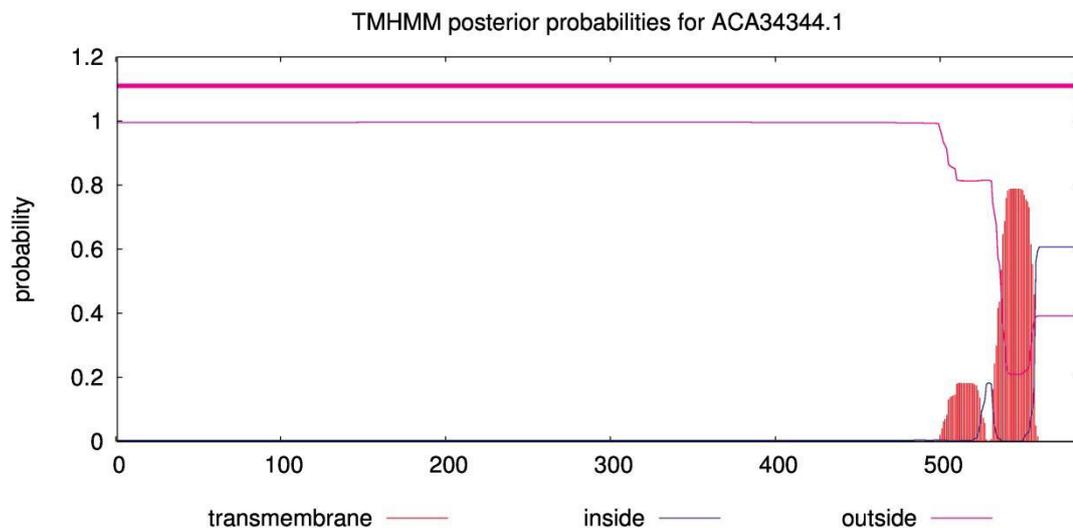


Figure 26. Prédiction de la partie transmembranaire de LYCB par le serveur TMHMM

- *Domaine catalytique*

Le domaine catalytique est constitué d'un site de liaison au FAD et un site de liaison au substrat. Il appartient à la structure de la classe mixte α/β et ayant l'architecture de Rossmann constitué par un feuillet β central flanqué de quatre hélices α .

- ✓ Site de fixation du FAD

Plusieurs études ont montré que les lycopènes cyclases utilisent le FAD comme cofacteur (Yu et al., 2010). Pour identifier son site de fixation probable sur le modèle prédit, nous avons d'abord déterminé la taille et la forme de ce site à l'aide du programme CAST (figure 27C) montrant la présence d'une petite cavité pour la liaison du FAD avec un volume total de 139,5 Å².

Par la suite, une molécule de FAD a été amarrée dans le modèle généré (figure 27A) et le site de liaison a été identifié par le motif G-x-G-x-x-G connu sous le nom « nucleotide binding motif » (Ahn and Kim, 2015). Dans notre cas, le site de liaison comprenait les résidus Gly128-Ser129-Gly130-Pro131-Ser132-Gly133 directement impliqués dans les liaisons hydrogènes avec la molécule de FAD (figure 27B). En fait, la partie pyrophosphate serait stabilisée par une liaison H établie avec des groupes amines des résidus Lys212 et Gly130. L'adénosine et le cycle ribose du cofacteur sont situés dans une poche hydrophobe formée par les résidus Ile150, Leu152, Val231, Val127 et stabilisés par d'autres interactions hydrophiles. Le cycle isoalloxazine de la molécule FAD a également été placé dans une poche hydrophobe et stabilisé avec de nombreuses liaisons hydrogène, comme le montre la figure 27B.

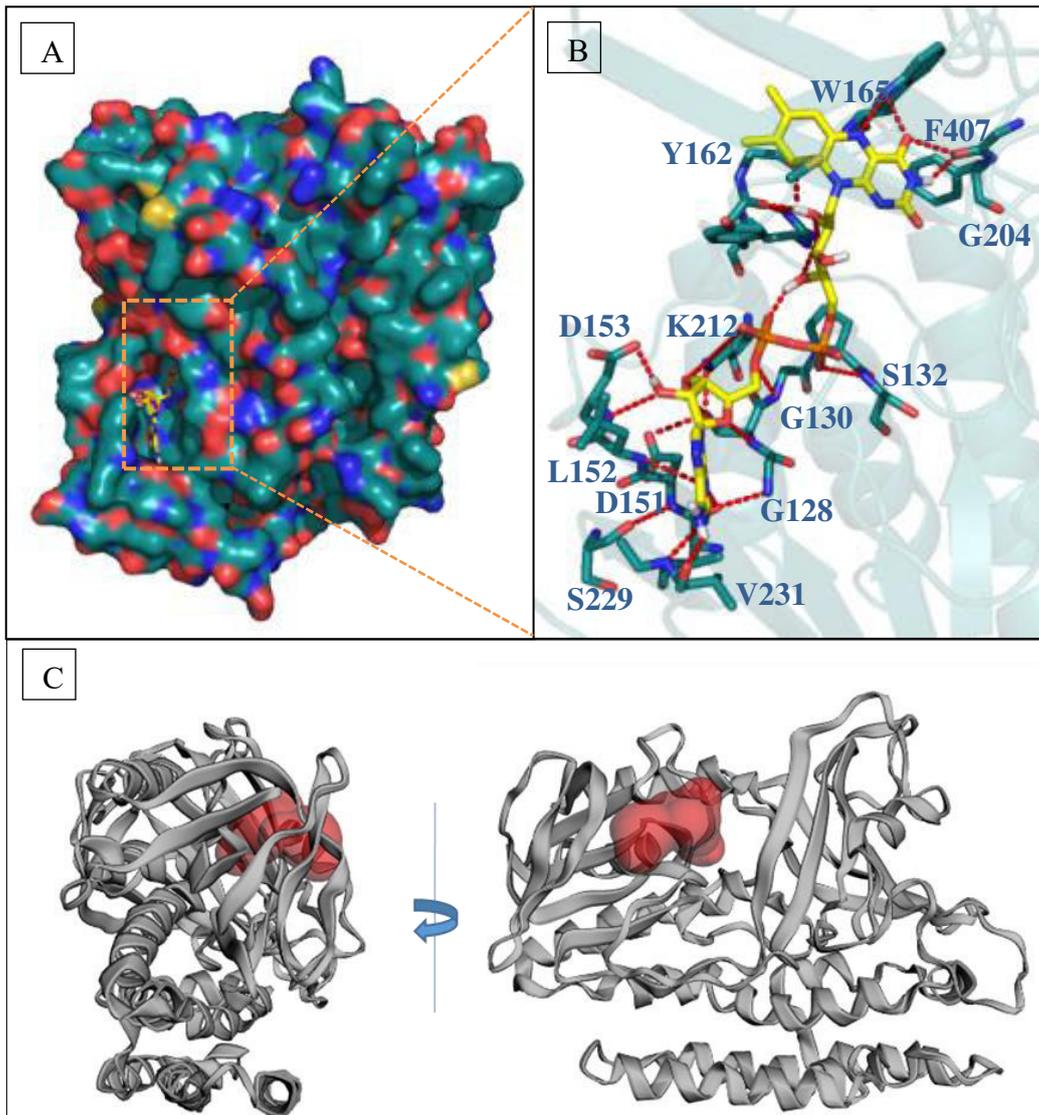


Figure 27. (A) La molécule de FAD ancrée dans le site de liaison du FAD est représentée par un bâton jaune; (B) mode de liaison du cofacteur FAD. Les interactions observées entre le récepteur et le ligand polaire sont représentées par des lignes pointillées rouges et les résidus impliqués dans ces contacts sont représentés par des bâtons bleus; (C) détermination du volume (en rouge) du site probable de liaison FAD.

✓ Site de liaison au substrat

En raison de leur longue chaîne hydrocarbonée séquentielle, le lycopène et le carotène qui pourraient être fixés dans la structure du LCYB sont des molécules hydrophobes.

Le logiciel CAST montre une grande cavité de volume total de 480,14 Å² et une longueur intérieure d'environ 35 Å. Ces dimensions sont proportionnelles au volume et à la longueur d'un grand substrat hydrophobe comme le lycopène.

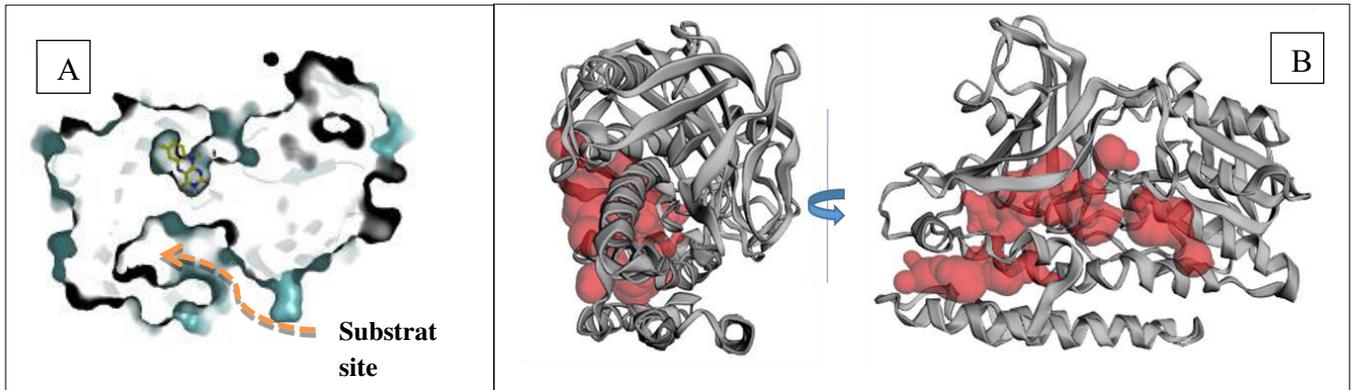


Figure 28. (A) Représentation de la surface de LCYB montrant le tunnel de liaison au substrat avec le site de liaison du FAD avec une molécule de FAD amarrée (Le modèle 3D est présenté comme un modèle de surface de couleur bleue. Le site de liaison au substrat sont indiqués par des flèches en pointillés noirs et marqués de manière appropriée. (B) calcul du volume du site de liaison au substrat à l'aide du programme CAST

2.6.2. Analyse d'alignement de Cgp

Une seule séquence correspondante à « carotène globule protéin » existe dans la banque de donnée NCBI- protéine, est celle de *Duanliella salina* analysé par Davidi et ses collaborateurs en 2014 (Davidi et al., 2014). De plus son blast dans la banque de donnée NCBI montre des identités de l'ordre de 30% avec divers espèce, par exemple 30,6 et 34,45% avec les microalgues *Gonium pectorale* et *Raphidocelis subcapitata* respectivement (figure 29). En outre, aucune structure dans la banque PDB ayant une identité acceptable avec la CGP n'a été trouvéedonc nous n'avons pas pu générer une prédiction de sa structure secondaire et tertiaire.

carotene globule protein [Dunaliella salina]

GenBank: AFU62958.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
Go to:

LOCUS AFU62958 378 aa linear PLN 10-APR-2014
 DEFINITION carotene globule protein [Dunaliella salina].
 ACCESSION AFU62958
 VERSION AFU62958.1
 DBSOURCE accession [JX646677.1](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	carotene globule protein [Dunaliella salina]	781	781	100%	0.0	100.00%	AFU62958.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GPECTOR_463g374 [Gonium pectorale]	117	117	65%	6e-26	30.60%	KXZ41448.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein Rsub_07974 [Raphidocelis subcapitata]	115	115	53%	9e-25	34.45%	GBF94802.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein CK203_088530 [Vitis vinifera]	112	112	68%	4e-24	29.85%	RVW47439.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein AMTR_s00136p00096760 [Amborella trichopoda]	111	111	62%	1e-23	29.54%	ERM94010.1
<input checked="" type="checkbox"/>	uncharacterized protein LOC18421890 isoform X1 [Amborella trichopoda]	111	111	57%	1e-23	29.95%	XP_006826773.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101205468 [Cucumis sativus]	108	108	80%	6e-23	27.04%	XP_004151455.2

Figure 29. Séquence de Cgp choisie de *D. salina* (A) et son alignement dans la banque de donnée du NCBI (B)

2.6.3. prédiction des modifications post-traductionnelles

Les résultats de la recherche de motifs chez la protéine CGP ont montré la présence d'un motif protéique de liaison à l'hème SOUL (PF04832) allant du résidu 283 au résidu 350, tandis que LCYB possédait un motif de liaison au FAD (PF00890) allant du résidu 123 au résidu 154.

La prédiction des modifications post-traductionnelles (PTM) du CGP a révélé la présence de 4 sites de phosphorylation présumés par la protéine kinase C répartis dans la partie N-terminale, de 2 sites probables de N-myristoylation et de 2 sites de sumoylation (tableau 2). Par ailleurs, LCYB possède 8 sites probables de phosphorylation par la protéine kinase C, principalement répartis dans sa partie N-terminale, un site de N-glycosylation (résidu 51), 6 sites de N-myristoylation et un site de sumoylation à probabilité élevée ainsi que deux motifs d'interaction de sumoylation (tableau 15).

Tableau 15. Motifs d'interaction SUMO putatifs dans CGP et LCYB montrant les scores des sites prédits (en gras) et le résidu de lysine impliqué dans l'interaction avec SUMO (souligné)

Enzyme	Position	Groupe	Score
CGP	K308	WLLGM A <u>K</u> PE DEAKK	0,79
	K262	AVSEA F <u>K</u> EG ETEIS	0,68
LCYB	K271	HARKL V <u>K</u> YD QEFNP	0,93
	124 - 128	QRQPAADLLVVGSGPSGLA	0,70
	149 - 153	AGGFSVCVIDLDPYAPMIP	0,62

2.6.4. Modèle 3D global de la protéine SUMO de *D. salina*

La structure prévue de SUMO comprend deux hélices α (α_1 , 41–53; α_2 , 74–79) et un feuillet β torsadé constituée de quatre brins β antiparallèles (β_1 , 19–25; β_2 , 32–37; β_3 , 61–63; β_4 , 85–89) (figure 30). La structure représente un repliement typique « ubiquitine-like ». En fait, une comparaison structurale a montré que la valeur de RMSD entre SUMO de *Dunaliella* et SUMO-Smt3 humain (PDB ID: 1WM3) est de 2,1 Å. Le modèle 3D de SUMO est également très similaire à celui de SUMO de *Saccharomyces cereviceae* Smt313 (PDB ID: 3UF8) avec un RMSD de 2,1 Å, renforçant l'hypothèse de la conservation de la protéine SUMO chez les eucaryotes (Shang et al., 2009).

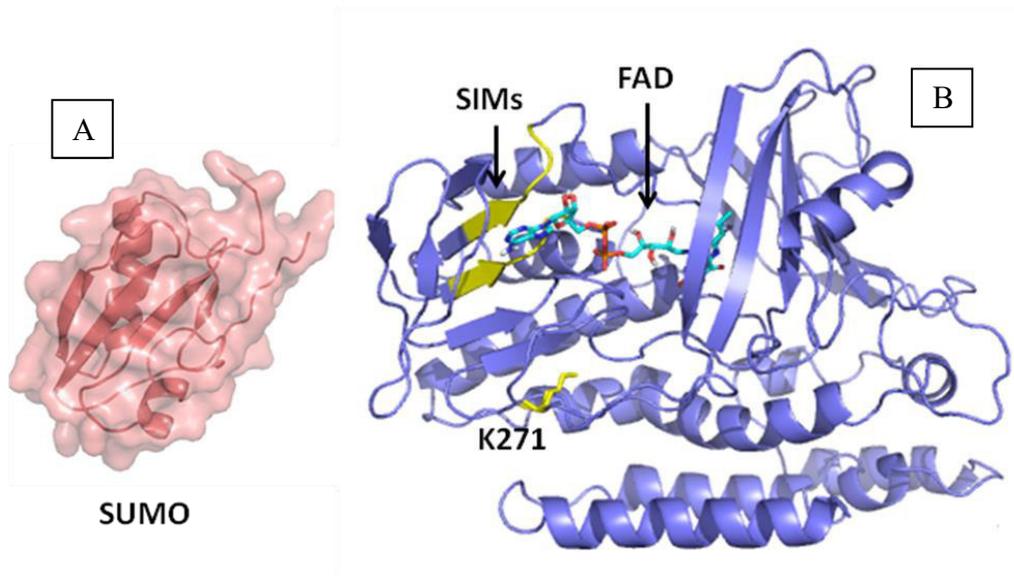


Figure 30. *Modèle 3D de la protéine SUMO de Dunaliella sp. (A) Modèle 3D de LCYB montrant la molécule de FAD ancrée, les motifs d'interaction SUMO et le site de lysine SUMO de couleur jaune (B).*

En fait, la modification post-traductionnelle par SUMO est un mécanisme de régulation majeur pour les fonctions des protéines eucaryotes où SUMO se lie généralement de manière covalente à des cibles spécifiques (résidu de lysine) par le biais d'une succession de «transferts» moléculaires se rapportant à des cascades multienzymatiques consistant en une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2 et une ligase E3. La fixation de SUMO est connue pour contrôler les fonctions cibles, telles que les interactions protéine-protéine, les interactions protéine-ADN et la localisation subcellulaire. SUMO régule également de nombreux processus importants, tels que la signalisation, la transcription, la réparation de l'ADN et d'autres réactions au stress. Chez les plantes, il a été démontré que la sumoylation joue un rôle important dans la réaction au stress et aux agents pathogènes (Enserink, 2015). Pour la microalgue, trois homologues de SUMO et des protéines apparentées à SUMO ont été identifiés chez *C.reinhardtii* et ont été jugés essentiels pour la survie de la souche en situation de stress (Knobbe et al., 2015). En ce qui concerne la régulation de la LCYB par la sumoylation, des recherches récentes ont révélé la détection d'une séquence de reconnaissance de la sumoylation dans la LCYB de *Bixa orellana* qui pourrait moduler l'activité ou la localisation de l'enzyme (Trujillo-Hdz et al., 2016).

Chapitre 2 : activité anticancéreuse de *Dunaliella* sp.

L'activité antiproliférative de *Dunaliella* cultivée dans les deux conditions de culture, citées ci-dessus, a été évaluée par la préparation des extraits de polarités différentes et l'utilisation de diverses lignées cellulaires. Sur la lumière des résultats obtenus suite à ce criblage, l'étude a été focalisée sur l'exploration de l'effet des extraits aqueux de DSC et DSS sur le modèle du carcinome mammaire murin 4T1 *in vitro* et *in vivo*.

1. Evaluation de l'activité des extraits de *Dunaliella* *in vitro*

Dans un premier instant, l'effet des extraits a été testé sur les cellules 4T1. L'extrait ayant présenté la meilleure activité a été sélectionné pour la suite des analyses du mode de mort cellulaire.

1.1. Sensibilité des cellules 4T1

La première étape de cette analyse est de cribler l'extrait parmi les trois testés (éthanolique, hydroalcoolique ou aqueux) ayant la meilleure activité antiproliférative contre les cellules 4T1. Pour cela, le test XTT permettant de quantifier la viabilité cellulaire a été utilisé avec différentes doses des extraits.

1.1.1. Activité de DSC

L'évaluation de la viabilité cellulaire après 24 h de traitement montre que l'extrait aqueux présente une activité significative aux doses de 0,75 et 1 mg/ml avec une réduction de la viabilité de 40 et 90%, respectivement. Cet effet s'avère temps dépendant étant donné qu'avec 1mg/ml d'extrait, nous arrivons à avoir uniquement 4% des cellules vivantes à 48 h. Une très faible dose d'extrait aqueux de 0,1 mg/ml est suffisante pour avoir une réduction de la viabilité de 17% à 48 h de traitement. Les activités antiprolifératives des extraits hydroalcoolique et éthanolique se sont avérées non-significatives à 24 h. Cependant, elles deviennent significatives à 48 h. A titre d'exemple, l'extrait à l'éthanol devient capable de réduire la viabilité des cellules tumorales à 60% pour la dose de 1 mg/ml contre des effets de 40 et 20 % pour l'extrait hydroalcoolique administré à 1 et 0,2 mg/ml, respectivement. Ces résultats sont présentés en détail dans la figure 31 et s'avèrent en accordance avec des études précédentes étudiant l'activité de l'extrait éthanolique de *Dunaliella salina* contre le cancer de

poumon A549 (Sheu et al., 2008) et le carcinome cutané A431 (Emtyazjoo et al., 2012). Ces auteurs ont montré que l'extrait éthanolique de cette souche a induit l'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire au stade G0/G1 (Sheu et al., 2008; Emtyazjoo et al., 2012). L'effet de l'extrait à 70% d'éthanol a été également essayé contre les cellules leucémiques HL-60 et MV-4-11 (Bechelli et al., 2011) et a montré des résultats similaires. Peu ou pas d'études ont été effectuées sur l'extrait aqueux de *D. salina*.

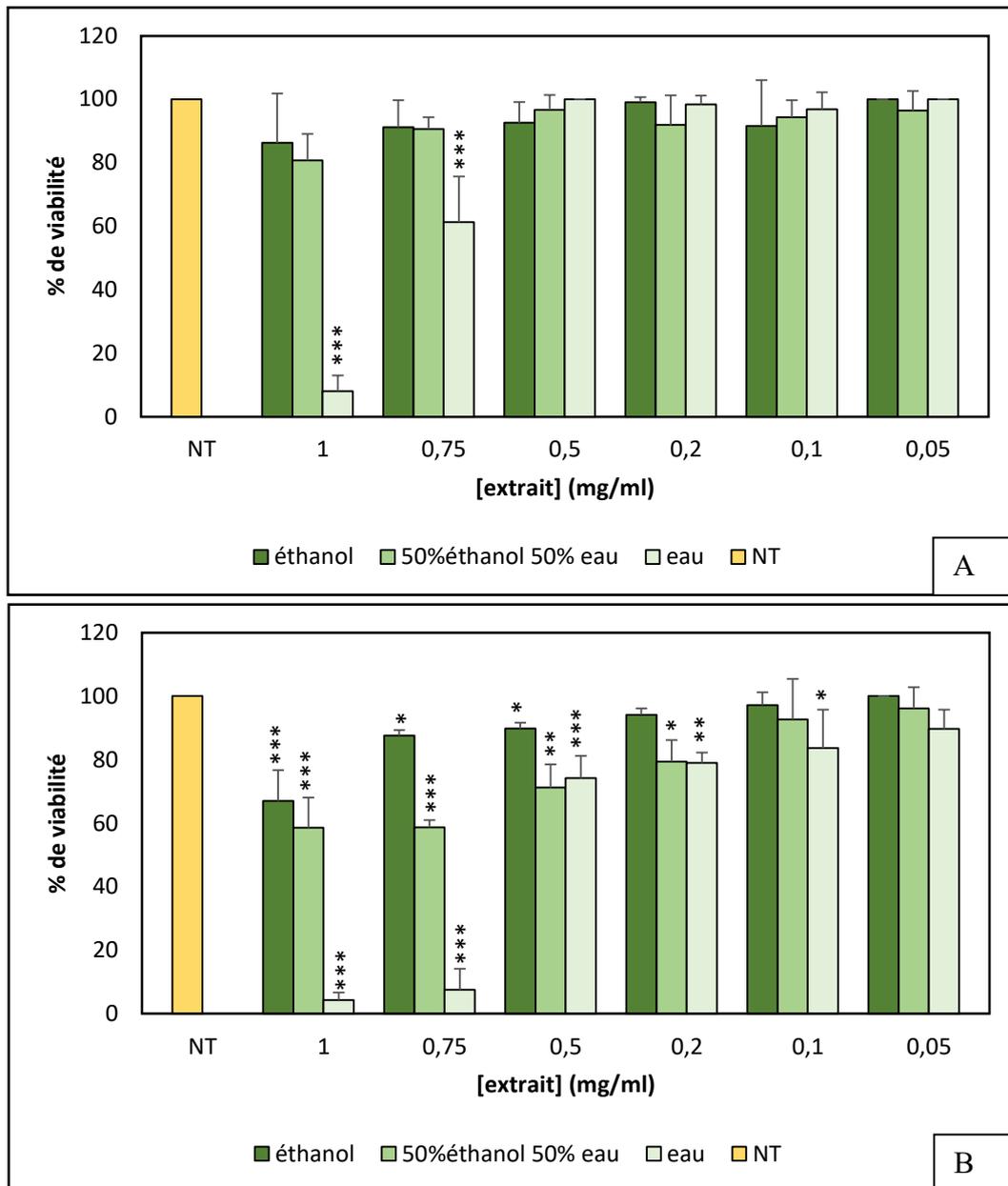


Figure 31. Histogrammes représentant les pourcentages de viabilité des cellules 4T1 après traitement avec les extraits de DSC pendant (A) 24 h et (B) 48 h.

1.1.2. *Activité de DSS*

L'extrait éthanolique de DSS n'a pas montré d'activité antiproliférative à 24 et 48 h mais plutôt il a stimulé la croissance cellulaire avec des pourcentages de viabilité de plus de 100% (Figure 32). De même, l'extrait hydroalcoolique n'a pas présenté d'activité significative à 24 et 48 h. Cependant, l'extrait aqueux a montré une toxicité assez élevée avec une mortalité de plus de 90% à 24 h à des concentrations entre 0,5 et 1 mg/ml. Ceci suppose que l'activité antiproliférative provienne des composés hydrophiles ayant été surproduits suite au stress et extraits dans l'extrait aqueux. A 48 h de traitement, une viabilité entre 4 et 22% a été enregistrée pour des concentrations d'extrait aqueux entre 1 et 0,2 mg/ml, respectivement (figure 32). A des concentrations plus faibles à 0,2 mg/ml, cet effet diminue de façon remarquable jusqu'à avoir 100% de viabilité cellulaire.

L'absence intrigante de l'activité antiproliférative des extraits éthanoliques de DSS pourrait être expliquée par les hypothèses suivantes:

- L'extrait obtenu soit plus riche en forme all-trans- β -carotène que la forme 9-cis
- La forme 9-cis qui est trop sensible ait subi une modification au cours du processus d'extraction
- Insuffisance des composés actifs dans l'extrait aux doses utilisées
- La non-toxicité de l'extrait contre les cellules 4T1.

En effet, quelques études ont montré que le β -carotène pourrait être associé à une augmentation significative de l'incidence du cancer du poumon, des maladies cardiovasculaires et de la mortalité totale (chez les fumeurs essentiellement et les travailleurs de l'amiante). Ce pouvoir co-cancérogène est relié à la stimulation de différents mécanismes qui impliquent l'induction du cytochrome P450 (CYP). Ce dernier entraîne une bioactivation accrue des procarcinogènes et / ou une augmentation des niveaux de ROS augmentant ainsi le risque de tumorigenèse (Paolini et al., 2003, 1999). D'autres auteurs ont précisé que la forme all-trans du β -carotène est cancérigène ce qui fait que plus le rapport forme 9-cis/ all-trans est grand, plus le pouvoir antioxydant et antiprolifératif du β -carotène est important (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009).

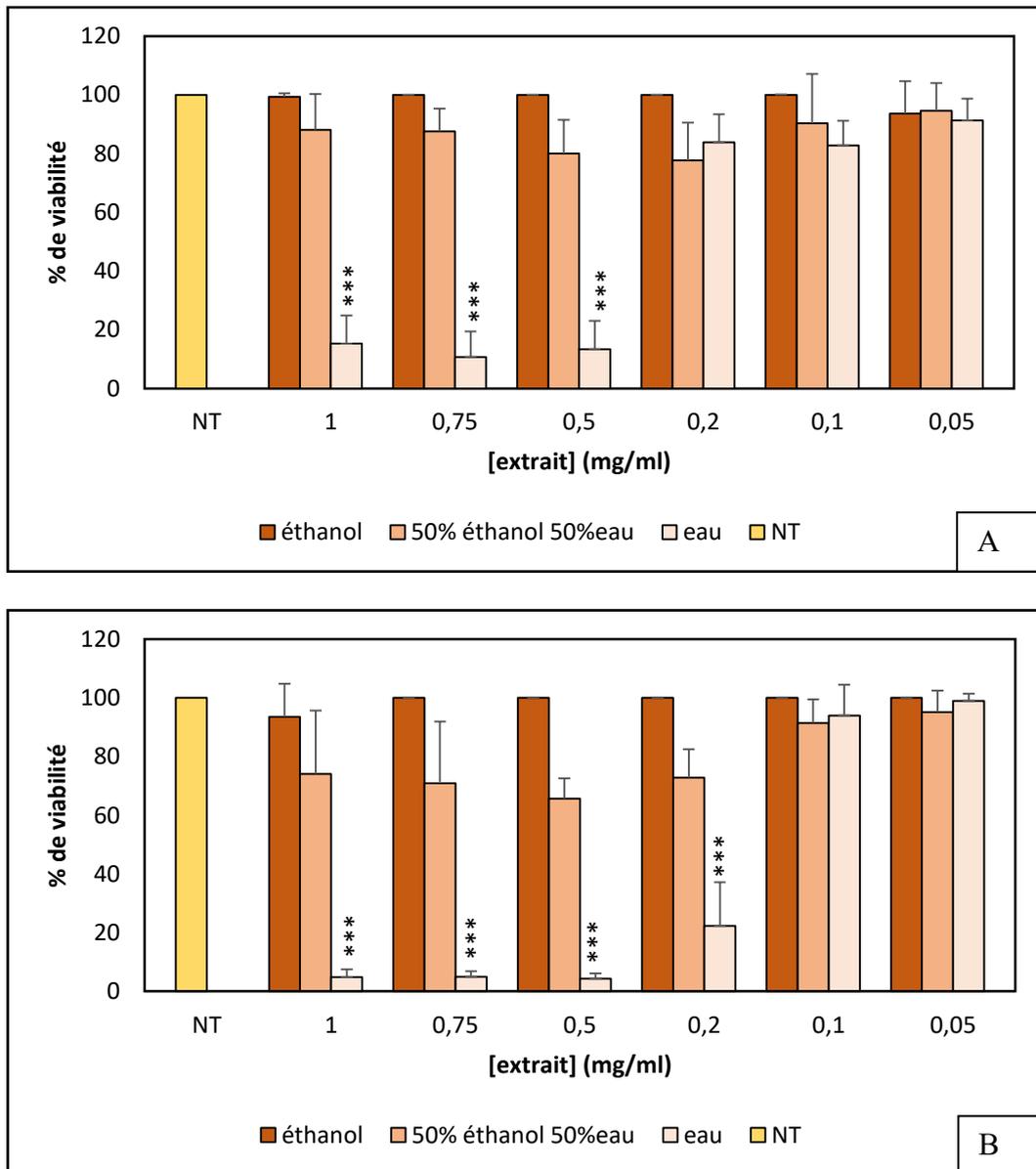


Figure 32. Histogrammes représentant les pourcentages de viabilité des cellules 4T1 après traitement avec les différents extraits DSS pendant (A) 24 h et (B) 48 h.

1.1.5. Calcul des CI50

Le caractère dose-dépendant démontré précédemment a permis d'établir les doses minimales pour avoir 50% de mort cellulaire en représentant les pourcentages de viabilité en fonction des logarithmes décimaux des concentrations après 24 h et 48 h de traitement (figure 33). De ces résultats, il en ressort que l'extrait aqueux de DSS soit plus actif que celui de DSC et que cet effet augmente au cours du temps. Après 24 h de traitement, la CI50 de DSC est de $804,41 \pm 46,29 \mu\text{g/ml}$ contre $317,21 \pm 26,12 \mu\text{g/ml}$ pour DSS. Ces valeurs diminuent après 48

h de traitement à $608,18 \pm 8,68 \mu\text{g/ml}$ et $149,89 \pm 8,68 \mu\text{g/ml}$ pour DSC et DSS, respectivement.

A nos connaissances, aucune étude n'a auparavant mis en évidence l'activité anticancéreuse de l'extrait aqueux de *Dunaliella*. Cependant, l'eau a été largement utilisée comme solvant chez les végétaux et d'autres microalgues vertes, étant donnée son caractère « sage ». L'extrait ainsi obtenu est facilement lyophilisable et soluble dans les milieux de culture permettant ainsi d'éviter la solubilisation de l'extrait dans du DMSO comme le cas pour les extraits éthanoliques. De plus, *Dunaliella* est caractérisée par l'absence d'une membrane rigide (Hosseini Tafreshi et Shariati, 2008) ce qui fait qu'une simple sonication permette d'éclater les cellules et de récupérer la majorité de leur contenu dans le surnageant expliquant ainsi l'importance de l'activité trouvée. Un extrait aqueux de la microalgue verte *Chlorella vulgaris* présente une activité de 30% contre les cellules Ehrlich ascites carcinome EACC et 55% contre le cancer de foie humain HepG2 (Shanab et al., 2012). Un extrait aqueux soniqué d'un mélange de microalgues est également apparu efficace contre différents types de cancer : de poumon (A549, H460), de prostate (PC3, DU145), de l'estomac N87, de sein MCF7, de pancréas BxPC3 et des os MNNG (Somasekharan et al., 2016).

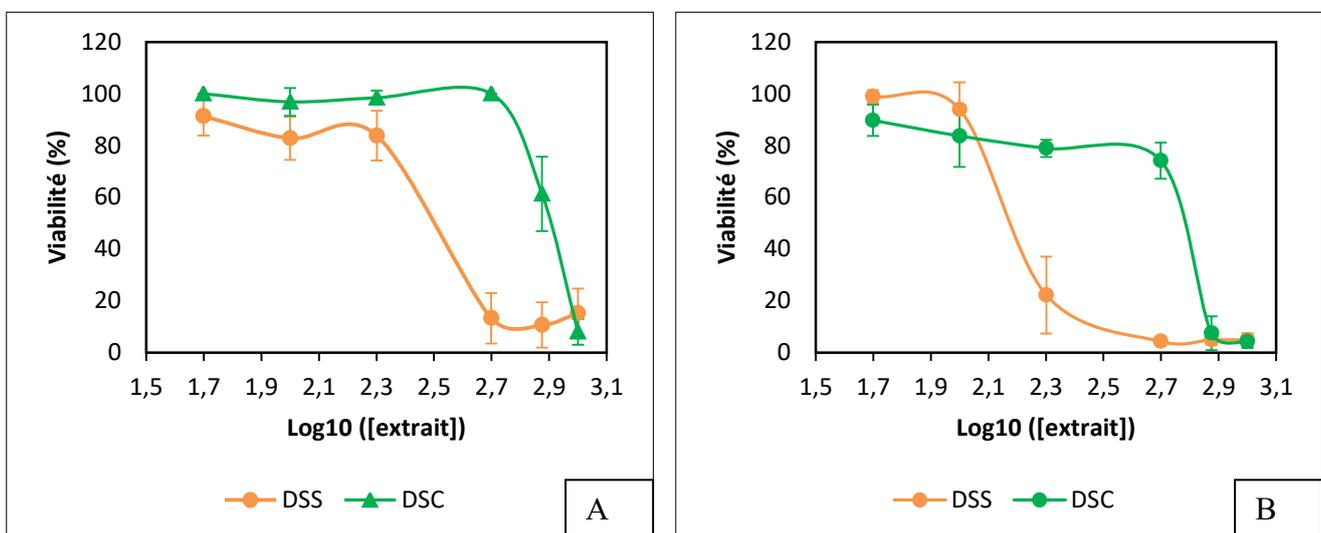


Figure 33. Les CI50 des extraits aqueux de DSS et DSC suite au traitement des cellules 4T1 pendant (A) 24 h et (B) 48 h

1.2. Evaluation de la cytotoxicité sur des cellules A549 et des cellules HeLa

L'extrait aqueux a été retenu pour la suite des analyses vu son pouvoir antiprolifératif. Afin de vérifier si ces extraits soient tumeur-spécifiques, leur pouvoir anticancéreux a été testé sur les cellules des carcinomes humaines, A549 (cancer du poumon) et HeLa (cancer col de l'utérus). La figure 34 présente le calcul des CI50. Concernant les cellules tumorales A549, les CI50 enregistrées sont $358,2 \pm 43,63 \mu\text{g/ml}$ et $378,11 \pm 16,62 \mu\text{g/ml}$ d'extrait de DSC et DSS, respectivement avec une différence statistiquement non significative. La réponse des cellules HeLa aux extraits est comparable à celle des 4T1 où l'effet de l'extrait aqueux de DSS (CI50 = $175,84 \pm 5,72 \mu\text{g/ml}$) s'avère deux fois plus toxique que celui de DSC (CI50 = $297,51 \pm 1,45 \mu\text{g/ml}$).

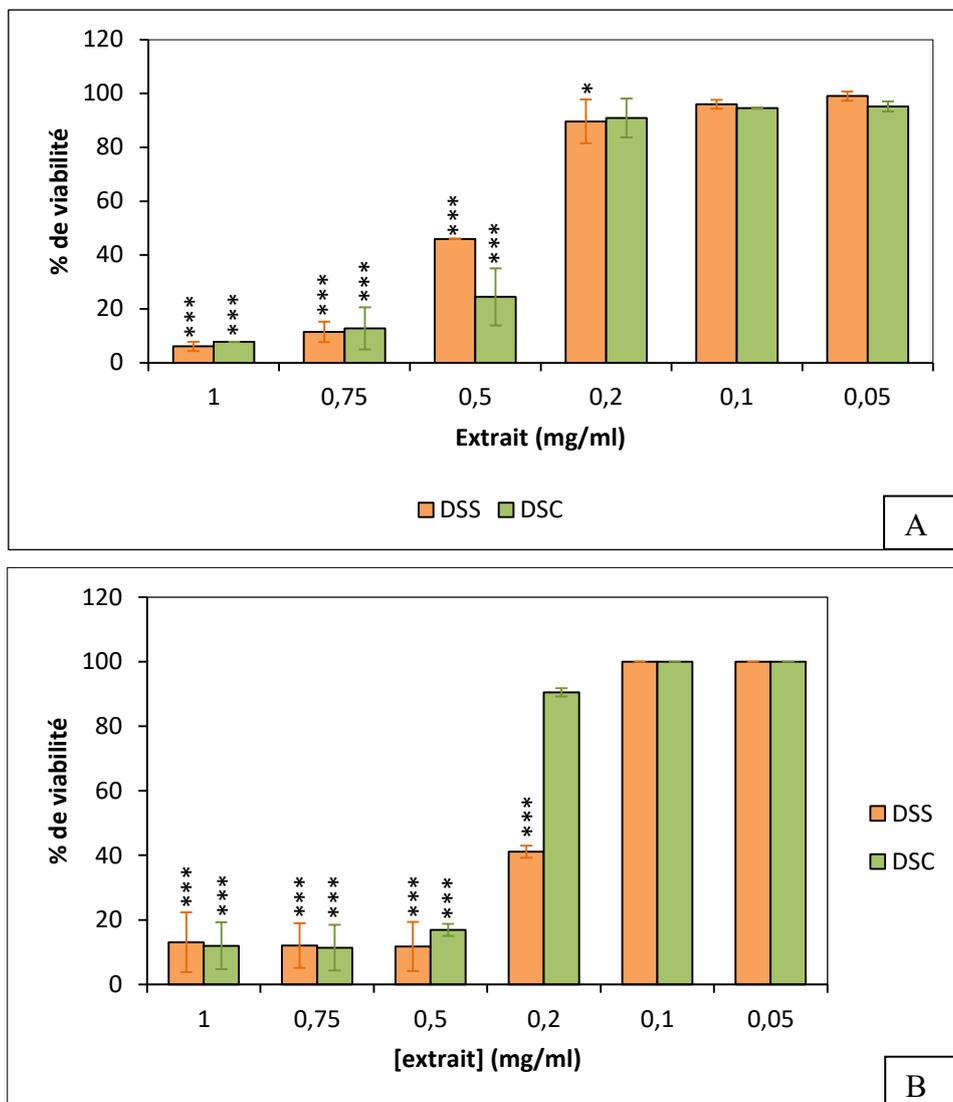


Figure 34. Histogrammes représentant le pourcentage de viabilité des cellules (A) A549, (B) HeLa, après traitement pendant 48 h avec des extraits aqueux de DSC et DSS

1.3. Relargage de LDH

Les cellules mortes perdent leur intégrité membranaire ce qui entraîne la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. La mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée est généralement associée à la mort nécrotique (nécrose primaire) et dans certains cas détectée dans la dernière phase de l'apoptose (Chan et al., 2013). Dans notre cas, le test LDH a montré une sensibilité plus grande que le test XTT. En effet, les pourcentages de cytotoxicité mesurés à 24 h par le test LDH correspondent à ceux détectés après 48 h par le test XTT. Il a été également mentionné à travers d'autres études que la LDH peut être plus fiable que le XTT (Specian et al., 2016) bien que ce dernier mesure l'activité de la déshydrogénase mitochondriale dans les cellules vivantes alors que la LDH révèle un état avancé de mort cellulaire suite à son relargage autrement dit suite à l'éclatement des cellules. Nous avons pu montrer d'après ce test que l'extrait DSS est plus toxique sur les cellules 4T1 que celui du DSC (figure 35). En effet, après 24 h de traitement, 83% des cellules 4T1 ont relargué leur contenu à 0,5 mg/ml d'extrait aqueux de DSS, contre seulement 10% pour celles traitées aux extraits DSC.

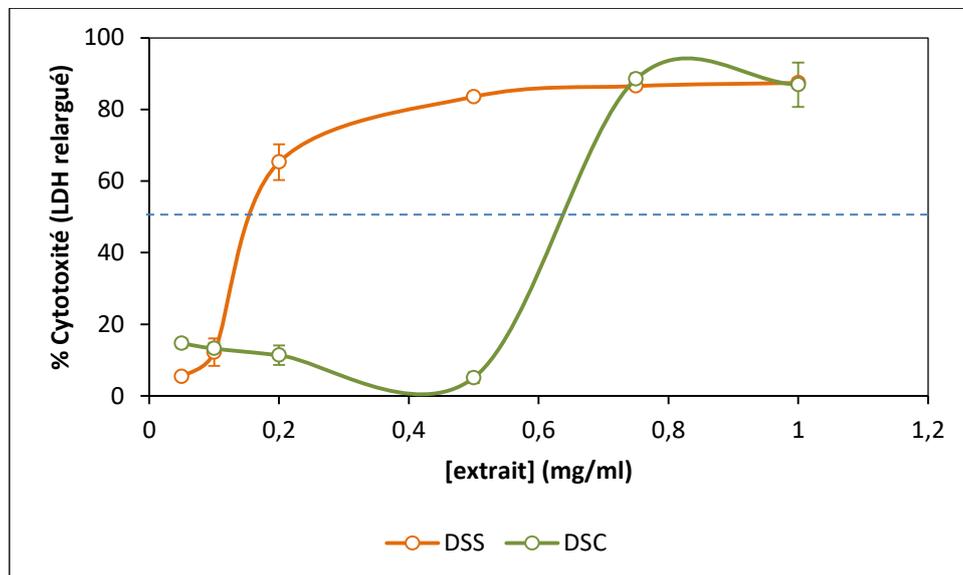


Figure 35. Evaluation de la cytotoxicité des extraits aqueux par mesure du relargage de la LDH après 24 h de traitement.

1.4. Test au Cristal violet

Une autre méthode permettant de visualiser à l'œil nu l'effet des extraits sur les cellules 4T1 après traitements est la coloration au cristal violet. Ce dernier se lie aux protéines et à l'ADN des cellules vivantes restant attachées à la plaque éliminant ainsi les cellules mortes qui perdent leur pouvoir d'adhérence (Feoktistova et al., 2016). Moyennant ce test, nous avons pu mettre en évidence les résultats obtenus par les tests précédents en montrant clairement la différence de toxicité entre les extraits DSC et DSS. En effet, l'extrait DSS s'avère plus toxique et génère plus de détachements cellulaires de manière dose dépendante (figure 36). Les pourcentages de viabilité obtenus par le test XTT à 48 h sont bien visualisés par la coloration au cristal violet.

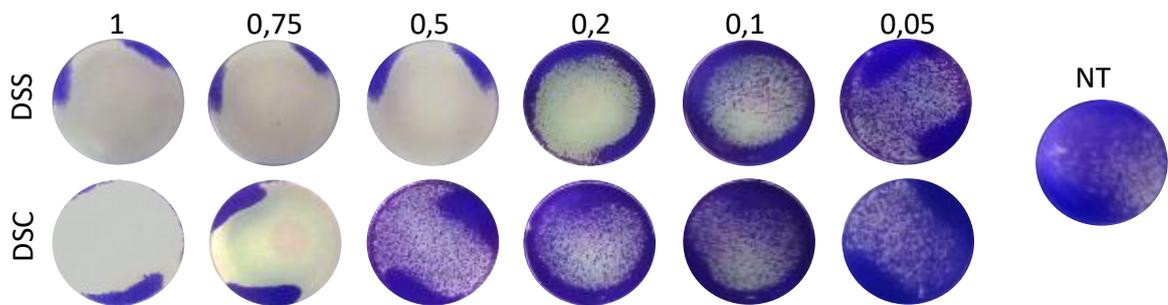


Figure 36. Coloration au cristal violet après traitements aux extraits aqueux de DSC et DSS pendant 48 h.

1.5. Dosage des espèces réactives d'oxygène (ROS)

La détection de la production des ROS a été faite moyennant la sonde fluorescente DHR123. L'extrait de DSS qui cause plus d'endommagement cellulaire entraîne une augmentation du stress oxydatif révélé par une production accrue de ROS dès 24 h de traitement (figure 37). La production de ROS peut conduire au déclenchement de l'apoptose par oxydation des pores mitochondriaux (Kim et al., 2018). Il pourrait être ainsi considéré comme un précurseur du processus de la mort cellulaire.

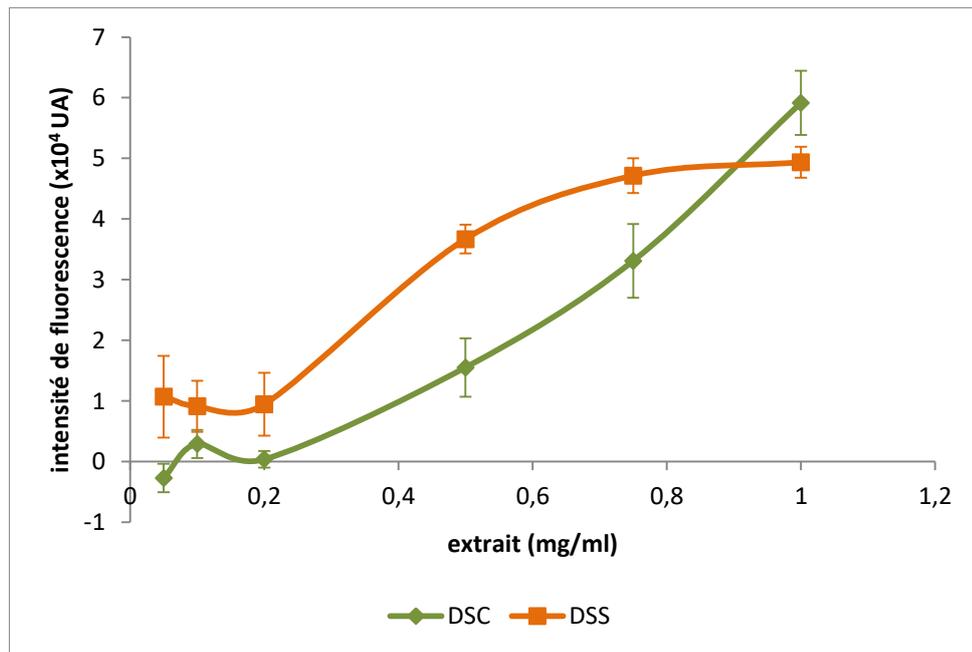


Figure 37. Production des ROS suite au traitement aux extraits aqueux pendant 24

1.6. Annexine V/PI

Dans le but de mieux illustrer le mode de mort cellulaire et de comprendre le mécanisme d'action des extraits, le test à l'annexine V/PI a été utilisé afin de pouvoir différencier entre les diverses étapes de mort cellulaire:

- Cellules vivantes: An^-/PI^-
- Cellules en phase précoce d'apoptose: An^+/PI^-
- Cellules en phase tardive d'apoptose ou nécrotique : An^+/PI^+
- Cellules nécrotiques ou débris cellulaires : An^-/PI^+

Ces différences ont été attribuées grâce à la propriété des cellules apoptotiques à exposer à leur surface les phosphatidylsérines auxquels se lie l'annexine V-FITC (figure 38). Au stade tardif d'apoptose ou à la nécrose, la membrane cellulaire est rompue, permettant l'entrée de PI pour marquer l'ADN.

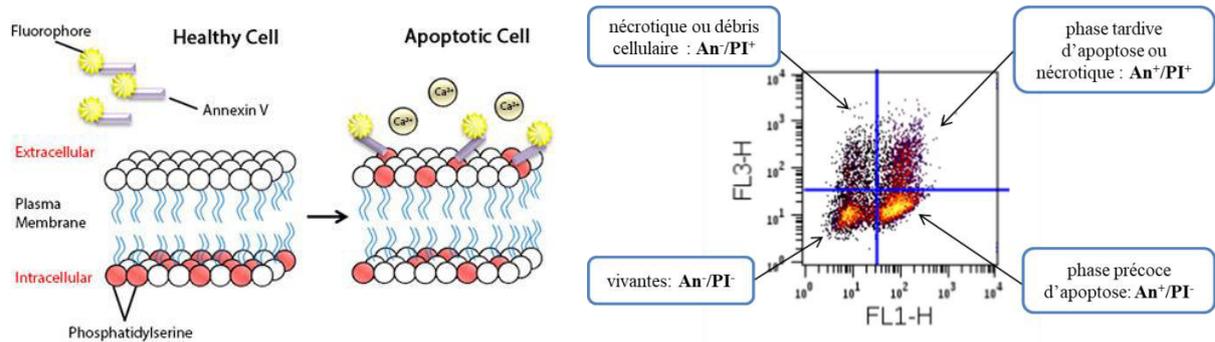
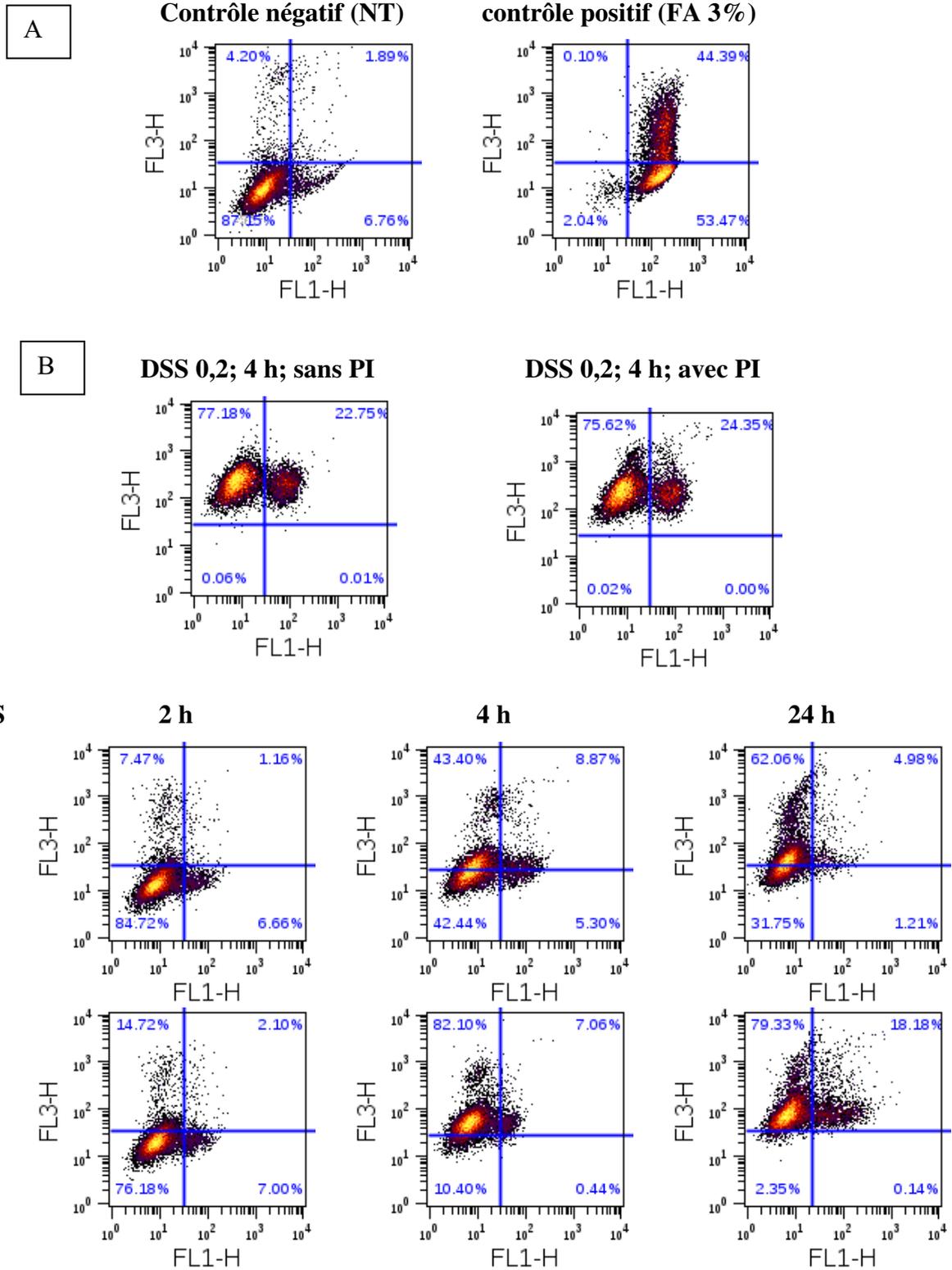


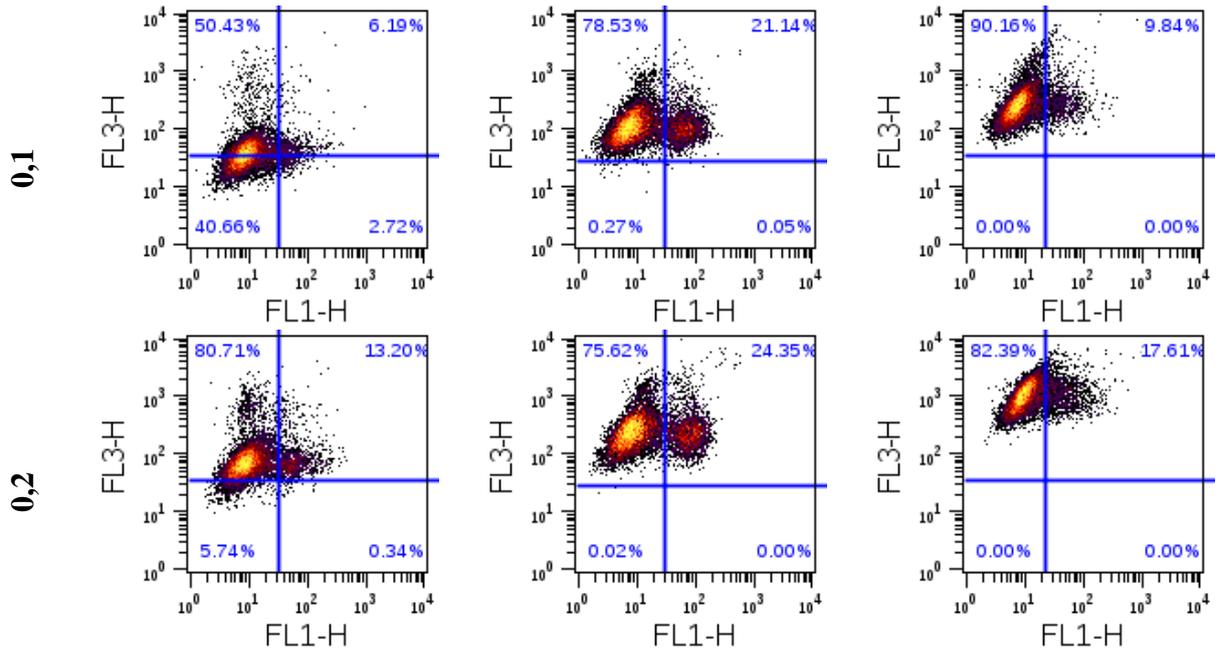
Figure 38. Principe du marquage à l'Annexine V/PI

Nous avons remarqué qu'environ 6,7% des cellules NT sont en apoptose. Ceci est expliqué par le fait que l'apoptose soit un mécanisme spontané se produisant dans toutes les cellules. En utilisant ce test, les cellules traitées au formaldéhyde à 3% et incubées 30 min dans la glace ont été considérées comme contrôle positif (FA3%) où nous avons remarqué clairement un shift des cellules en An^+ (figure 39 A). En ce qui concerne les échantillons traités par DSC ou DSS, nous nous sommes éloignés des doses létales en se mettant à des concentrations inférieures aux CI50 précédemment évaluées. Dès les premiers 2h, nous avons constaté que la majorité des cellules apparaissent comme PI^+ pour les traitements de DSS et DSC. Ceci nous a poussé à proposer plusieurs hypothèses : i) les cellules meurent directement par nécrose ce qui est peu probable puisque par les tests précédents ont confirmé la viabilité des cellules suite aux traitements à 24 h par 0,1 mg/ml de DSS ou de DSC. ii) l'existence de résidus d'extraits qui restent accrochés sur la membrane des cellules et résistants aux lavages. Ces résidus interfèrent avec la fluorescence de PI sur FL3 (680 nm).

Ainsi, les cellules 4T1 traitées pendant 4h à 0,2 mg/ml d'extrait DSS, ont été analysées avec et sans marquage PI, et aucune différence n'a été enregistré sur FL3 (figure 39B). Ces résultats confirment la présence d'une fluorescence provenant des cellules traitées qui camoufle la fluorescence de PI. Malgré cela, nous avons pu constater l'apparition de population An^+/PI^+ de 6,19 % et 13,20% à 2h pour les traitements à 0,1 et 0,2 mg/ml de DSS, respectivement (figure 39C). Ces pourcentages augmentent à 4h de traitement à 21% et 24%, respectivement puis diminuent à 24 h de traitement en migrant en An^-/PI^+ . De même, pour le traitement de DSC à 0,2 mg/ml, la population An^+/PI^+ est de 12% à 4h, elle augmente à 24 h à

32% (figure 39D). D'ici, nous pouvons supposer que les extraits induisent la mort cellulaire par apoptose, avec un peu plus rapidement pour les extraits de DSS.





D

DSC

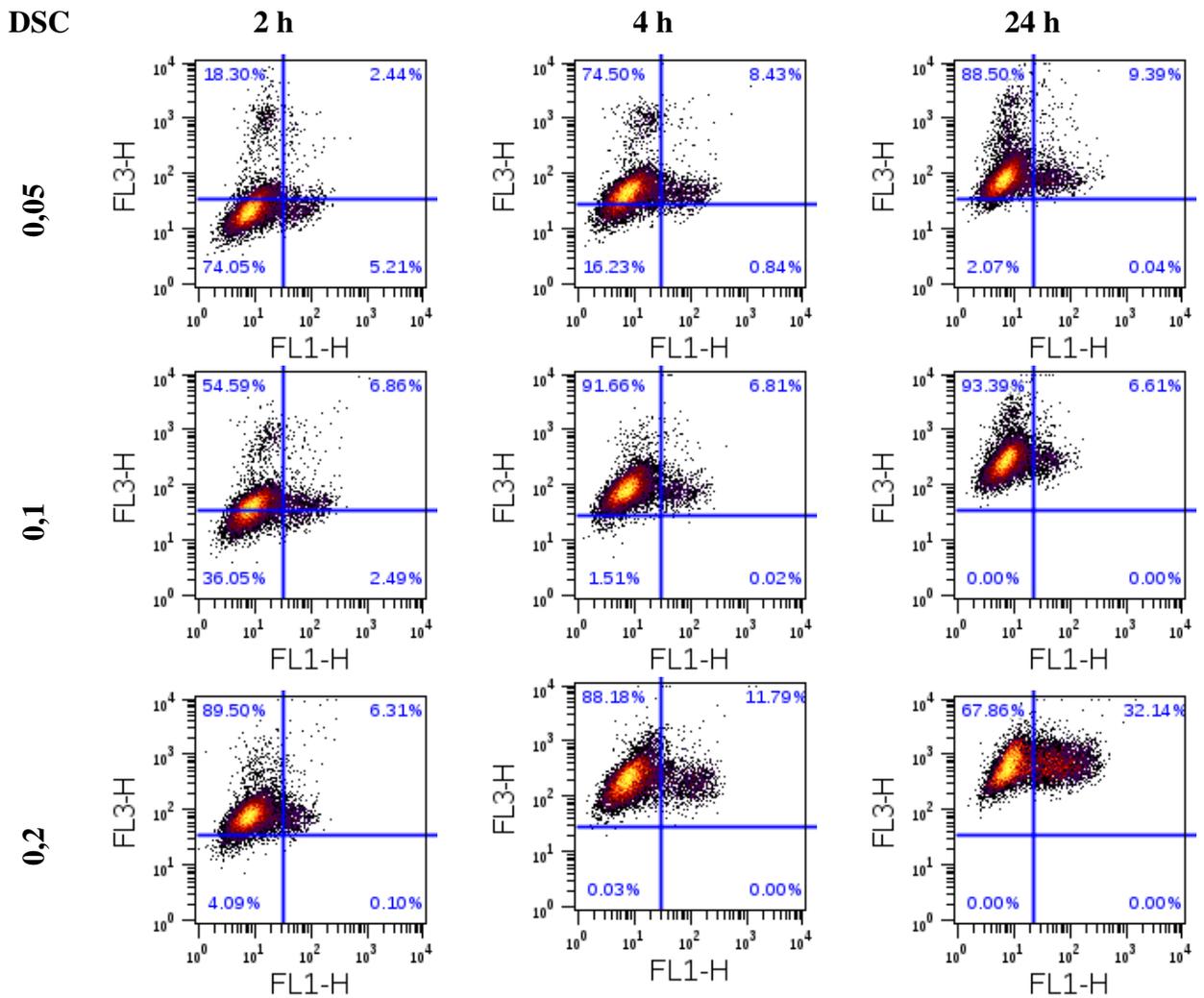


Figure 39. Visualisation du mécanisme d'apoptose par test Annexine V/PI, (A) contrôle négatif (cellules NT) et contrôle positif (traitement au FA3% dans la glace pendant 30 min), (B) vérification de la supposition du camouflagement de la fluorescence de PI par analyse des cellules traitées au DSS 0,2 pendant 4h avec et sans marquage PI, (C) traitement des cellules 4T1 à l'extrait aqueux de DSS pendant 2, 4 et 24 h aux doses 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 mg/ml, (D) traitement des cellules 4T1 à l'extrait aqueux de DSC pendant 2, 4 et 24 h aux doses 0,05, 0,1 et 0,2 mg/ml

1.7. Mesure de l'autofluorescence des extraits

Comme nous avons douté que nos extraits soient fluorescents, nous avons opté dans un premier temps à établir leurs courbes de fluorescences à une excitation de 488 nm (Figure 40). Les spectres obtenus montrent un pic d'émission à 686 (entre 650 et 780 nm) pour les deux extraits correspondant à la fluorescence de la chlorophylle. Un deuxième pic à 543 nm (entre 500 et 600 nm) est enregistré de façon spécifique au niveau de l'extrait DSS correspondant à la fluorescence des caroténoïdes (Kleinegris et al., 2010).

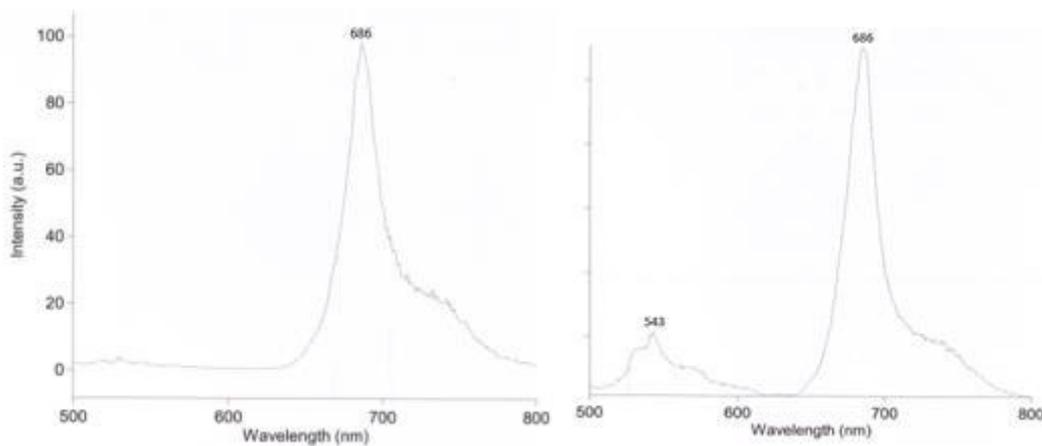


Figure 40. Spectre de fluorescence des extraits aqueux de DSC et DSS solubilisés dans du PBS à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm

1.8. Observations microscopiques des cellules 4T1

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les cellules par microscopie à épifluorescence et confocale.

1.8.1. Observation au microscope épifluorescent

L'observation des cellules traitées pendant 6h aux extraits DSC et DSS administrés aux doses de 1 et 0,5 mg/ml, montre une forme cellulaire ronde et agglomérée avec un cytoplasme bien fluorescent (Figure 41).

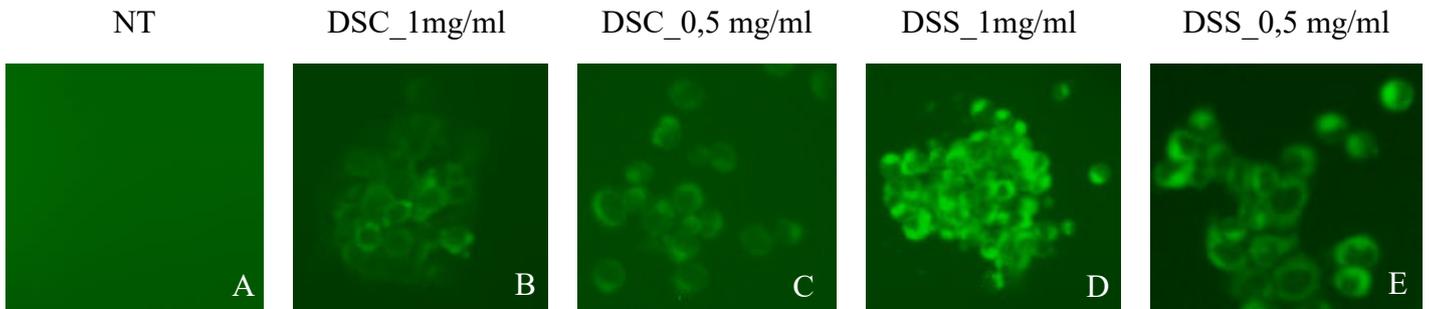


Figure 41. Fluorescence des cellules 4T1 traitées pendant 6h aux extraits aqueux de DSC et DSS, (A) contrôle négatif, cellules non traitées; (B) DSC à la dose 1 mg/ml (C) DSC à la dose 0,5 mg/ml, (D) DSS à la dose 1 mg/ml, (E) DSS à la dose 0,5 mg/ml

1.8.2. Observation au microscope confocale

Afin de fournir une analyse plus profonde, nous avons opté à observer les cellules traitées au microscope confocale. De ces résultats, il en ressort une infiltration et concentration des extraits dans l'espace périnucléaire (figure 42). Ces observations confirment encore une fois le non efficacité des tests fluorescents pour l'analyse de la voie de mort cellulaire.

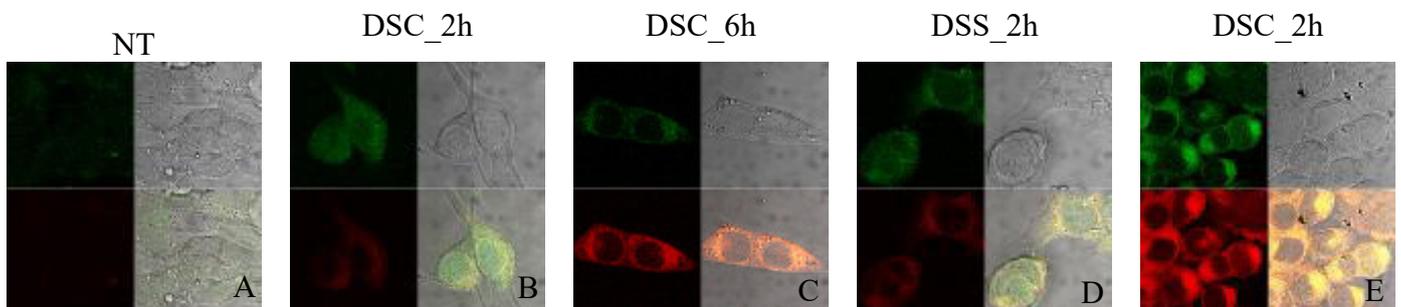


Figure 42. Analyse par microscopie confocale de cellules 4T1 traitées aux extraits aqueux DSC et DSS (1 mg/ml). (A) contrôle négatif, cellules non traitées; (B) traitement avec l'extrait

DSC pendant 2h, (C) traitement avec l'extrait DSC pendant 6h, (D) traitement avec extrait DSS pendant 2h, (E) traitement avec extrait DSS pendant 6h.

1.9. Fragmentation de l'ADN suite à la mort cellulaire

L'aspect de l'ADN est affecté suivant le mode de mort cellulaire. Pour cela, nous avons adopté les deux techniques 'non-fluorescentes' suivantes : visualisation de l'ADN génomique sur gel d'agarose et le test TUNEL.

1.9.1. Analyse de la mort cellulaire par Profil de fragmentation de l'ADNg

L'aspect de fragmentation de l'ADNg peut nous renseigner sur la nature de la mort cellulaire (par apoptose ou par nécrose). Dans le cas d'apoptose, l'ADN se présente sous forme d'échelle suite à la fragmentation de la chromatine en plusieurs unités de nucléosomes ayant une taille de 180 pb. Cette catalyse est induite par le clivage par la caspase-3 du complexe chaperon ICAD en CAD actives situées dans le noyau (DNases activées par la caspase). D'autres endonucléases ont été identifiées pour être impliquées dans l'apoptose telles que l'endonucléase G (Endo G) qui migre des mitochondries vers le noyau pour cliver l'ADN chromosomique. La DNase γ se situe dans l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique de cellules vivantes et se transfère dans le noyau des cellules mortes, où elle induit la fragmentation de l'ADN internucléosomique (Mizuta et al., 2013). Cette enzyme est également impliquée dans la fragmentation de l'ADN durant la nécrose (Mizuta et al., 2013).

La figure 43 montre la migration sur gel d'agarose à 1,5% de l'ADNg extrait à partir des cellules 4T1 traitées à la staurosporine 10 μ M pendant une nuit. Nous observons à travers cette figure l'aspect échelle de l'ADN migré. Les traitements des cellules avec 0,5 et 0,2 mg/ml d'extrait DSS et avec 0,75 et 0,5 mg/ml d'extrait DSC pendant 48 h ne montrent pas clairement la formation d'échelle comme c'est le cas suite au traitement à la staurosporine. Moyennant cette technique, nous n'avons pas pu également bien visualiser l'ADN non traité. De ce fait nous avons eu recours à une technique plus sensible à la fragmentation de l'ADN qui est le test TUNEL.

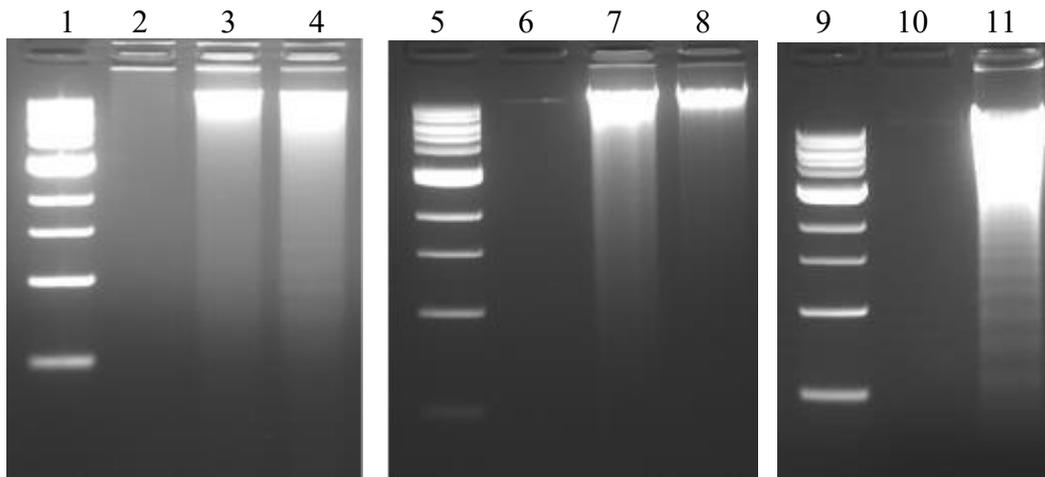


Figure 43. Électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des ADNg de cellules 4T1 incubées pendant 48 h avec les extraits aqueux DSC et DSS. Pistes 1, 5 et 9 : marqueur moléculaire de 1 kb, pistes 2, 6 et 10 : ADN de cellules 4T1 non traitées, piste 3 : traitement avec l'extrait DSC à 0,5 mg/ml, piste 4 : traitement avec l'extrait DSC à 0,75 mg/ml, piste 7 : traitement avec l'extrait de DSS à 0,5 mg/ml, piste 8 : traitement à 0,2 mg/ml de l'extrait DSS, piste 11 : traitement à la Staurosporine (témoin positif).

1.9.2. Test TUNEL

Ce test permet la détection *in situ* des cellules apoptotiques. Les fragments d'ADN générés suite à l'action de l'endonucléase CAD exposent leurs extrémités 3'-OH. Ils peuvent ainsi être détectés par marquage colorimétrique. En effet, les cellules apoptotiques auront un noyau coloré en brun foncé. En appliquant ce test en fonction du temps et de la dose, nous avons visualisé cette coloration brun foncé au niveau du contrôle positif suite au traitement à la DNase et dans les cellules traitées aux extraits de DSC et DSS (figure 44). Le traitement des cellules 4T1 par l'extrait DSS à 0,2 mg/ml pendant 18 à 24 h a révélé une augmentation de la coloration nucléaire et un détachement cellulaire. L'augmentation de la concentration à 0,5 mg/ml a clairement mis en évidence un fort pourcentage de détachement des cellules et une intense coloration des noyaux cellulaires. De même pour le traitement avec l'extrait de DSC, une coloration nucléaire qui augmente de 18 à 24 h a été également visualisée. Les cellules non traitées présentent un nombre limité de noyaux à coloration brune étant donné que l'apoptose soit un mécanisme ordinaire qui se produit dans toutes les cellules. Cependant, les cellules du contrôle négatif ne révèlent aucune coloration nucléaire.

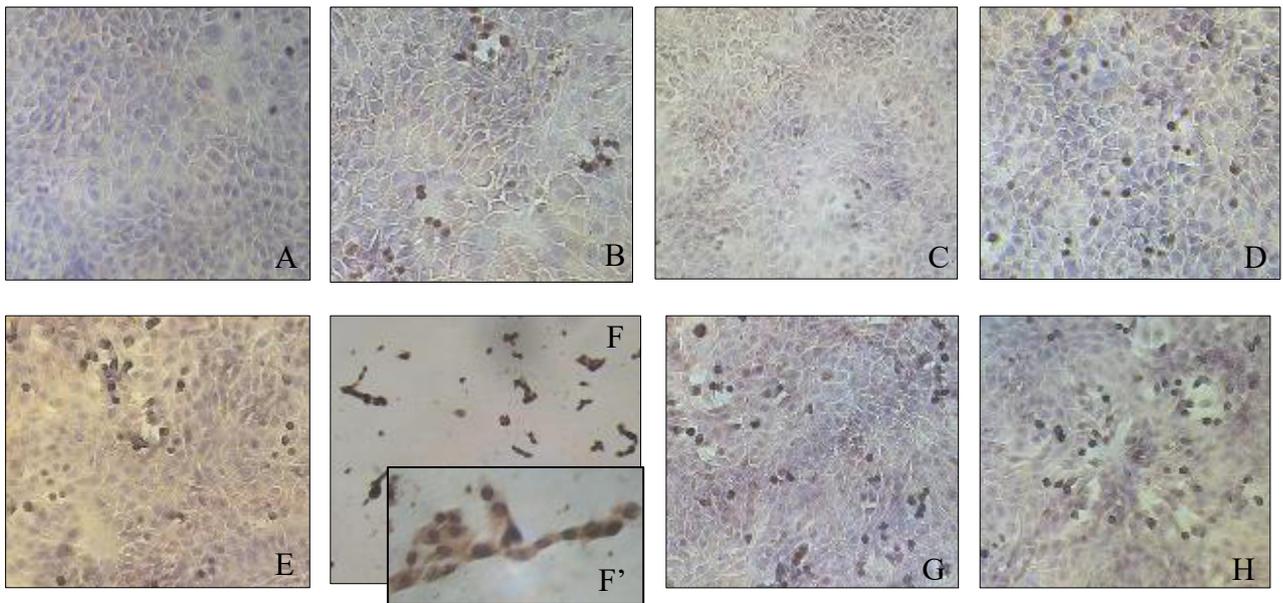
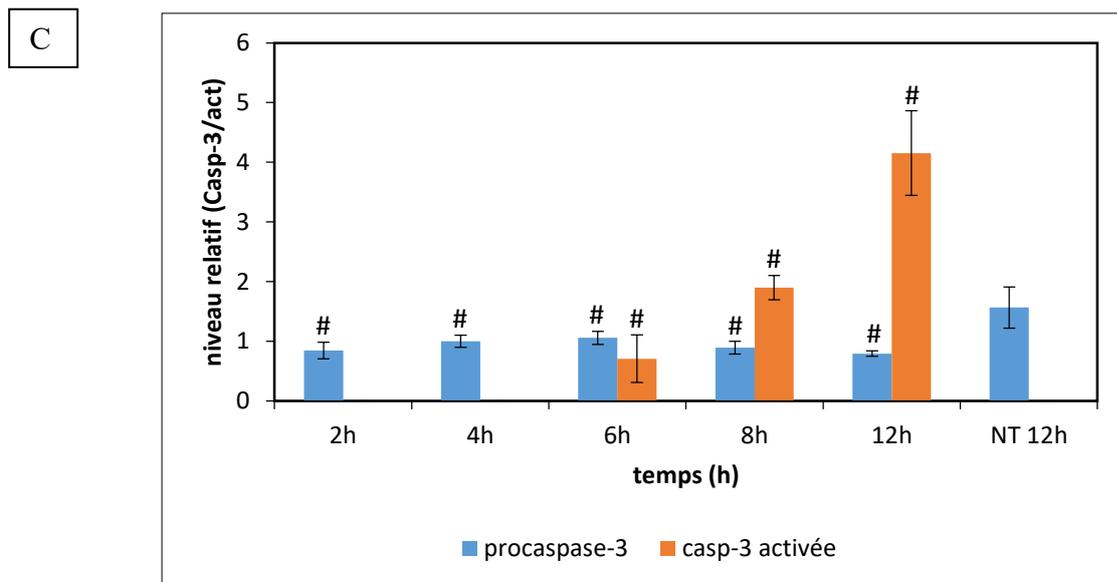
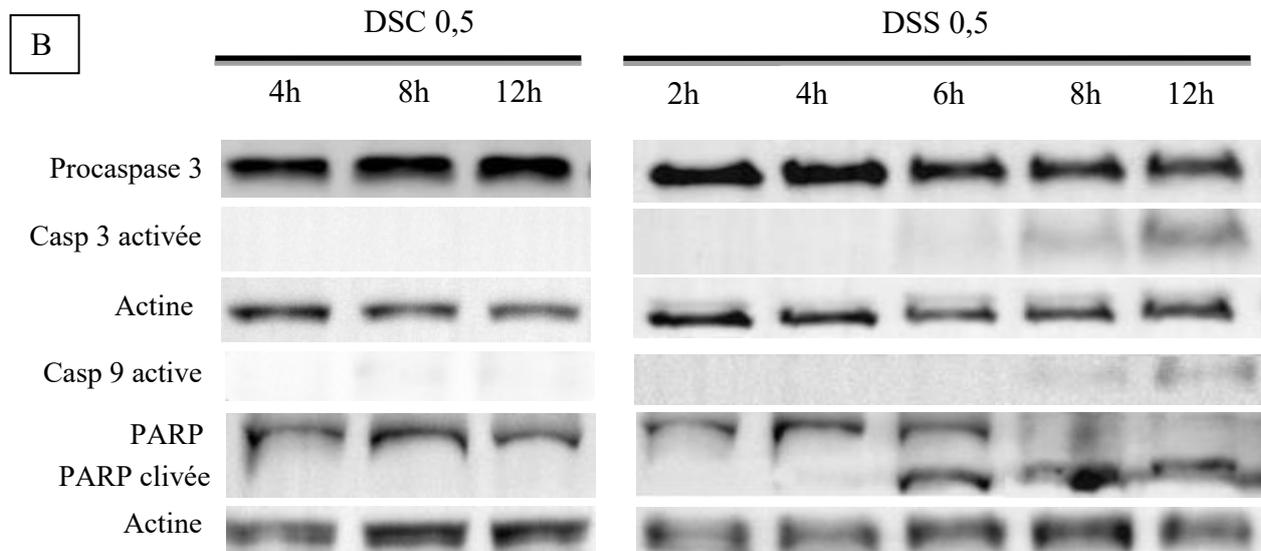
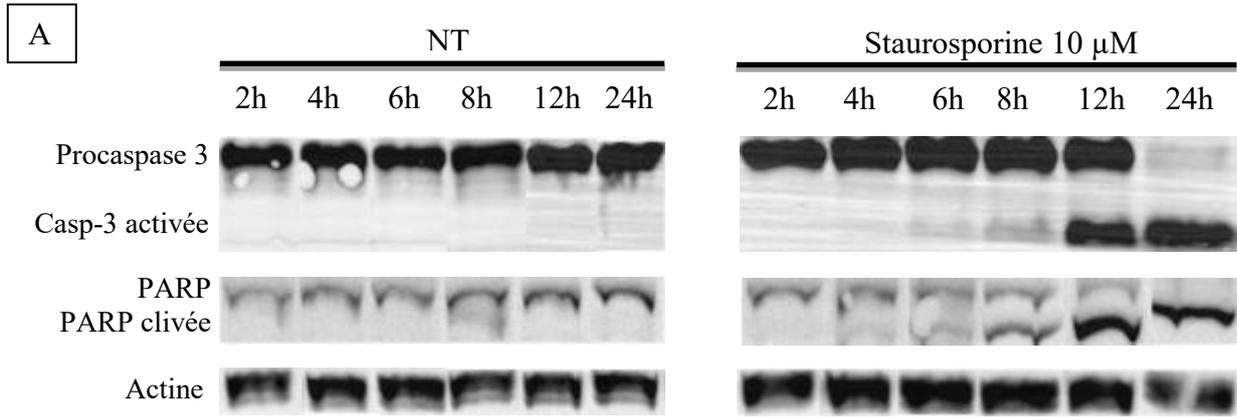


Figure 44. Détection des cellules apoptotiques *in situ* par la fragmentation d'ADN et sa révélation au TUNEL. Les cellules apoptotiques sont colorées en brun foncé (contre colorées à l'hématoxyline). (A) cellules non-traitées, (B) cellules traitées à la DNase 10U pendant 20 min (control positif), (C) cellules traitées à la DNase en absence de l'enzyme TdT dans le mélange réactionnel de TUNEL (contrôle négatif), (D) traitement avec l'extrait DSS à 0,2 mg/ml pendant 18h, (E) traitement avec l'extrait DSS à 0,2 mg/ml pendant 24 h, (F et F') traitement avec l'extrait DSS à 0,5 mg/ml pendant 24 h avec les grandissements $\times 10$ et $\times 40$ respectivement, (G) traitement avec l'extrait DSC à 0,2 mg/ml pendant 18h, (H) traitement avec l'extrait DSC à 0,2 mg/ml pendant 24 h

1.10. Expression des protéines apoptotiques

Dans le but de confirmer les résultats précédemment observés concernant le mode de la mort cellulaire, l'expression de certaines protéines impliquées dans l'apoptose (caspase-3, caspase-9 et PARP) a été étudiée par Western blot (figure 45). De ces résultats il en ressort que le traitement des cellules 4T1 par l'extrait de DSS à 0,5 mg/ml conduit l'activation de la caspase-3 dès 6 h de traitement contre 8h pour la caspase-9. Un clivage de la PARP-1 est observé dès 4 h. La concentration de cette forme clivée de PARP augmente de façon significative à 6 h parallèlement à l'activation de caspase-3. Le traitement des cellules par la même dose de l'extrait de DSC pendant le même intervalle de temps ne permet pas de visualiser l'effet apoptotique de ces extraits. Ceci est en corrélation avec les résultats de test

XTT précédemment déterminé montrant que l'extrait de DSS soit plus toxique en évaluant un pourcentage de mort cellulaire de 86% au bout de 24 h (à 0,5 mg/ml). Cependant, suite au traitement par DSC à la même dose, pas de mort cellulaire n'a été détectée au bout de 24 h. Ces résultats confirment que la mort cellulaire observée est due à l'apoptose dépendante de la voie des caspases. Nous avons également remarqué que la PARP-1 soit clivée avant l'activation de caspase-3 et que cette dernière est activée avant la procaspase-9. Ceci suggère que la caspase-3 ait été activée initialement par la voie extrinsèque (Caspase-8) et que la PARP-1 est clivée aussi par la caspase-7. La PARP-1 ajoute un polymère (ADP ribose) pour signaler à la cellule la nécessité de réparation de l'ADN endommagé (Chaitanya et al, 2010). Sous l'action de caspase-3 ou 7 (et dans certains cas par Cathepsines B et D), la PARP sera clivée en deux fragments de 89 et 24 kDa. Ce clivage inhibe l'action réparatrice du PARP. De plus, le fragment de 24 kDa avec ses 2 motifs de doigts de zinc se lie de manière irréversible à l'ADN endommagé et agit comme inhibiteur transdominant du PARP-1 actif. Cette liaison irréversible inhibe d'autres enzymes de réparation de l'ADN. Les cellules ayant un ADN sévèrement endommagé amplifient dans un premier instant l'activité PARP-1 (figure 45). Ainsi, le taux de PARP non clivé augmente à 4h de traitement entraînant une consommation élevée de NAD^+ et un appauvrissement des pools d'ATP. Si cette activité n'est pas contrôlée, elle conduit inévitablement à la mort cellulaire nécrotique passive (résultant de l'épuisement prolongé en ATP) (Chaitanya et al, 2010). Ce processus est bloqué par un clivage rapide et une inactivation de PARP-1 par l'action des caspases ce qui est en accordance avec nos résultats montrant une augmentation rapide du PARP clivée à 6 h.



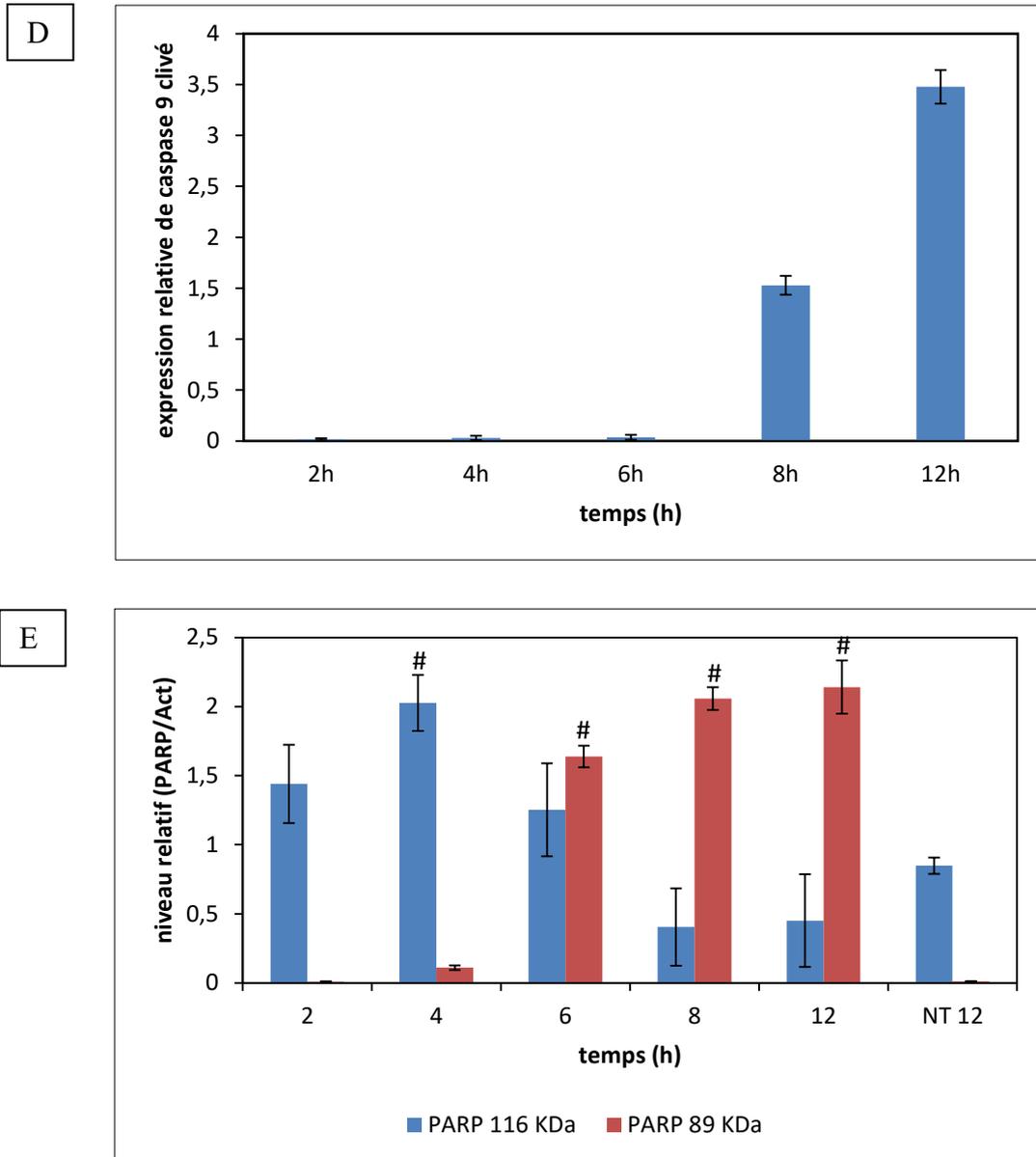


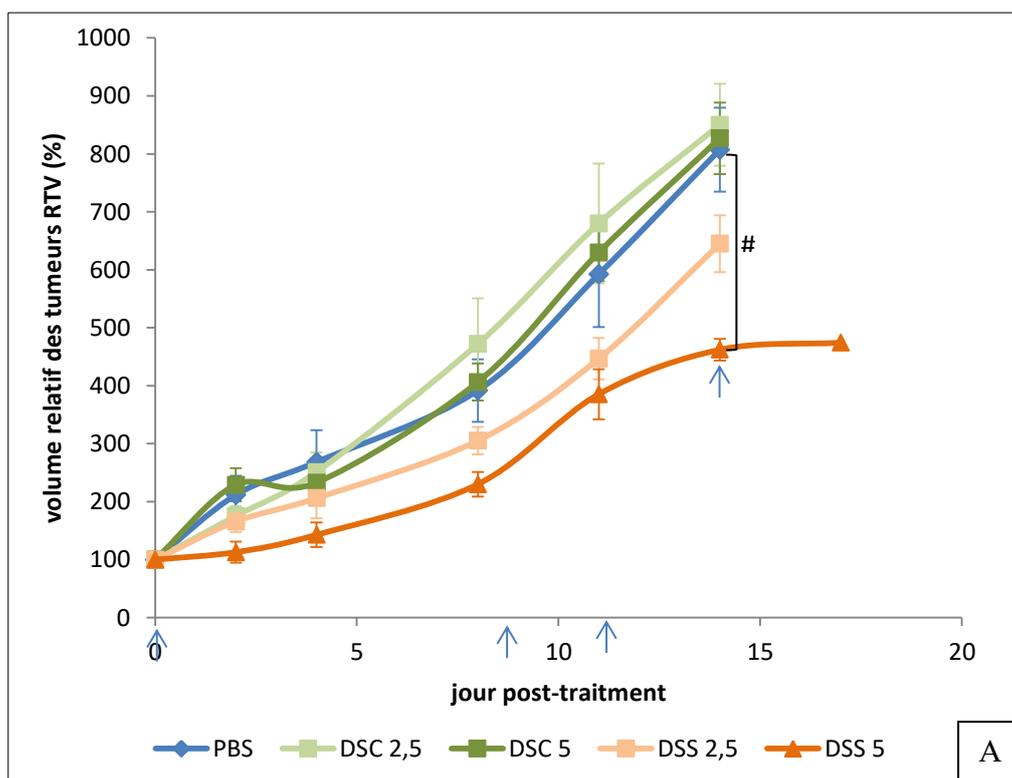
Figure 45. Activation des caspase 3 et 9 accompagnée du clivage de PARP-1, (A) suivi des protéines apoptotiques chez les cellules 4T1 non-traitées et traitées à la staurosporine $10\mu\text{M}$ (contrôle positif), (B) effet des extraits de DSC et DSS à 0.5 mg/ml à différents instants, (C) quantification de l'expression de caspase 3 sous forme activée et non-activée par rapport à l'actine des cellules NT, (D) quantification de l'expression de caspase 9 sous forme activée par rapport à l'actine des cellules NT, (E) quantification de l'expression de PARP-1 sous forme clivée et non-activée par rapport à l'actine des cellules NT. Les moyennes des intensités de bandes quantifiées par image j , sont présentées en fonction des écarts types (SD) de trois acquisitions

2. Evaluation de l'activité anticancéreuse *in vivo*

Dans le but de valider les résultats précédents obtenus *in vitro*, nous avons opté à l'évaluation de cette activité sur le modèle animal des souris Balb/c par implantation des cellules cancéreuses de type 4T1 chez ces souris. Les extraits ont été essayés à deux doses de 2,5 et 5 mg/kg. Ces doses ont été choisies grâce à une expérience préliminaire.

2.1. Effet des extraits aqueux sur la taille des tumeurs implantées

Les résultats présentés sur la figure 46A montrent que l'extrait aqueux de DSS à 5 mg/kg réduit significativement la taille de la tumeur par rapport aux souris non traitées. En effet, les RTV des souris traitées au PBS atteignent environ 800% alors que ceux des souris traitées au DSS 5 mg/kg sont aux alentours de 400%. Nous observons également un retard de développement de la tumeur au cours du temps ce qui nous a permis de prolonger le traitement par 3 jours avant le sacrifice. Cet effet décrit un caractère dose-dépendant des extraits étant donné que l'effet de DSS à 2,5 mg/kg soit statistiquement non significatif. L'extrait DSC, à ses deux doses, est sans effet avec une la tumeur qui croît de la même manière que les tumeurs non traitées. Aucune toxicité n'a été enregistrée suite au traitement ni de perte de poids des souris au cours de la période de suivi (figure 46 B).



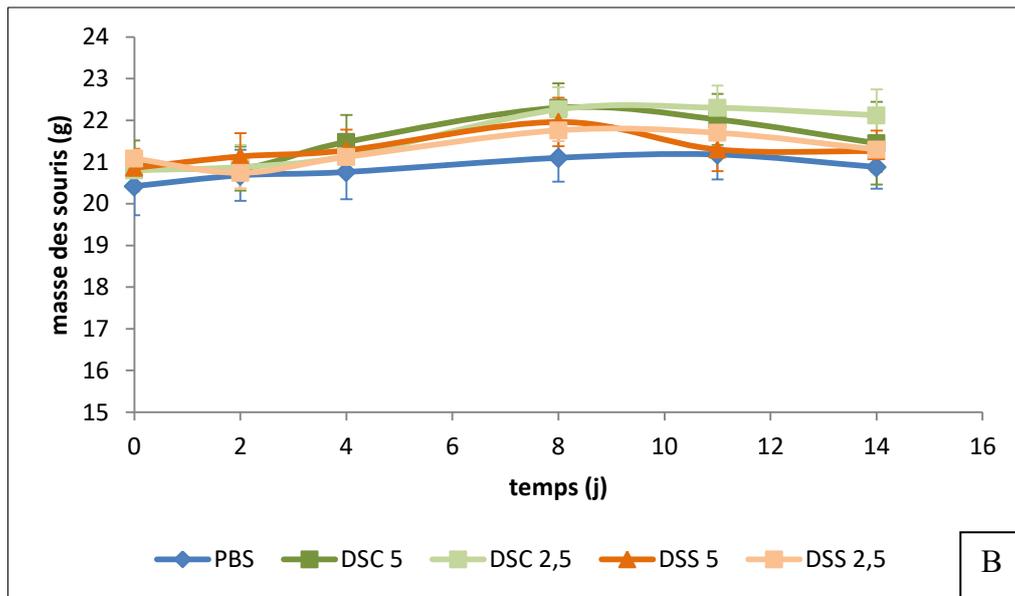


Figure 46. Effet de traitement par les extraits aqueux DSC et DSS sur les souris Balb/c ayant développé un cancer de sein suite à l'injection de cellules 4T1. (A) volume relative de l'évolution des tumeurs au cours du traitement. (B) suivi de la masse des souris au cours du traitement.

2.2. Réponse immunitaire des souris

La réponse immunitaire de ces souris (figure 47) a été analysée après leur sacrifice et la récupération de la tumeur. L'analyse par cytométrie en flux des marqueurs des cellules immunitaires montre une augmentation de l'infiltration des lymphocytes porteurs de CD45 chez les souris traitées au DSS 5 mg/kg. Ce marqueur caractérise les cellules infiltrées puisque les cellules immunitaires déjà existantes dans la tumeur sont CD45⁻ (DuPré et al., 2007). Par la suite toute, les autres populations cellulaires seront quantifiées par rapport à cet anticorps. Une augmentation de l'infiltration des cellules NK (Natural Killer) (NK1,1⁺), des LT activées (CD3⁺, CD8⁺, CD107⁺) (Lechner et al., 2013) et des cellules dendritique plasmacytoïdes DCp (CD11c⁺int, CD80⁺).

Les NK font partie de l'immunité innée et jouent un rôle crucial dans le mécanisme d'immunosurveillance. Ces cellules induisent une mort cellulaire en déclenchant une apoptose indépendante ou dépendante de caspase en utilisant deux mécanismes qui sont l'exocytose de granules cytotoxiques contenant de la perforine et du granzyme ou l'induction de l'apoptose via des récepteurs de mort (Grudzien and Rapak, 2018). Les NK peuvent être activées par des

composés naturels tels que les vitamines A, B, C, D et E, les lectines, les polysaccharides et d'autres composés phytochimiques (Grudzien and Rapak, 2018). Des effets similaires ont été précédemment rapportés chez des souris leucémiques traitées par administration orale de 922 mg/kg de *D. salina* pendant 2 semaines (Chuang et al., 2014). Ces cellules activées, modulent à leur tour l'activité des cellules de l'immunité adaptative : les LT, qui sont une autre cellule clé de la réponse antitumorale induisant aussi la mort cellulaire (Guillerey et al., 2016). L'augmentation de l'infiltration de cellules T CD8⁺ a été associée à un bon pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (J. Wu et al., 2016). Le rôle des pDC dans les tumeurs n'est pas encore bien établi où deux suppositions sont actuellement proposées (Gardner and Ruffell, 2016; Veglia and Gabrilovich, 2017). La première est que leur présence est accompagnée par un mauvais pronostic du cancer de sein et des ovaires. Alors que la deuxième propose que ces cellules peuvent servir de cibles thérapeutiques grâce à leur sécrétion d'une grande quantité d'IFN de type I et la production l'interleukine-12 (IL-12), l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et d'autres chimiokines pro-inflammatoires. En fait, les IFN peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses par effet cytotoxique direct ou via l'amélioration des molécules induisant la mort (Herzer et al., 2009). De plus ils peuvent agir en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Récemment, une étude intéressante a révélé que les pDC activés étaient capables de tuer les cellules cancéreuses du sein 4T1 avec les molécules TRAIL et Granzyme B (J. Wu et al., 2016).

Une diminution des cellules myéloïdes suppressives (MDSC pour myeloid-derived suppressor cells) est enregistrée dans la tumeur de souris traitées au DSS 5 mg/kg. Ces cellules représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures au potentiel immunosuppresseur puissant (Fleming et al., 2018).

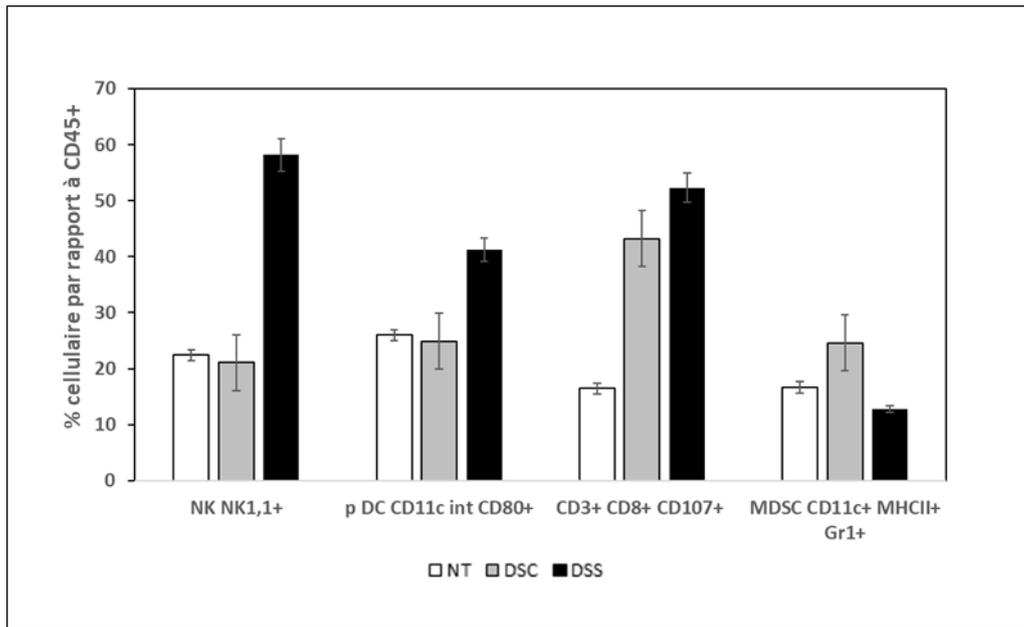


Figure 47. Analyse des TIL après 14 jours de traitement dans la tumeur

2.1. La réponse immunitaire au niveau transcriptionnelle

L'expression des gènes *arginase-1* (*Arg1*), *cyclooxygénase 2* (*COX-2*) et *l'oxyde nitrique synthase* (*NOS-2*) dans les tumeurs traitées au DSC et DSS a été étudié contre ceux non traitées. Comme le montre la figure 48, il existait une modulation de la transcription de l'expression de ces gènes dans les tumeurs traitées. Une diminution faible mais significative de l'expression de l'*Arg-1* a été observée dans les tumeurs traitées au DSS par rapport aux tumeurs traitées au DSC et au PBS. L'expression des couples *NOS-2* et *COX-2* a diminué de manière significative après le traitement par DSS. En revanche, leur expression était significativement augmentée dans les tumeurs traitées par DSC sans modulation de l'*Arg-1*. Ces données sont conformes à celles de la figure 46 et confirment que l'extrait de DSS détient une activité anti-tumorale potentielle en agissant sur les cellules immunitaires et sur le métabolisme.

L'*arg-1* est une enzyme immunosuppressive, produite à la fois par les cellules cancéreuses, les neutrophiles polymorphonucléaires et le sous-type de macrophages M2 (Munder, 2009). Il transforme la L-arginine en L-ornithine et en urée. La déplétion en L-arginine du microenvironnement tumoral inhibe la réexpression de la chaîne CD3 et induit la régulation négative du récepteur des cellules T, les rendant ainsi anergiques (Fleming et al.,

2018). La L-arginine est également catabolisée par iNOS (ou NOS-2) qui produit de l'oxyde nitrique (NO) conduisant également à une induction de l'anergie des lymphocytes T (Fleming et al., 2018). Par conséquent, la diminution du niveau de transcription de ces deux gènes influence positivement la fonction des lymphocytes T. Il a été rapporté que l'inhibition de iNOS réduisait de manière significative la croissance tumorale, les métastases pulmonaires et l'initiation de la tumeur (Granados-Principal et al., 2015). La COX-2 est un autre biomarqueur prédictif de l'inhibition immunitaire. Il est impliqué dans la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine. Son activité peut supprimer les cellules DC, NK, LT, l'immunité de type 1 et favoriser l'immunité de type 2 (Liu et al., 2015). Par conséquent, la diminution de son expression dans les tumeurs traitées par DSS est cohérente avec le renforcement de l'immunité anti-tumorale. Il est à noter que l'activité enzymatique de la COX-2 s'est avérée réduite dans les cellules cancéreuses mammaires induites par le DMBA traitées par la poudre de *D. salina* (Srinivasan et al., 2017). Il est important de souligner que le crosstalk entre NOS-2 et COX-2 s'est produit via leurs produits clés respectifs, NO et PGE-2. L'inhibition simultanée de ces deux gènes par l'acide guanidique et l'aspirine / indométacine a entraîné une réduction significative de la croissance du modèle de cancer du sein murin par xénogreffe (Basudhar et al., 2017).

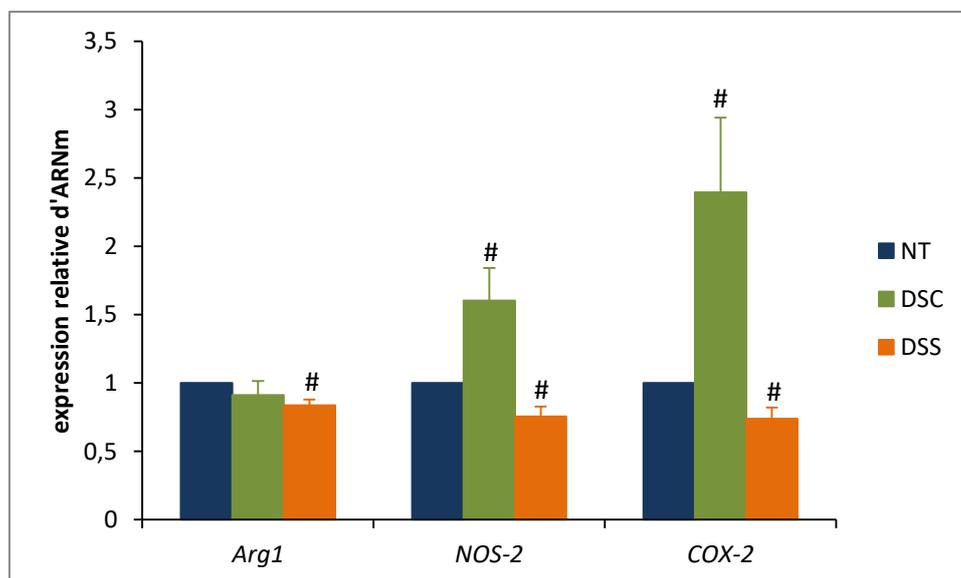


Figure 48. Niveau d'expression relatif de l'Arg-1, NOS-2 et COX-2 après traitement par DSC et DSS par normalisation contre le gène GAPDH. Les résultats indiqués sont des valeurs moyennes. \pm Erreur standard de la moyenne où (# $p < 0,05$) indique une différence

significative entre les expressions du gène chez les souris traitées au PBS et celles traitées à l'extrait, selon le test One-way ANOVA suivi du test de Tukey en utilisant le test Origin 8

*Conclusions et
perspectives*

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été regroupés dans deux chapitres. Dans une première partie, nous avons optimisé les conditions de production de caroténoïdes par *Dunaliella* puis nous avons analysé au niveau transcriptionnel certains gènes impliqués dans la synthèse de ce pigment. Une modélisation de la structure 3D de Cgp et LCYB a été également traitée dans ce chapitre. Dans une deuxième partie, les résultats de l'activité anticancéreuse de cette microalgue contre le cancer de sein *in vitro* en utilisant les cellules 4T1 et *in vivo* sur un modèle de souris ont été rapportés ainsi que les voies de signalisation induite.

I- Optimisation de la production de caroténoïdes chez *Dunaliella* et les changements cellulaires induits

Des résultats précédents au sein de notre équipe ont montré qu'une combinaison des facteurs de stress augmente la production de caroténoïdes chez *Dunaliella*. Dans le but d'explorer d'autres conditions dans des domaines d'expérimentation plus larges et d'avoir une meilleure production de ce pigment, nous avons opté dans cette thèse au plan d'expériences de type Box Behnken à trois facteurs et trois niveaux. Le modèle obtenu a montré qu'un optimum de production de caroténoïdes consiste à la combinaison de 2 M de salinité, 1 mM en source d'azote (NaNO_3) et $540 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse. Une augmentation de la salinité à 5 M n'améliore pas la réponse. Cependant, une diminution de ce facteur au niveau (-1) semble maximiser la production de caroténoïdes. De même, une déprivation totale en azote influence négativement la réponse. En effet, ces deux conditions extrêmes (très grande salinité et déprivation totale en azote) ne permettent pas la croissance cellulaire notamment lorsque la microalgue se situe dans un système de stress monophasique. Pour la lumière, son augmentation est toujours en corrélation positive avec l'accumulation de caroténoïdes. Le modèle prédit corrèle bien avec les données expérimentales par évaluation des coefficients d'ajustement et la validation pratique de l'optimum. Les cellules cultivées dans cette condition sont nommées DSS alors que celles dans la condition normale sont nommées DSC. La concentration en azote de 1 mM s'avère suffisante pour que les cellules maintiennent la même vitesse de division cellulaire que DSC pendant six jours. Entre les jours 15 et 29, le nombre de cellules est constant au voisinage de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml chez DSS alors que les DSC dépassent $6 \cdot 10^6$ cellules/ml au jour 29. En cytométrie, deux populations de cellules ont été visualisées au jour 20. Cette variabilité semble être due à différents stades de développement et de division au cours du cycle cellulaire. Cependant, un seul type de cellules

gonflées est observé en DSS indiquant que toutes les cellules sont au même état et même stage. En microscopie, des cellules éclatées ou de forme modifiée ont été également observées chez DSS à partir du jour 20. Ces dernières semblent être considérées en cytométrie comme des débris et donc non sélectionnées dans la population analysée. Cependant, les cellules en DSC conservent leur forme ronde et leur cycle de division.

Nous avons ainsi constaté que la vitesse de croissance a diminué en condition de stress. De plus, les cellules ont été cultivées en forte intensité lumineuse ce qui favorise la création d'un déséquilibre entre l'énergie fournie et celle consommée par les cellules développant en plus le stress oxydatif intracellulaire. Ce dernier favorise l'accumulation d'antioxydants et de caroténoïdes. D'autant plus et au niveau de la production de pigments, DSS restreint au maximum sa production de chlorophylles ($2,87 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ soit $1,31 \pm 0,22 \text{ pg/cellule}$ au 29^{ème} jour) en accumulant des quantités importantes de caroténoïdes (de l'ordre de $39,1 \pm 1,17 \mu\text{g/ml}$ soit $17,56 \pm 0,9$ au même jour). DSC a conservé un métabolisme normal en accumulant des quantités équitable des deux pigments ($32,47 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$ soit $5,03 \pm 0,32 \text{ pg/cellules}$ en chlorophylles et $23,79 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ soit $3,68 \pm 0,13 \text{ pg/cellules}$ en caroténoïdes au jour 29). Cette différence a été bien confirmée par l'analyse cellulaire en cytométrie et en microscopie. En effet, DSS se sont avérées plus fluorescentes sur FL1, FL2 et par marquage au rouge de Nile confirmant l'existence de globules huileuses et la suraccumulation de caroténoïdes. Ces modifications biochimiques et structurales apparentes sont accompagnées par des modifications transcriptionnelles. De ce fait, une analyse de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de β -carotène et dans la réponse à ce stress combiné a été effectuée. Ce stress affecte la cellule sur plusieurs niveaux et diverses voies métaboliques. La glycolyse est parmi les voies les plus importantes chez les organismes étant donné qu'elle fournisse l'énergie et les métabolites nécessaires pour d'autres voies. L'énolase (*Eno*) qui hydrolyse l'avant dernière étape de ce cycle diminue dès les premières heures de stress ce qui réduit indirectement la quantité de pyruvate disponible pour le cycle de l'acide tricarboxylique et accumule plus de 2-PGA et DHAP au milieu de la voie de la glycolyse servait par la suite à la synthèse de glycérol, un osmoprotectant contre la hausse de la salinité dans le milieu. La restitution de l'*Eno* permet un apport suffisant en carbone pour la synthèse du PEP puis du pyruvate essentiel pour la synthèse des isoprénoïdes. Ce pyruvate avec le G3P sont transformés grâce à DXS en DXP. C'est la première réaction de la voie MEP de synthèse des isoprénoïdes. Elle est donc impliquée dans la synthèse de plusieurs métabolites. Par contre, *LCYB*, le troisième gène suivi, est impliqué directement dans la synthèse de β -carotène par

cyclisation du lycopène. Il a été trois fois plus exprimé chez DSS que DSC à 72 h de stress. Un autre gène directement impliqué dans la synthèse de ce pigment est celui codant pour la protéine associée aux globules de carotène (*Cgp*). Le stress affecte également les molécules chaperonnes comme la HSP70. Son augmentation chez DSS est signe du besoin de la cellule en chaperonnes capables de rétablir le dysfonctionnement ou le mal-repliement des protéines affectées par le stress. La RPE responsable de la catalyse de l'épimérisation réversible du Ru5P en Xu5P au cours du cycle de Calvin ne montre pas des changements significatifs au cours du temps de stress mais sa différence d'expression avec DSC à 72 h est significative. Ces changements nous donnent la chance de confirmer que chez cette souche isolée de *Dunaliella*, la réponse au stress et l'accumulation de caroténoïdes se font sur deux phases comme le cas chez *D.bardawil* (Liang and Jiang, 2017). En effet, les cellules accumulent dans un premier temps des osmoprotectants comme le glycérol durant les premiers 24 h comme étant une réponse rapide. Ceci est mis en évidence par la réponse d'*Eno* et la faible expression de *LCYB* et *Cgp* au cours de ce temps. Dans une deuxième phase, c'est l'accumulation à long terme qui se met en place et la synthèse de caroténoïdes, mise en œuvre par l'importante augmentation de l'expression des gènes impliqués directement dans la synthèse de β -carotène.

Afin d'identifier les déterminants moléculaires possibles liés à la régulation positive des protéines CGB, *LCYB* et SUMO (modificateur lié à la petite ubiquitine), une étude de leur structure 3D a été entreprise. Cette étude nous permet également de déterminer si ces changements transcriptionnels vont de pair avec ceux post-traductionnels. Cependant, seules les protéines *LCYB* et SUMO ont été modélisées avec succès, car aucun fichier pDB structural ayant une identité acceptable avec CGP n'a été trouvé dans la base de données. Le modèle de *LYCB* montre qu'elle est formée par deux domaines, un transmembranaire et un deuxième catalytique constitué par un site de liaison à FAD comme étant un cofacteur et un site de liaison au substrat (la lycopène). La prévision des PTM a montré de nombreux sites possibles de phosphorylation, palmitoylation et myristoylation, ainsi que des sites de sumoylation chez CGP et *LCYB*. L'inspection du résidu putatif d'interaction SUMO (K271), ainsi que des motifs d'interaction de sumoylation, a montré qu'ils sont tous deux situés du même côté et très proches l'un de l'autre et du site de liaison au FAD (Figure 7b). Cette observation pourrait être intéressante pour comprendre le mécanisme de régulation exercé par SUMO sur *LCYB*. De plus, ces résultats corroborent la régulation fine des deux enzymes après leur repliement et le rôle régulateur majeur qu'elles ont dans la modulation du ratio de la biosynthèse des caroténoïdes.

II- Activité anticancéreuse de *Dunaliella sp.*

L'évaluation de l'activité anticancéreuse a été faite moyennant la préparation de différents extraits par macération du lyophilisat de *Dunaliella* dans l'éthanol, l'eau et le mélange éthanol/eau. Dans un premier temps, les cellules 4T1, modèle de cancer mammaire murin, ont été utilisées. L'extrait aqueux a montré l'activité la plus forte chez DSC et DSS étant donné que l'extrait de la souche stressée est environ 4 fois plus toxique que celui de DSC par calcul des CI50 à 48h. Ce premier test de viabilité a été confirmé par le test de relargage du LDH et visualisé à l'œil par coloration au cristal violet. L'activité de ces deux extraits a été évaluée sur les cellules A549 du cancer de poumon et les cellules HeLa du cancer de col de l'utérus montrant ainsi des résultats similaires.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré le mode de mort cellulaire induit par les extraits aqueux sur les cellules 4T1. Les tests à l'annexine V sont les plus utilisés pour cet objectif. Cependant, nous nous sommes confrontés dans notre cas aux problèmes de chevauchement de fluorescence entre la sonde et les extraits, qui se sont montrés capables de pénétrer dans la cellule et de se positionner dans l'espace périnucléaire. Ceci nous a poussés à utiliser des tests colorimétriques non fluorescents pour la visualisation de la fragmentation d'ADN soit par migration sur gel d'agarose soit par test TUNEL. Un détachement et une intense coloration en brun foncé a été constaté par traitement DSS au bout de 24h à une dose de 0,5 mg/ml. Ce résultat suggère que les extraits induisent la mort cellulaire par apoptose. Pour mieux prouver cette observation, nous avons étudié l'expression des protéines caspase-3, caspase-9 et PARP-1 par Western blot. Une activation des caspase-3 et 9 a été enregistrée ainsi qu'une importante désactivation de PARP-1 confirmant ainsi la précédente observation. Egalement, nous mentionnons que cette réponse a été temps et dose dépendante et que DSS est plus toxique que DSC.

Dans un troisième temps, une validation de cette activité anticancéreuse a été effectuée sur le modèle animal. Pour se faire, des souris Balb/c ayant reçu une implantation des cellules 4T1 ont été utilisées. Le traitement aux extraits a commencé après le développement de la tumeur primaire. Une réduction et un retrait du développement de la tumeur chez les souris traitées au DSS à 5 mg/kg ont été enregistrés suite à un traitement durant 14 jours par injection intratumorale périodique sans avoir enregistré une perte de poids des souris. Cette diminution apparente du volume de la tumeur a été accompagnée par une modulation de la réponse immunitaire. Le pourcentage de cellules infiltrées dans la tumeur marquée CD45⁺ a

augmenté. Ces cellules sont les NK, LT CD8⁺ ayant un rôle cytolytique et les pDC. Par contre, les MDSC de potentiel immunosuppresseur ont été diminuées. De même, le niveau d'expression du gène codant pour l'enzyme immunosuppresseur *Arg-1* a diminué ainsi que *NOS-2* et *COX-2* chez les souris traitées au DSS à 5 mg/kg par comparaison aux souris traitées au PBS. Ceci confirme le pouvoir anticancéreux des extraits aqueux de *Dunaliella* sp. isolée.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux observés au cours de cette thèse nous a permis de mieux comprendre et visualiser la manière dont *Dunaliella* sp réponds au stress combiné tenant compte de plusieurs facteurs à la fois.

De plus, ces résultats prometteurs obtenus valident que les microalgues mériteraient à être plus étudiées et cultivées afin de mettre sur pied des industries innovatrices, à la fois plus vertes et compétitives sur le marché par leur utilisation dans le domaine pharmaceutique.

Des améliorations de l'activité de ces extraits peuvent être envisagées en menant des traitements combinées avec soit des molécules chimiothérapeutiques classiques (doxorubicine, paclitaxel) soit des ARN interférents dirigés contre des facteurs oncogéniques connus. Des analyses photochimiques seront envisagées pour définir le composé responsable de cette activité.

Sur le modèle animal, l'efficacité de ces extraits encapsulés sur des tumeurs de souris serait évaluée.

D'autres applications par intégrations des microalgues ou des extraits de microalgues dans les domaines alimentaire et cosmétique sont envisagées. Pour passer à l'échelle industrielle, une production à grande échelle dans des photo-bioréacteurs pour satisfaire les conditions réelles de production algale est nécessaire.

La compréhension des caractéristiques et du comportement des microalgues serait en continuité par i) déterminer la structure cristalline de LCYB et Cgp; ii) étudier l'effet des stress au niveau des micros ARN et déterminer les régulations possibles.

Liste bibliographique

Liste bibliographique

- Abdel-Daim, M.M., Farouk, S.M., Madkour, F.F., Azab, S.S., 2015. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 37, 126–139. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.998368>
- Ahmad, N., Muhammad A.M., Sana M., 2020. Recombinant Protein Production in Microalgae: Emerging Trends. *Protein and Peptide Letters*, 27 (2), 105–110. <https://doi.org/10.2174/0929866526666191014124855>.
- Ahmed, R.A., He, M., Aftab, R.A., Zheng, S., Nagi, M., Bakri, R., Wang, C., 2017. Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Sci. Rep.* 7, 8118. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07540-x>
- Ahn, J.-W., Kim, K.-J., 2015. Crystal structure of 1'-OH-carotenoid 3,4-desaturase from *Nonlabens dokdonensis* DSW-6. *Enzyme Microb. Technol.* 77, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.05.005>
- Anusha P, N., Siddiqui, A., Bindu A, H., 2011. Immuno Defense Mechanism against Tumors. *J. Cancer Sci. Ther.* 03. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.S17-005>
- Archibald, J.M., 2015. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr. Biol.* 25, R911–R921. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
- Arias-Forero, D., Hayashida, G., Aranda, M., Araya, S., Portilla, T., García, A., Díaz-Palma, P., 2013. Protocol for maximizing the triglycerides-enriched lipids production from *Dunaliella salina* SA32007 biomass, isolated from the Salar de Atacama (Northern Chile). *Adv. Biosci. Biotechnol.* 04, 830. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.48110>
- Banerjee, A., Wu, Y., Banerjee, R., Li, Y., Yan, H., Sharkey, T.D., 2013. Feedback Inhibition of Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Synthase Regulates the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 16926–16936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464636>
- Barry, A., Wolfe, A., English, C., Ruddick, C., Lambert, D., 2016. 2016 National Algal Biofuels Technology Review (No. DOE/EE-1409). USDOE Office of Energy Efficiency and Renewable Energy (EERE), Bioenergy Technologies Office (EE-3B). <https://doi.org/10.2172/1259407>
- Baselga, J., Zambetti, M., Llombart-Cussac, A., Manikhas, G., Kubista, E., Steger, G.G., Makhson, A., Tjulandin, S., Ludwig, H., Verrill, M., Ciruelos, E., Egyhazi, S., Xu, L.-A., Zerba, K.E., Lee, H., Clark, E., Galbraith, S., 2009. Phase II genomics study of

- ixabepilone as neoadjuvant treatment for breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 526–534. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.2646>
- Basudhar, D., Glynn, S.A., Greer, M., Somasundaram, V., No, J.H., Scheiblin, D.A., Garrido, P., Heinz, W.F., Ryan, A.E., Weiss, J.M., Cheng, R.Y.S., Ridnour, L.A., Lockett, S.J., McVicar, D.W., Ambs, S., Wink, D.A., 2017. Coexpression of NOS2 and COX2 accelerates tumor growth and reduces survival in estrogen receptor-negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13030–13035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709119114>
- Bechelli, J., Coppage, M., Rosell, K., Liesveld, J., 2011. Cytotoxicity of Algae Extracts on Normal and Malignant Cells [WWW Document]. *Leuk. Res. Treat.* <https://doi.org/10.4061/2011/373519>
- Bellou, S., Baeshen, M.N., Elazzazy, A.M., Aggeli, D., Sayegh, F., Aggelis, G., 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 32, 1476–1493. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Ben Amor, F., Elleuch, F., Ben Hlima, H., Garnier, M., Saint-Jean, B., Barkallah, M., Pichon, C., Abdelkafi, S., Fendri, I., 2017. Proteomic Analysis of the Chlorophyta *Dunaliella* New Strain AL-1 Revealed Global Changes of Metabolism during High Carotenoid Production. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15090293>
- Ben-Amotz, A., Avron, M., 1983. On the Factors Which Determine Massive β -Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 72, 593–597.
- Ben-Amotz, A., Katz, A., Avron, M., 1982. ACCUMULATION OF β -CAROTENE IN HALOTOLERANT ALGAE: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β -CAROTENE-RICH GLOBULES FROM *DUNALIELLA BARDAWIL* (CHLOROPHYCEAE)1. *J. Phycol.* 18, 529–537. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03219.x>
- Ben-Amotz, A., Shaish, A., Avron, M., 1989. Mode of Action of the Massively Accumulated beta-Carotene of *Dunaliella bardawil* in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation. *Plant Physiol.* 91, 1040–1043.
- Bohlin, K., 1901. Utkast till de gröna algernas och arkegoniaternas fylogeni. Almqvist & Wiksells boktryckeri-a.-b., Upsala.
- Boussiba, S., Vonshak, A., 1991. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*1. *Plant Cell Physiol.* 32, 1077–1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>

- Box, G.E.P., Behnken, D.W., 1960. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics* 2, 455–475. <https://doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>
- Broz, M., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A., Pollock, J., Erle, D., Barczak, A., Rosenblum, M., Daud, A., Barber, D., Amigorena, S., van't Veer, L.J., Sperling, A., Wolf, D., Krummel, M.F., 2014. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen Presenting Cells, Critical for T cell Immunity. *Cancer Cell* 26, 638–652. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>
- Cadoret, J.-P., Bardor, M., Lerouge, P., Cabiglieri, M., Henriquez, V., Carlier, A., 2008. Les microalgues : Usines cellulaires productrices de molécules commerciales recombinantes. *MS Médecine Sci.* ISSN Pap. 0767-0974 ISSN Numér. 1958-5381 2008 Vol 24 N° 4 P 375-382. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008244375>
- Cameron, D., Brown, J., Dent, R., Jackisch, C., Mackey, J., Pivot, X., Steger, G.G., Suter, T.M., Toi, M., Parmar, M., Laeufle, R., Im, Y.-H., Romieu, G., Harvey, V., Lipatov, O., Pienkowski, T., Cottu, P., Chan, A., Im, S.-A., Hall, P.S., Bubuteishvili-Pacaud, L., Henschel, V., Deurloo, R.J., Pallaud, C., Bell, R., 2013. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14, 933–942. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70335-8)
- Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P., Kroemer, G., 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 115, 4727–4734.
- Carey, L.A., Rugo, H.S., Marcom, P.K., Irvin, W., Ferraro, M., Burrows, E., He, X., Perou, C.M., Winer, E.P., 2008. TBCRC 001: EGFR inhibition with cetuximab added to carboplatin in metastatic triple-negative (basal-like) breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1009–1009. https://doi.org/10.1200/jco.2008.26.15_suppl.1009
- Carmaux, S., 2008. Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur (Thèse d'exercice). Université de Nancy I. UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques, France.
- Catros, V., Toutirais, O., Bouet, F., Cabillic, F., Desille, M., Fournié, J.-J., 2010. Lymphocytes T $\gamma\delta$ en cancérologie: Des lymphocytes tueurs non conventionnels. *médecine/sciences* 26, 185–192. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010262185>

- Chaitanya, G.V., Alexander, J.S., Babu, P.P., 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal. CCS* 8, 31. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>
- Chan, F.K.-M., Moriwaki, K., De Rosa, M.J., 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 979, 65–70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7
- Chen, H., Jiang, J.-G., 2009. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell. Physiol.* 219, 251–258. <https://doi.org/10.1002/jcp.21715>
- Chen, H., Lao, Y.-M., Jiang, J.-G., 2011. Effects of salinities on the gene expression of a (NAD⁺)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. *Sci. Total Environ.* 409, 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.038>
- Chen, X., Du, Y., Lin, X., Qian, Y., Zhou, T., Huang, Z., 2016. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity. *Int. Immunopharmacol.* 34, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.009>
- Chen, X., Han, H., Jiang, P., Nie, L., Bao, H., Fan, P., Lv, S., Feng, J., Li, Y., 2011. Transformation of β -Lycopene Cyclase Genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* Conferred Salt Tolerance in *Arabidopsis* and Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 52, 909–921. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr043>
- Chen, X.-J., Zhang, X.-H., Hu, L.-D., Zhang, J.-Q., Jiang, Y., Yang, Y., Yan, Y.-B., 2016b. DsCaf1 is involved in environmental stress response of *Dunaliella salina*. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.015>
- Chen, Y., Tang, X., Kapoore, R.V., Xu, C., Vaidyanathan, S., 2015. Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energy Convers. Manag.* 106, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.09.025>
- Chiu, C.-C., Chen, L.-J., Su, P.-H., Li, H., 2013. Evolution of chloroplast J proteins. *PloS One* 8, e70384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070384>
- Chiu, H.-F., Liao, J.-Y., Lu, Y.-Y., Han, Y.-C., Shen, Y.-C., Venkatakrisnan, K., Golovinskaia, O., Wang, C.-K., 2017. Anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic effects of *Dunaliella salina* on human KB oral carcinoma cells. *J. Food Biochem.* 41, e12349. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12349>
- Chou, P.Y., Huang, G.J., Cheng, H.C., Wu, C.H., Chien, Y.C., Chen, J.S., Huang, M.H., Hsu, K.J., Sheu, M.J., 2010. Analgesic And Anti-Inflammatory Activities Of An Ethanol

- Extract Of *Dunaliella Salina* Teod. (Chlorophyceae). *J. Food Biochem.* 34, 1288–1302. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00389.x>
- Chuang, W.C., Ho, Y.C., Liao, J.W., Lu, F.J., 2014. *Dunaliella salina* exhibits an antileukemic immunity in a mouse model of WEHI-3 leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11479–11487. <https://doi.org/10.1021/jf503564b>
- Collin, M., Bigley, V., 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>
- Craigie, J.S., McInnes, A.G., Ragan, M.A., Walter, J.A., 1977. Chemical constituents of the physodes of brown algae. Characterization by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy of oligomers of phloroglucinol from *Fucus vesiculosus* (L.). *Can. J. Chem.* 55, 1575–1582. <https://doi.org/10.1139/v77-219>
- Cui, H., Wang, Y., Qin, S., 2011. Molecular Evolution of Lycopene Cyclases Involved in the Formation of Carotenoids in Eukaryotic Algae. *Plant Mol. Biol. Report.* 29, 1013–1020. <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0297-2>
- Cutzu, R., Clemente, A., Reis, A., Nobre, B., Mannazzu, I., Roseiro, J., Lopes da Silva, T., 2013. Assessment of β -carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutant 400A15 using flow cytometry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 865–875. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1278-2>
- Dammak, M., Haase, S.M., Miladi, R., Ben Amor, F., Barkallah, M., Gosset, D., Pichon, C., Huchzermeyer, B., Fendri, I., Denis, M., Abdelkafi, S., 2016. Enhanced lipid and biomass production by a newly isolated and identified marine microalga. *Lipids Health Dis.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0375-4>
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G., 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342, 249–268.
- Davidi, L., Levin, Y., Ben-Dor, S., Pick, U., 2015. Proteome Analysis of Cytoplasmatic and Plastidic β -Carotene Lipid Droplets in *Dunaliella bardawil*[OPEN]. *Plant Physiol.* 167, 60–79. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248450>
- Davidi, L., Shimoni, E., Khozin-Goldberg, I., Zamir, A., Pick, U., 2014. Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 164, 2139–2156. <https://doi.org/10.1104/pp.113.235119>
- Dietrich, P.Y., Walker, P.R., 2000. Échappement et tolérance des tumeurs à l'apoptose. *MS Médecine Sci. Rev. Pap.* ISSN 0767-0974 2000 Vol 16 N° 4 P492-9. <https://doi.org/10.4267/10608/1681>

- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., Ughy, B., 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 52, 539–561. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.001>
- Dong, H.-P., Williams, E., Wang, D., Xie, Z.-X., Hsia, R., Jenck, A., Halden, R., Li, J., Chen, F., Place, A.R., 2013. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to Long-Term Nitrogen Starvation and Recovery1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* 162, 1110–1126. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214320>
- Dudek, A.M., Martin, S., Garg, A.D., Agostinis, P., 2013. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00438>
- DuPré, S.A., Redelman, D., Hunter, K.W., 2007. The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int. J. Exp. Pathol.* 88, 351–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x>
- Duriez, P.J., Shah, G.M., 1997. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 75, 337–349.
- El-Baky, A., El-Baz, F.K., El-Baroty, G.S., 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int J Agric Biol* 6, 1560–8530.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Emtyazjoo, Mo, Moghadasi, Z., Rabbani, M., Emtyazjoo, Ma, Samadi, S., Mossaffa, N., 2012. Anticancer effect of *Dunaliella salina* under stress and normal conditions against skin carcinoma cell line A431 in vitro. *Iran. J. Fish. Sci.* 11, 283–293.
- Enserink, J.M., 2015. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div.* 10. <https://doi.org/10.1186/s13008-015-0010-1>
- Eruslanov, E.B., Bhojnagarwala, P.S., Quatromoni, J.G., Stephen, T.L., Ranganathan, A., Deshpande, C., Akimova, T., Vachani, A., Litzky, L., Hancock, W.W., Conejo-Garcia, J.R., Feldman, M., Albelda, S.M., Singhal, S., 2014. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J. Clin. Invest.* 124, 5466–5480. <https://doi.org/10.1172/JCI77053>
- Fachet, M., Hermsdorf, D., Rihko-Struckmann, L., Sundmacher, K., 2016. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Algal Res.* 13, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.014>

- Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C., Smaoui, A., 2011. Optimization of Salt Concentrations for a Higher Carotenoid Production in *Dunaliella Salina* (chlorophyceae)1. *J. Phycol.* 47, 1072–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x>
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N.M.B., Jackson, S.P., Smith, G.C.M., Ashworth, A., 2005. Targeting the DNA repair defect in *BRCA* mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Madadkar-Sobhani, A., Shahverdi, A.R., Nejad-Sattari, T., Mirzaie, S., Jamalifar, H., 2009. Nicotine inhibition of lycopene cyclase enhances accumulation of carotenoid intermediates by *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Eur. J. Phycol.* <https://doi.org/10.1080/09670260802578526>
- Feitelson, M.A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R.J., Blain, S.W., Holcombe, R.F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M.L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N.K., Singh, N., Vlachostergios, P.J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Bilsland, A., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Bhakta, D., Halicka, D., Keith, W.N., Newsheer, S., 2015. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* 35 Suppl, S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fleming, V., Hu, X., Weber, R., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., Umansky, V., 2018. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00398>
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., Orlandini, S.Z., 2000. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.* 182, 41–49. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200001\)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200001)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7)
- Foulkes, W.D., Smith, I.E., Reis-Filho, J.S., 2010. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>

- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., Albelda, S.M., 2009. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
- Fritsch, F. e, 1923. *The Structure And Reproduction Of The Algae* Vol. 2 Ed. 1st.
- Fritsch, F.E., 1922. *The Structure And Reproduction Of The Algae* Vol. 1 Ed. 1st.
- Froelich, C.J., Hanna, W.L., Poirier, G.G., Duriez, P.J., D’amours, D., Salvesen, G.S., Alnemri, E.S., Earnshaw, W.C., Shah, G.M., 1996. Granzyme B/Perforin-Mediated Apoptosis of Jurkat Cells Results in Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase to the 89-kDa Apoptotic Fragment and Less Abundant 64-kDa Fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 658–665. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1565>
- Gabrilovich, D.I., 2017. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol. Res.* 5, 3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, J.C., Florencio, F.J., Guerrero, M.G., 2005. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 115, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.07.010>
- Gardner, A., Ruffell, B., 2016. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* 37, 855–865. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.09.006>
- Ghirardo, A., Wright, L.P., Bi, Z., Rosenkranz, M., Pulido, P., Rodríguez-Concepción, M., Niinemets, Ü., Brüggemann, N., Gershenzon, J., Schnitzler, J.-P., 2014. Metabolic Flux Analysis of Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Poplar Leaves Emitting and Nonemitting Isoprene1[W]. *Plant Physiol.* 165, 37–51. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236018>
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., 1973. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>
- Gobeil, S., Boucher, C.C., Nadeau, D., Poirier, G.G., 2001. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.* 8, 588–594. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400851>

- Golubovskaya, V., Wu, L., 2016. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 8, 36. <https://doi.org/10.3390/cancers8030036>
- Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S., Gonzalez, M.A., 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biol. Res.* 36, 185–192.
- Gong, M., Bassi, A., 2016. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* 34, 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Granados-Principal, S., Liu, Y., Guevara, M.L., Blanco, E., Choi, D.S., Qian, W., Patel, T., Rodriguez, A.A., Cusimano, J., Weiss, H.L., Zhao, H., Landis, M.D., Dave, B., Gross, S.S., Chang, J.C., 2015. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* 17, 25. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0527-x>
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E.A., King, T.A., Norton, L., Benezra, R., 2011. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* 20, 300–314. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.012>
- Grudzien, M., Rapak, A., 2018. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *J. Immunol. Res.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4868417>
- Guevara-García, A., San Román, C., Arroyo, A., Cortés, M.E., de la Luz Gutiérrez-Nava, M., León, P., 2005. Characterization of the *Arabidopsis clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell* 17, 628–643. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028860>
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer, Boston, MA, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Guillerey, C., Huntington, N.D., Smyth, M.J., 2016. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* 17, 1025–1036. <https://doi.org/10.1038/ni.3518>
- Guo, H., Tsung, K., Guo, H., Tsung, K., 2017. Tumor reductive therapies and antitumor immunity. *Oncotarget* 8, 55736–55749. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18469>
- Hadrup, S., Donia, M., Thor Straten, P., 2013. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 6, 123–133. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0127-6>
- Haghjou, M.M., Shariati, M., Smirnoff, N., 2009. The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase

- activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiol. Plant.* 135, 272–280. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01193.x>
- Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., Yang, S.-M., 2012. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/948098>
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., Sakuragi, N., 2014. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>
- Hassanpour, S.H., Dehghani, M., 2017. Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Res. Pract.* 4, 127–129.
- Heppner, G.H., Dexter, D.L., DeNucci, T., Miller, F.R., Calabresi, P., 1978. Heterogeneity in Drug Sensitivity among Tumor Cell Subpopulations of a Single Mammary Tumor. *Cancer Res.* 38, 3758–3763.
- Herzer, K., Hofmann, T.G., Teufel, A., Schimanski, C.C., Moehler, M., Kanzler, S., Schulze-Bergkamen, H., Galle, P.R., 2009. IFN- α -Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Involves Promyelocytic Leukemia Protein and TRAIL Independently of p53. *Cancer Res.* 69, 855–862. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2831>
- Hon, J.D.C., Singh, B., Sahin, A., Du, G., Wang, J., Wang, V.Y., Deng, F.-M., Zhang, D.Y., Monaco, M.E., Lee, P., 2016. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am. J. Cancer Res.* 6, 1864–1872.
- Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M., 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiol.* 107, 14–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
- Hu, C.-C., Lin, J.-T., Lu, F.-J., Chou, F.-P., Yang, D.-J., 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chem.* 109, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.043>
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy* 87, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K., 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnol. Adv., Prague Symposium 2011* 31, 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>

- Imamoglu, E., Demirel, Z., Dalay, M.C., 2014. Evaluation of culture conditions of locally isolated *Dunaliella salina* strain EgeMacc-024. *Biochem. Eng. J., Advances in Bioprocess Technology* 92, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.008>
- Irwandi Jaswir, 2011. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J. Med. Plants Res.* 5. <https://doi.org/10.5897/JMPRX11.011>
- J, V., Chapman, D.J., 1973. *The Algae*. Springer.
- Jayappriyan, K.R., Rajkumar, R., Venkatakrishnan, V., Nagaraj, S., Rengasamy, R., 2013. In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomed. Prev. Nutr.* 3, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.003>
- Jin, E., Juergen, P.W., Kum, L.H., Min, H.S., Man, C., 2003. Xanthophylls in microalgae from biosynthesis to.pdf 13, 165–174.
- Kajikawa, M., Kinohira, S., Ando, A., Shimoyama, M., Kato, M., Fukuzawa, H., 2015. Accumulation of Squalene in a Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by Genetic Modification of Squalene Synthase and Squalene Epoxidase Genes. *PLOS ONE* 10, e0120446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120446>
- Katz, A., Avron, M., 1985. Determination of Intracellular Osmotic Volume and Sodium Concentration in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* 78, 817–820.
- Katz, A., Jimenez, C., Pick, U., 1995. Isolation and Characterization of a Protein Associated with Carotene Globules in the Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 108, 1657–1664.
- Keeling, P.J., 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 729–748. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0103>
- Khalili, M., Radosevich, J.A., 2018. Paraptosis, in: *Apoptosis and Beyond*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 343–366. <https://doi.org/10.1002/9781119432463.ch16>
- Kim, E.H., Wong, S.-W., Martinez, J., 2019. Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death Differ.* 26, 25–40. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0179-3>
- Kim, M.Y., Choi, E.O., HwangBo, H., Kwon, D.H., Ahn, K.I., Kim, H.J., Ji, S.Y., Hong, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, G.Y., Park, C., Choi, Y.H., 2018. Reactive oxygen species-dependent apoptosis induction by water extract of Citrus unshiu peel in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Nutr. Res. Pract.* 12, 129. <https://doi.org/10.4162/nrp.2018.12.2.129>

- Kim, S.-H., Liu, K.-H., Lee, S.-Y., Hong, S.-J., Cho, B.-K., Lee, H., Lee, C.-G., Choi, H.-K., 2013. Effects of Light Intensity and Nitrogen Starvation on Glycerolipid, Glycerophospholipid, and Carotenoid Composition in *Dunaliella tertiolecta* Culture. *PLOS ONE* 8, e72415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072415>
- Kleinegris, D.M.M., van Es, M.A., Janssen, M., Brandenburg, W.A., Wijffels, R.H., 2010. Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* 22, 645–649. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9505-y>
- Knobbe, A.R., Horken, K.M., Plucinak, T.M., Balassa, E., Cerutti, H., Weeks, D.P., 2015. SUMOylation by a stress-specific small ubiquitin-like modifier E2 conjugase is essential for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *Plant Physiol.* 167, 753–765. <https://doi.org/10.1104/pp.114.256081>
- KWAN, J.A., SCHULZE, C.J., WANG, W., LEON, H., SARIAHMETOGLU, M., SUNG, M., SAWICKA, J., SIMS, D.E., SAWICKI, G., SCHULZ, R., 2004. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J.* <https://doi.org/10.1096/fj.02-1202fje>
- Lai, Y., Xu, X., Zhu, Z., Hua, Z., 2018. Highly efficient siRNA transfection in macrophages using apoptotic body-mimic Ca-PS lipopolyplex. *Int. J. Nanomedicine* 13, 6603–6623. <https://doi.org/10.2147/IJN.S176991>
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H., 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol., Photosynthetic microorganisms for bio-fuel production from sun light* 162, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.018>
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H., 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol.* 26, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.002>
- Lanzarotti, N., 2014. Régulation de la réponse immunitaire T par l'apoptose et hyperactivation de la voie RAS.
- Larsen, B.D., Sørensen, C.S., 2017. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J.* 284, 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/febs.13970>
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Thornton, J.M., 2012. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates [WWW Document]. *Urnisbn978-0-470-66078-2*. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000882>

- Lebert, J.M., Lester, R., Powell, E., Seal, M., McCarthy, J., 2018. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr. Oncol.* 25, S142–S150. <https://doi.org/10.3747/co.25.3954>
- Lechner, M.G., Karimi, S.S., Barry-Holson, K., Angell, T.E., Murphy, K.A., Church, C.H., Ohlfest, J.R., Hu, P., Epstein, A.L., 2013. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J. Immunother.* Hagerstown Md 1997 36, 477–489. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000436722.46675.4a>
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., Clerck, O.D., 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- León, R., Martín, M., Vígara, J., Vilchez, C., Vega, J.M., 2003. Microalgae mediated photoproduction of β -carotene in aqueous–organic two phase systems. *Biomol. Eng., Marine Biotechnology: Basics and Applications* 20, 177–182. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00048-0)
- Li, J., Huang, H., Shan, T., Pang, S., 2019. Selection of reference genes for real-time RT-PCR normalization in brown alga *Undaria pinnatifida*. *J. Appl. Phycol.* 31, 787–793. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1576-1>
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99. <https://doi.org/10.1038/35083620>
- Li, X., Zhang, D., Li, H., Gao, B., Yang, H., Zhang, Y., Wood, A.J., 2015. Characterization of reference genes for RT-qPCR in the desert moss *Syntrichia caninervis* in response to abiotic stress and desiccation/rehydration. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00038>
- Liang, M.-H., Jiang, J.-G., 2017. Analysis of carotenogenic genes promoters and WRKY transcription factors in response to salt stress in *Dunaliella bardawil*. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep37025>
- Liang, M.-H., Lu, Y., Chen, H.-H., Jiang, J.-G., 2017. The salt-regulated element in the promoter of lycopene β -cyclase gene confers a salt regulatory pattern in carotenogenesis of *Dunaliella bardawil*. *Environ. Microbiol.* 19, 982–989. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13539>
- Lieberman, J., Fan, Z., 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 553–559. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00108-0)

- Lin, H.-W., Chen, Y.-C., Liu, C.-W., Yang, D.-J., Chen, S.-Y., Chang, T.-J., Chang, Y.-Y., 2014. Regulation of virus-induced inflammatory response by *Dunaliella salina* alga extract in macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 71, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.026>
- Lin', J.-T., Hu', Y.-C.L.C.-C., Shen, Y.-C., Lu', F.-J., n.d. Evaluation of Carotenoid Extract from *Dunaliella salina* against Cadmium-Induced Cytotoxicity and Transforming Growth Factor β 1 Induced Expression of Smooth Muscle α -Actin with Rat Liver Cell Lines 7.
- Liu, B., Qu, L., Yan, S., 2015. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* 15, 106. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0260-7>
- Long, Z.F., Wang, S.Y., Nelson, N., 1989. Cloning and nucleotide sequence analysis of genes coding for the major chlorophyll-binding protein of the moss *Physcomitrella patens* and the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Gene* 76, 299–312.
- Loza, V., Berrendero, E., Perona, E., Mateo, P., 2013. Polyphasic characterization of benthic cyanobacterial diversity from biofilms of the Guadarrama river (Spain): morphological, molecular, and ecological approaches(1). *J. Phycol.* 49, 282–297. <https://doi.org/10.1111/jpy.12036>
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., Jia, S., 2016. Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152226>
- Ma, Y., Shurin, G.V., Peiyuan, Z., Shurin, M.R., 2012. Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment. *J. Cancer* 4, 36–44. <https://doi.org/10.7150/jca.5046>
- 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. *J. Biotechnol., Prospects and challenges for the development of algal biotechnology* 215, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>
- Maimela, N.R., Liu, S., Zhang, Y., 2019. Fates of CD8⁺ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.004>
- Martinez-Lostao, L., Anel, A., Pardo, J., 2015. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin. Cancer Res.* 21, 5047–5056. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>
- Matsushima, D., Jenke-Kodama, H., Sato, Y., Fukunaga, Y., Sumimoto, K., Kuzuyama, T., Matsunaga, S., Okada, S., 2012. The single cellular green microalga *Botryococcus*

- braunii, race B possesses three distinct 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases. *Plant Sci.* 185–186, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.002>
- McGinnis, K.M., Gnegy, M.E., Park, Y.H., Mukerjee, N., Wang, K.K.W., 1999. Procaspase-3 and Poly(ADP)ribose Polymerase (PARP) Are Calpain Substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 94–99. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1315>
- Mendoza, H., De la Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., Ramos, A.A., de Sousa Duarte, V., Varela, S., Carlos, J., 2008. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electron. J. Biotechnol.* 11, 5–6.
- Mendoza, H., Río, M.J.D., Reina, G.G., Ramazanov, Z., 1996. Low-temperature-induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 31, 329–331. <https://doi.org/10.1080/09670269600651551>
- Merhan, O., 2017. The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. *Carotenoids.* <https://doi.org/10.5772/67592>
- Métailié, G., Lage, A.D., 2015. Dictionnaire de biogéographie végétale (NE): Nouvelle édition encyclopédique et critique. CNRS Editions.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.* 17, 477–489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., Davidson, N.E., 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2666–2676. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa072113>
- Mills, C.D., 2012. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32, 463–488.
- Minckwitz, G. von, Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C., Rezai, M., Blohmer, J.U., Jackisch, C., Paepke, S., Gerber, B., Zahm, D.M., Kümmel, S., Eidtmann, H., Klare, P., Huober, J., Costa, S., Tesch, H., Hanusch, C., Hilfrich, J., Khandan, F., Fasching, P.A., Sinn, B.V., Engels, K., Mehta, K., Nekljudova, V., Untch, M., 2014. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 15, 747–756. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70160-3)

- Minhas, A.K., Hodgson, P., Barrow, C.J., Adholeya, A., 2016. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Mishra, A., Jha, B., 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliellasalina* under salt stress. *Bioresour. Technol.* 100, 3382–3386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.006>
- Mishra, A., Mandoli, A., Jha, B., 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1093–1101. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0387-9>
- Mizuta, R., Araki, S., Furukawa, M., Furukawa, Y., Ebara, S., Shiokawa, D., Hayashi, K., Tanuma, S., Kitamura, D., 2013. DNase γ Is the Effector Endonuclease for Internucleosomal DNA Fragmentation in Necrosis. *PLOS ONE* 8, e80223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080223>
- Moise, A.R., Al-Babili, S., Wurtzel, E.T., 2014. MECHANISTIC ASPECTS OF CAROTENOID BIOSYNTHESIS. *Chem. Rev.* 114, 164–193. <https://doi.org/10.1021/cr400106y>
- Mojaat, M., Pruvost, J., Foucault, A., Legrand, J., 2008. Effect of organic carbon sources and Fe²⁺ ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochem. Eng. J.* 39, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.009>
- Morales, J.C., Li, L., Fattah, F.J., Dong, Y., Bey, E.A., Patel, M., Gao, J., Boothman, D.A., 2014. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 24, 15–28.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., Shiota, K., 1995. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat. Rec.* 242, 103–110. <https://doi.org/10.1002/ar.1092420114>
- Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2016. Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.008>
- Mosaviazam, B., Ramezani, A., Morowvat, M.H., Niazi, A., Mousavi, P., Moghadam, A., Zarrini, G., Ghasemi, Y., 2016. HSP70 Gene Expression Analysis in *Dunaliella salina* Under Salt Stress. *Gene Expr.* 8, 4.
- Munder, M., 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* 158, 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>

- Munhoz, R.R., Postow, M.A., 2016. Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Research* 5, 2545. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9356.1>
- Murthy, K.N.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M.M., Sowmya, P.R., Ravishankar, G.A., 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. *Life Sci.* 76, 1381–1390. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.015>
- Nair, S., Dhodapkar, M.V., 2017. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01178>
- Nan, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Fang, K., Gong, C., Xie, S., 2017. Origin and evolutionary history of freshwater Rhodophyta: further insights based on phylogenomic evidence. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03235-5>
- Nehmé, R., Atieh, C., Fayad, S., Claude, B., Chartier, A., Tannoury, M., Elleuch, F., Abdelkafi, S., Pichon, C., Morin, P., 2017. Microalgae amino acid extraction and analysis at nanomolar level using electroporation and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* 40, 558–566. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601005>
- Nelson, B.H., 2010. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 4977–4982. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001323>
- Newman, L.A., 2015. Disparities in Breast Cancer and African Ancestry: A Global Perspective. *Breast J.* 21, 133–139. <https://doi.org/10.1111/tbj.12369>
- Nikookar, K., Moradshahi, A., Hosseini, L., 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol. Eng.* 22, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.07.001>
- Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M., Khachik, F., Narisawa, T., Takasuka, N., Yano, M., 2000. Cancer prevention by natural carotenoids. *BioFactors Oxf. Engl.* 13, 89–94.
- Nonomura, A.M., Coder, D.M., 1988. Improved Phycocatalysis of Carotene Production by Flow Cytometry and Cell Sorting. *Biocatalysis* 1, 333–338. <https://doi.org/10.3109/10242428808998173>
- Noy, R., Pollard, J.W., 2014. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Ocana, A., Nieto-Jiménez, C., Pandiella, A., Templeton, A.J., 2017. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol. Cancer* 16. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0707-7>

- Olmos, J., Gómez, R., Rubio, V.P., 2015. Apoptosis Comparison Effects Between Synthetic and Natural β -Carotene from *Dunaliella salina* on MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J. Microb. Biochem. Technol.* 51–56. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000181>
- Oren, A., 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst.* 1, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2>
- O’Shaughnessy, J., O’Shaughnessy, J., O’Shaughnessy, J., Osborne, C., Osborne, C., Osborne, C., Pippen, J., Pippen, J., Pippen, J., Patt, D., Patt, D., Rocha, C., Ossovskaya, V., Sherman, B., Bradley, C., 2009. Final Results of a Randomized Phase II Study Demonstrating Efficacy and Safety of BSI-201, a Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor, in Combination with Gemcitabine/Carboplatin (G/C) in Metastatic Triple Negative Breast Cancer (TNBC). *Cancer Res.* 69, 3122–3122. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS-09-3122>
- Ostrand-Rosenberg, S., Fenselau, C., 2018. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment. *J. Immunol.* 200, 422–431. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701019>
- P, N.A., Siddiqui, A., A, H.B., 2011. *ro. J. Cancer Sci. Ther.* 3. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.S17-005>
- Pane, G., Cacciola, G., Giacco, E., Mariottini, G.L., Coppo, E., 2015. Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. *Mar. Drugs* 13, 6440–6452.
- Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z., Sapone, A., Pedulli, G.F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M.S., 2003. β -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat. Res. Mutat. Res.* 543, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00002-4)
- Paolini, M., Cantelli-Forti, G., Perocco, P., Pedulli, G.F., Abdel-Rahman, S.Z., Legator, M.S., 1999. Co-carcinogenic effect of β -carotene. *Nature* 398, 760–761. <https://doi.org/10.1038/19655>
- Park, S., Polle, J.E.W., Melis, A., Lee, T.K., Jin, E., 2006. Up-Regulation of Photoprotection and PSII-Repair Gene Expression by Irradiance in the Unicellular Green Alga *Dunaliella salina*. *Mar. Biotechnol.* 8, 120–128. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-5030-4>
- Pasquet, V., 2011. Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines (phdthesis). Université de La Rochelle.

- Pedrós, R., Moya, I., Goulas, Y., Jacquemoud, S., 2008. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 498–502. <https://doi.org/10.1039/B719506K>
- Peng, G., Wang, C., Song, S., Fu, X., Azam, M., Grierson, D., Xu, C., 2013. The role of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and phytoene synthase gene family in citrus carotenoid accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 71, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.031>
- Person, J., 2011. Livre Turquoise - Algues, Filière du Future. Actes Colloq. Adebitech 17-19 Novembre 2010 Romainville.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pick, U., Katz, A., Weiss, M., Levine, E., Paz, K., Ventrella, R., 2006. Survival at extreme salinity and iron deficiency. *Life Sci. Open Day*.
- Podo, F., Buydens, L.M.C., Degani, H., Hilhorst, R., Klipp, E., Gribbestad, I.S., Van Huffel, S., W.M. van Laarhoven, H., Luts, J., Monleon, D., Postma, G.J., Schneiderhan-Marra, N., Santoro, F., Wouters, H., Russnes, H.G., Sørli, T., Tagliabue, E., Børresen-Dale, A.-L., 2010. Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives. *Mol. Oncol.* 4, 209–229. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.006>
- Polle, J.E.W., Barry, K., Cushman, J., Schmutz, J., Tran, D., Hathwaik, L.T., Yim, W.C., Jenkins, J., McKie-Krisberg, Z., Prochnik, S., Lindquist, E., Dockter, R.B., Adam, C., Molina, H., Bunkenborg, J., Jin, E., Buchheim, M., Magnuson, J., 2017. Draft Nuclear Genome Sequence of the Halophilic and Beta-Carotene-Accumulating Green Alga *Dunaliella salina* Strain CCAP19/18. *Genome Announc.* 5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01105-17>
- Polle, J.E.W., Neofotis, P., Huang, A., Chang, W., Sury, K., Wiech, E.M., 2014a. Carbon partitioning in green algae (chlorophyta) and the enolase enzyme. *Metabolites* 4, 612–628. <https://doi.org/10.3390/metabo4030612>
- Pouyssegur, J., Berra, E., Benizri, E., Dayan, F., Ginouvès, A., Mazure, N., Roux, D., 2004. Hypoxie et croissance tumorale. *J. Radiol.* 85, 1375. [https://doi.org/10.1016/S0221-0363\(04\)77216-9](https://doi.org/10.1016/S0221-0363(04)77216-9)
- Priyadarshani, I., Rath, B., 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Util.* 3, 89–100. [https://doi.org/10.1016/j.\(73\)](https://doi.org/10.1016/j.(73))
- Pulido, P., Toledo-Ortiz, G., Phillips, M.A., Wright, L.P., Rodríguez-Concepción, M., 2013. Arabidopsis J-Protein J20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid

- Pathway to Protein Quality Control. *Plant Cell Online* 25, 4183–4194.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.113001>
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J. v, Hugueney, P., Kleinig, H., 1998. Induced β -Carotene Synthesis Driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicellular Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 116, 1239–1248. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1239>
- Rad, F.A., Aksoz, N., Hejazi, M.A., 2011. Effect of salinity on cell growth and β -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 2282–2289.
- Raja, Rathinam, Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D., Rengasamy, R., 2007. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiol. Res.* 162, 177–184.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.009>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Rengasamy, R., 2007. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 517–523.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0777-8>
- Ramos, A., Coesel, S., Marques, A., Rodrigues, M., Baumgartner, A., Noronha, J., Rauter, A., Brenig, B., Varela, J., 2008. Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* Lcy-beta gene encoding a functional lycopene beta-cyclase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 819–828. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1492-4>
- Ramos, A.A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J.C., Jin, E., Varela, J.C., 2011. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae* 26, 3.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., Forsthuber, T.G., 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74, 5–17.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Raven, J.A., Allen, J.F., 2003. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biol.* 4, 209.
- Robert, X., Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320-324.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., Conte, P., 2017. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* 377, 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>

- Rodríguez-Lescure, Á., Martín, M., Ruiz, A., Alba, E., Calvo, L., García-Asenjo, J.L., Guitian, M., de la Cruz, A., Aranda, I., de Álava, E., 2007. Subgroup analysis of GEICAM 9906 trial comparing six cycles of FE90C (FEC) to four cycles of FE90C followed by 8 weekly paclitaxel administrations (FECp): Relevance of HER2 and hormonal status (HR). *J. Clin. Oncol.* 25, 10598–10598. https://doi.org/10.1200/jco.2007.25.18_suppl.10598
- Ruan, K., Duan, J., Bai, F., Lemaire, M., Ma, X., Bai, L., 2009. Function of *Dunaliella salina* (Dunaliellaceae) enolase and its expression during stress. *Eur. J. Phycol.* 44, 207–214. <https://doi.org/10.1080/09670260802573105>
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M., 2015. A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLOS ONE* 10, e0119248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Ruperez, F.J., Garcia-Martinez, D., Baena, B., Maeso, N., Vallejo, M., Angulo, S., Garcia, A., Ibañez, E., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Barbas, C., 2009. *Dunaliella salina* extract effect on diabetic rats: Metabolic fingerprinting and target metabolite analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 786–792. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.12.041>
- Saha, S.K., Kazipet, N., Murray, P., 2018. The Carotenogenic *Dunaliella salina* CCAP 19/20 Produces Enhanced Levels of Carotenoid under Specific Nutrients Limitation [WWW Document]. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2018/7532897>
- Saini, R.K., Keum, Y.-S., 2017. Progress in Microbial Carotenoids Production. *Indian J. Microbiol.* 57, 129–130. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0637-x>
- Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Rivera, C., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Gnjatic, S., Bhardwaj, N., Palucka, A.K., Brown, B.D., Brody, J., Ginhoux, F., Merad, M., 2016. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 44, 924–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.03.012>
- Sánchez-Estudillo, L., Freile-Pelegrin, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D., Narváez-Zapata, J.A., 2006. Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Lett.* 28, 787–791. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9001-2>

- Schirrmeister, B.E., Gugger, M., Donoghue, P.C.J., 2015. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* 58, 769–785. <https://doi.org/10.1111/pala.12178>
- Seiller, C., Dubois, B., 2017. Rôle protumoral des lymphocytes B dans le cancer du pancréas - Vers de nouvelles pistes thérapeutiques? *médecine/sciences* 33, 859–862. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310015>
- Shaker, S., 2017. Effects of Sulfur, Iron and Manganese Starvation on Growth, β -carotene Production and Lipid Profile of *Dunaliella salina*. *J. Young Pharm.* 9, 43–46. <https://doi.org/10.5530/jyp.2017.9.9>
- Shanab, S.M., Mostafa, S.S., Shalaby, E.A., Mahmoud, G.I., 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 608–615. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60106-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60106-3)
- Shang, Q., Xu, C., Zhang, J., Zhang, X., Tu, X., 2009. Solution structure of SUMO from *Trypanosoma brucei* and its interaction with Ubc9. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 76, 266–269. <https://doi.org/10.1002/prot.22409>
- Sheu, M.-J., Huang, G.-J., Wu, C.-H., Chen, J.-S., Chang, H.-Y., Chang, S.-J., Chung, J.-G., 2008. Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Vivo Athens Greece* 22, 369–378.
- Shin, W.-H., Kim, J.-K., Kim, D.-S., Seok, C., 2013. GalaxyDock2: protein-ligand docking using beta-complex and global optimization. *J. Comput. Chem.* 34, 2647–2656. <https://doi.org/10.1002/jcc.23438>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sikov, W.M., Berry, D.A., Perou, C.M., Singh, B., Cirrincione, C.T., Tolaney, S.M., Kuzma, C.S., Pluard, T.J., Somlo, G., Port, E.R., Golshan, M., Bellon, J.R., Collyar, D., Hahn, O.M., Carey, L.A., Hudis, C.A., Winer, E.P., 2015. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 13–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>

- Silver, D.P., Richardson, A.L., Eklund, A.C., Wang, Z.C., Szallasi, Z., Li, Q., Juul, N., Leong, C.-O., Calogrias, D., Buraimoh, A., Fatima, A., Gelman, R.S., Ryan, P.D., Tung, N.M., De Nicolo, A., Ganesan, S., Miron, A., Colin, C., Sgroi, D.C., Ellisen, L.W., Winer, E.P., Garber, J.E., 2010. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 1145–1153. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4725>
- Simion, V., Sobilo, J., Clemoncon, R., Natkunarajah, S., Ezzine, S., Abdallah, F., Lerondel, S., Pichon, C., Baril, P., 2017. Positive radionuclide imaging of miRNA expression using RILES and the human sodium iodide symporter as reporter gene is feasible and supports a protective role of miRNA-23a in response to muscular atrophy. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177492>
- Singh, S.K., Sundaram, S., Kishor, K., 2014. *Photosynthetic Microorganisms: Mechanism For Carbon Concentration*. Springer.
- Somasekharan, S.P., El-Naggar, A., Sorensen, P.H., Wang, Y., Cheng, H., 2016. An Aqueous Extract of Marine Microalgae Exhibits Antimetastatic Activity through Preferential Killing of Suspended Cancer Cells and Anticolony Forming Activity [WWW Document]. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* <https://doi.org/10.1155/2016/9730654>
- Sparano, J.A., Zhao, F., Martino, S., Ligibel, J.A., Perez, E.A., Saphner, T., Wolff, A.C., Sledge, G.W., Wood, W.C., Davidson, N.E., 2015. Long-Term Follow-Up of the E1199 Phase III Trial Evaluating the Role of Taxane and Schedule in Operable Breast Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 2353–2360. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.60.9271>
- Specian, A.F.L., Serpeloni, J.M., Tuttis, K., Ribeiro, D.L., Cilião, H.L., Varanda, E.A., Sannomiya, M., Martinez-Lopez, W., Vilegas, W., Cólus, I.M.S., 2016. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology* 68, 2729–2744. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9998-6>
- Sperandio, S., de Belle, I., Bredesen, D.E., 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14376–14381.
- Srinivasan, R., Chaitanyakumar, A., Mageswari, A., Gomathi, A., Kumar, J.G.S.P., Jayasindu, M., Bharath, G., Shravan, J.S., Gothandam, K.M., 2017. Oral administration of lyophilized *Dunaliella salina*, a carotenoid-rich marine alga, reduces

- tumor progression in mammary cancer induced rats. *Food Funct.* 8, 4517–4527.
<https://doi.org/10.1039/C7FO01328K>
- Stanton, S.E., Disis, M.L., 2016. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J. Immunother. Cancer* 4. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>
- Sui, Y., Vlaeminck, S.E., 2019. Effects of salinity, pH and growth phase on the protein productivity by *Dunaliella salina*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 1032–1040.
<https://doi.org/10.1002/jctb.5850>
- Takagi, M., Karseno, null, Yoshida, T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 223–226. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.223>
- Teodoresco, E.C., 1905. Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée - Polyblepharidée. *Beih. Zum Bot. Cent.* 215–232.
- Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2018. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01838>
- Thomas, J.-C., 1989. L'antenne collectrice d'énergie lumineuse à phycobiliprotéines chez les cyanobactéries. *Bull. Société Bot. Fr. Actual. Bot.* 136, 31–49.
<https://doi.org/10.1080/01811789.1989.10826916>
- Tian, C., Jiang, Q., Wang, F., Wang, G.-L., Xu, Z.-S., Xiong, A.-S., 2015. Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. *PLOS ONE* 10, e0117569.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117569>
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., Liang, J., 2018. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* 46, W363–W367.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky473>
- Trösch, R., Mühlhaus, T., Schroda, M., Willmund, F., 2015. ATP-dependent molecular chaperones in plastids — More complex than expected. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., SI: Chloroplast Biogenesis* 1847, 872–888.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.002>
- Trujillo-Hdz, J.A., Cárdenas-Conejo, Y., Turriza, P.E., Aguilar-Espinosa, M., Carballo-Uicab, V., Garza-Caligaris, L.E., Comai, L., Rivera-Madrid, R., 2016. Functional polymorphism in lycopene beta-cyclase gene as a molecular marker to predict bixin production in *Bixa orellana* L. (achiote). *Mol. Breed.* 36.
<https://doi.org/10.1007/s11032-016-0555-y>

- Tsukumo, S., Yasutomo, K., 2018. Regulation of CD8⁺ T Cells and Antitumor Immunity by Notch Signaling. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00101>
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J.E., Domchek, S.M., Audeh, M.W., Weitzel, J.N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R.K., Wardley, A., Mitchell, G., Earl, H., Wickens, M., Carmichael, J., 2010. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *The Lancet* 376, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60892-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60892-6)
- Ukibe, K., Katsuragi, T., Tani, Y., Takagi, H., 2008. Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* 286, 241–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01278.x>
- Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Veglia, F., Gabrilovich, D.I., 2017. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.* 45, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.01.002>
- Verneret, M., 2012. Reconnaissance et phagocytose des cellules apoptotiques “Rôle de C1q et de la calréticuline” (phdthesis). Université de Grenoble.
- Vinogradov, S., Warren, G., Wei, X., 2014. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. *Nanomed.* 9, 695–707. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.13>
- Wahba, H.A., El-Hadaad, H.A., 2015. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Med.* 12, 106–116. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030>
- Wellburn, A.R., Lichtenthaler, H., 1984. Formulae and Program to Determine Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents, in: *Advances in Photosynthesis Research, Advances in Agricultural Biotechnology*. Springer, Dordrecht, pp. 9–12. https://doi.org/10.1007/978-94-017-6368-4_3
- Wilhelmsson, P.K.I., Mühlich, C., Ullrich, K.K., Rensing, S.A., 2017. Comprehensive Genome-Wide Classification Reveals That Many Plant-Specific Transcription Factors Evolved in Streptophyte Algae. *Genome Biol. Evol.* 9, 3384–3397. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx258>

- Wongsansilp, T., Juntawong, N., Wu, Z., 2016. Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation. *J. Biol. Res. - Boll. Della Soc. Ital. Biol. Sper.* 89. <https://doi.org/10.4081/jbr.2016.5866>
- Wu, J., Li, S., Yang, Y., Zhu, S., Zhang, M., Qiao, Y., Liu, Y.-J., Chen, J., 2016. TLR-activated plasmacytoid dendritic cells inhibit breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8, 11708–11718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14315>
- Wu, Y.-L., Ding, Y.-P., Tanaka, Y., Shen, L.-W., Wei, C.-H., Minato, N., Zhang, W., 2014. $\gamma\delta$ T Cells and Their Potential for Immunotherapy. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 119–135. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7823>
- Wu, Z., Akter, R., Arirob, W., Juntawong, N., Ma, C., Duangmanee, P., 2015. Effects of light intensity and the remaining nitrate concentration on the beta-carotene accumulation of a wild *Dunaliella salina* strain isolated from the saline soil. *Microbiol. Res.* 6. <https://doi.org/10.4081/mr.2015.6233>
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., Ma, C., 2016. The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil. *Jundishapur J. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.5812/jjm.26732>
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496, 445. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xia, B.-B., Wang, S.-H., Duan, J.-B., Bai, L.-H., 2014. The relationship of glycerol and glycolysis metabolism pathway under hyperosmotic stress in *Dunaliella salina*. *Cent. Eur. J. Biol.* 9, 901–908. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0323-0>
- Xia, J.-X., Ikeda, M., Shimizu, T., 2004. ConPred_elite: a highly reliable approach to transmembrane topology predication. *Comput. Biol. Chem.* 28, 51–60.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Xu, Y., Ibrahim, I.M., Wosu, C.I., Ben-Amotz, A., Harvey, P.J., 2018. Potential of New Isolates of *Dunaliella Salina* for Natural β -Carotene Production. *Biology* 7. <https://doi.org/10.3390/biology7010014>
- Yang, D.-J., Lin, J.-T., Chen, Y.-C., Liu, S.-C., Lu, F.-J., Chang, T.-J., Wang, M., Lin, H.-W., Chang, Y.-Y., 2013. Suppressive effect of carotenoid extract of *Dunaliella salina* alga

- on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells via NF- κ B and JNK inactivation. *J. Funct. Foods* 5, 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.001>
- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., Wu, G.-H., 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnol. Adv.* 26, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.004>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091957>
- Yokthongwattana, K., Chrost, B., Behrman, S., Casper-Lindley, C., Melis, A., 2001. Photosystem II Damage and Repair Cycle in the Green Alga *Dunaliella salina*: Involvement of a Chloroplast-Localized HSP70. *Plant Cell Physiol.* 42, 1389–1397. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce179>
- Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I.N., Biswas, S.K., Gabrilovich, D.I., 2012. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.* 91, 167–181. <https://doi.org/10.1189/jlb.0311177>
- Yu, Q., Schaub, P., Ghisla, S., Al-Babili, S., Krieger-Liszkay, A., Beyer, P., 2010b. The lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (formerly *Erwinia uredovora*) catalyzes an FADred-dependent non-redox reaction. *J. Biol. Chem.* 285, 12109–12120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091843>
- Yuen, G.J., Demissie, E., Pillai, S., 2016. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* 2, 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.010>
- Zhang, J., Fan, M., Xie, J., Wang, Z., Wang, B., Zhang, S., Wang, L., Cao, J., Tao, Z., Li, T., Hu, X., 2015. Chemotherapy of metastatic triple negative breast cancer: Experience of using platinum-based chemotherapy. *Oncotarget* 6, 43135–43143. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5654>
- Zhao, L., Gong, W., Chen, X., Chen, D., 2013. Characterization of genes and enzymes in *Dunaliella salina* involved in glycerol metabolism in response to salt changes. *Phycol. Res.* 61, 37–45. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00669.x>
- Zhu, J., Paul, W.E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
- Zhu, P., Martinvalet, D., Chowdhury, D., Zhang, D., Schlesinger, A., Lieberman, J., 2009. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates

poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood* 114, 1205–1216.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195768>

Zhu, Y.-H., Jiang, J.-G., Chen, Q., 2008. Characterization of cDNA of lycopene beta-cyclase responsible for a high level of beta-carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 86, 285–292. <https://doi.org/10.1139/o08-012>

Annexe 1

Tableau 1. *Quelques exemples des domaines d'utilisation des algues (Metting, 1996; Person, 2011; Priyadarshani and Rath, 2012)*

Domaine	algues	molécules	activités
Pharmaceutique	<i>Tolypothrix byssoidea</i>	tubercidine	Anti P-388 lymphocytic leukemia
	<i>Chlamydomonas</i>	L-asparaginase	lymphosarcoma
	<i>Lyngbya majuscula.</i>	Dibromoaplysiatoxine	Activité anticancéreuse et antivirale (anti-HIV)
	<i>diatoms</i>	Sulfoquinosovyl diglyceride	antivirale
	<i>Chlorella</i>	β -1,3-glucane	immunostimulant actif, piègeur de radicaux libres, réducteur des lipides sanguins. Utilisé contre les ulcères gastriques, les plaies et la constipation ; préventives contre l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie des actions antitumorales
Cosmétique	<i>D. salina</i>	β -carotène	Anticancérigène, contrôler le cholestérol et réduire les risques de maladies cardiaques
	<i>Chondrus crispus, Mastocarpus stellatus, Ascophyllum nodosum, Alaria esculenta, Spirulina platensis, Nannochloropsis oculata, Chlorella vulgaris et D. salina.</i>	sporopollénine, la scytonemine et les acides aminés de type mycosporine	soin du visage et de la peau (crème anti-âge, produits de soin rafraîchissants ou régénérants, émoullient, anti-irritant dans les épilateurs, produits de protection solaire et de soins capillaires)
Complément alimentaire	<i>Prymnésiophytes, prasinophytes, diatomées et algue brun doré</i>	Acide gras W3	diminution de l'incidence des maladies cardiaques
	--	EPA: C20:5 ADH: C22:6	additifs dans les préparations pour nourrissons (développement du cerveau et des yeux)
	<i>Spiruline</i>	protéine	
Alimentation animale	--	Astaxanthine AGPI	aliment pour les mollusques (palourdes et huîtres), les crustacés

			(crevettes) et le poisson nourrir les larves d'aquaculture
	<i>Chlorella</i>	--	Amélioration de la couleur de la peau des volailles, des jarrets et de leurs jaunes d'œufs
Produits chimiques de spécialité		phycobilines	étiquetage des cellules fluorescentes
	<i>Spiruline</i>	phycocyanine, phycobiline bleu	colorer les produits alimentaires et cosmétiques
Energie	<i>Chlorella vulgaris</i> et <i>Chlamydomonas perigranulata</i>	amidon	production d'éthanol par fermentation anaérobie
Traitement des déchets	<i>Ankistrodesmus, Chlorella, Scenedesmus</i>		Traitement des effluents
	<i>Anabaena, Nostoc, Aulosira, Tolypothrix et Scytonema</i>		Fixateur de N ₂ ($\pm 20 \text{ kg}$ N ha^{-1} an^{-1})
biofertilisants et conditionneurs de sol	<i>Anabaena azollae</i>		engrais vert ; culture d'accompagnement dans la production de riz
	<i>Chlamydomonas</i>		agents de conditionnement du sol pour lutter contre l'érosion des sols irrigués
Chimie verte	<i>Spiruline</i>	polyhydroxyalkanoates IgA1 (virus de l'herpès)	Bioplastiques
Transformations des algues	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	HSV lsc	large single chain (lsc) d'anticorps
		M-SAA	
	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Hormone de croissance	
	<i>Chlorella</i>	NP-1 (peptide neutrophile)	Activité antibactérienne in vitro
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	VP1 fièvre aphteuse	Protéine vaccinale
	<i>D. salina</i>	Antigène de surface de l'hépatite B	

Annexe 2

Article

Carotenoids Overproduction in *Dunaliella* Sp.: Transcriptional Changes and New Insights through Lycopene β Cyclase Regulation

Fatma Elleuch ^{1,2}, Hajer Ben Hlima ³, Mohamed Barkallah ³, Patrick Baril ², Slim Abdelkafi ³ ,
Chantal Pichon ²  and Imen Fendri ^{1,*} 

¹ Laboratoire de Biotechnologie Végétale Appliquée à l'Amélioration des Cultures, Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Sfax 3000, Tunisia; fatma.elleuch@cnrs-orleans.fr

² Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS UPR 4301, 45071 Orleans, France; patrick.baril@cnrs.fr (P.B.); Chantal.PICHON@cnrs.fr (C.P.)

³ Unité de Biotechnologie des Algues, Biological Engineering Department, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax 3038, Tunisia; hajer_benhlma@yahoo.fr (H.B.H.); mohamedbarkallah@gmail.com (M.B.); slim.abdelkafi@enis.tn (S.A.)

* Correspondence: imen.fendri@fss.usf.tn

Received: 16 October 2019; Accepted: 22 November 2019; Published: 10 December 2019



Abstract: *Dunaliella* is a green microalga known for its ability to produce high levels of carotenoids under well-defined growing conditions. Molecular responses to the simultaneous effect of increasing salinity, light intensity and decrease of nitrogen availability were investigated in terms of their effect on different metabolic pathways (isoprenoids synthesis, glycolysis, carbohydrate use, etc.) by following the transcriptional regulation of *enolase* (*ENO*), *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase* (*DXS*), *lycopene β -cyclase* (*LCYB*), *carotene globule protein* (*CGP*), *chloroplast-localized heat shock protein* (*HSP70*), and *chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase* (*RPE*) genes. The intracellular production of carotenoid was increased five times in stressed *Dunaliella* cells compared to those grown in an unstressed condition. At transcriptional levels, *ENO* implicated in glycolysis, and revealing about polysaccharides degradation, showed a two-stage response during the first 72 h. Genes directly involved in β -carotene accumulation, namely, *CGP* and *LCYB*, revealed the most important increase by about 54 and 10 folds, respectively. In silico sequence analysis, along with 3D modeling studies, were performed to identify possible posttranslational modifications of *CGP* and *LCYB* proteins. Our results described, for the first time, their probable regulation by sumoylation covalent attachment as well as the presence of expressed SUMO (small ubiquitin-related modifier) protein in *Dunaliella* sp.

Keywords: *CGP*; *LCYB*; microalgae; modeling; reference gene; transcriptional analysis

1. Introduction

The genus *Dunaliella* is composed of 24 unicellular species, uninucleate [1], enclosed by a glycocalyx [2] and without a rigid polysaccharide wall, allowing a rapid response to hypo or hyperosmotic conditions [3]. The halotolerant *Dunaliella salina*, the holotype of this genus, is characterized by an exceptional capacity to survive under some environmental stress by producing added value compounds as glycerol, polyunsaturated fatty acids, and a high percentage of β -carotene reaching 10% to 14% of dry weight [2].

The majority of carotenoids are C_{40} isoprenoids with color ranging from yellow to red and are divided into carotenes and xanthophylls [4]. The β -carotene molecule is an orange compound, comprising a long conjugated chain of eight isoprene units with a center of symmetry and a β -cyclohexene ring at each end [5]. It can be found in four possible stereoisomers: 9-*cis* β -carotene,

all-trans β -carotene, *13-cis* β -carotene, and *15-cis* β -carotene. The amount of *9-cis* isoform could reach 60% of the total carotenoids in *Dunaliella* cells [6].

Carotenoids are extremely beneficial for plants and human health. In photosynthetic organisms, this polyene compound is part of the light-harvesting antenna structure, Photosystem I (PS I) and Photosystem II (PS II), and cytochrome *b₆/f* complex and maintains the integrity of cell architecture [7]. It also protects the photosynthetic apparatus from an injury occurring during photo-inhibition, photo-oxidation [1,8], and high temperature by thermal dissipation [7]. They have a wide range of applications, mainly thanks to their antioxidative properties. In the medical field, they are claimed to prevent or cure many pathologies [1,9] as cataract, cardiovascular diseases, and some cancers [10–13]. In addition, their impressive color allows their exploitation in many food and cosmetic industrial applications as dietary supplements or colorants [14]. *D. salina* produces primarily the β -carotene that is the precursor of vitamin A and other carotenoids like zeaxanthin, cryptoxanthin, neoxanthin, [15], phytoene, phytofluene, and lutein.

The carotenogenesis pathway in *Dunaliella* could be divided into three steps [1], which are the geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) biosynthesis, lycopene biosynthesis, and the generation of different carotenoids with cyclohexane rings. Lycopene β -cyclase introduces two β -cyclohexane rings in each extremity of lycopene to generate β -carotene [16].

This key enzyme, responsible for the biosynthesis of β -carotene, seems to have the same common ancestor in plants, algae, and cyanobacteria. It exists under two types, epsilon and beta, resulting from an ancient gene duplication event or gene transfer proceeded by endosymbiosis [17]. *D. salina* possesses one copy of the *LCYB* gene in the beta form with 11 exons and 10 introns [18], while epsilon form is supposed to be lost in evolution [17]. The functioning of this enzyme can be inhibited by many factors, such as nicotine [19].

D. salina *LCYB* (lycopene β -cyclase) was identified by Ramos et al. [18] and Zhu et al. [20]. *LCYB* isolated by Ramos et al. is a 584 amino acid protein of 64.5 kDa (ACA34344.1). The findings of Zhu et al. [20] suggested that *LCYB* might be found as a multi-enzyme complex with another lycopene desaturase.

This biogenesis pathway of β -carotene is supposed to be regulated both at transcriptional and posttranscriptional levels [21] as it is influenced by many conditions. Many researchers reviewed and tried to pose the possible mechanism involved in its accumulation. In fact, carotenoid accumulation depends on the level and quality of light [8], temperature [22], nutrient availability as nitrogen [23,24], sulfur, iron, and manganese [25], phosphorus [26], salinity [27–29], etc. Stress conditions stimulate the production of reactive oxygen species (ROS), which could play the role of the second messenger for the expression of certain transcription factors, resulting in the accumulation of antioxidant molecules by cells [30]. These authors have suggested that the lipids of the chloroplast membrane are the major receptors of these stimulators. However, until now, this mechanism is still not well explained.

Dunaliella accumulates carotenoids in plastoglobules in the interthylakoid space of the chloroplasts [15]. It was assumed that plastoglobules are derived from the disintegration of the eyespot [31]. These lipid globules contain mainly CGP (carotene globule protein), which is a lipid-associated protein of 38 kDa containing 37 proline residues [32]. This protein was demonstrated to be essential for maintaining the stability of plastoglobules [33].

In this work, we investigated how simultaneous variations of salinity (NaCl), nitrogen concentration, and light intensity affect carotenoids accumulation in *Dunaliella* sp. and the effect of these conditions on the transcriptional response of genes involved in their production. We also attempted to understand how this stress could affect *LCYB* molecule by generating its 3D structure.

2. Materials and Methods

2.1. Microalga and Growth Conditions

Dunaliella sp. was isolated from the Sebkhah of Sidi El Hani (Sousse, Tunisia), having 97% of similarity with *D. salina*, *D. quartolecta*, and *D. polymorpha* [34]. It was cultivated in the F/2 medium [35] based on artificial seawater (ASW). Cells were grown either under unstressed condition (DSC) with a salinity (NaCl concentration) equal to 0.46 M (27 g·L⁻¹), a light intensity of 80 μmol photons m⁻² s⁻¹, and a Nitrogen source (0.88 mM NaNO₃, 9.89 mM KNO₃) or stressed condition (DSS) with a salinity equal to 2 M (116.88 g·L⁻¹), a light intensity of 540 μmol photons m⁻² s⁻¹, and a Nitrogen source (1 mM NaNO₃, 0 mM KNO₃). For this purpose, an exponential growing starting culture was used to inoculate both control and stressed culture at day 0. Cultures were maintained at 25 °C under continuous illumination by a fluorescent lamp.

2.2. Pigments Extraction

Pigments were extracted from 2 mL of cell cultures. To this pellet, 2 mL of 96% ethanol was added, and the mixture was sonicated at 40 kHz over 20 min and then incubated overnight at 4 °C in the dark. Cells debris was removed by centrifugation (10,000× g, 10 min) to recover pigments in the supernatant. Total chlorophyll and carotenoid amounts were measured by spectrophotometry using equations given by Wellburn and Lichtenthaler [36]. As stated in a previous study, we assumed that the total carotenoid content could be a good indicator of the β-carotene content as it is the main carotenoid in the pigment composition of *D. salina* [37].

2.3. Flow Cytometry Analysis

To study the intrinsic and extrinsic characteristics of the microalgae cell, flow cytometry analysis was used, as described by Dammak et al. [38]. All cytometric measurements were done using a BD LSR (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with two lasers: argon (λ_{ex}488 nm) and helium-neon (λ_{ex}633 nm). Data were processed with CellQuest Pro software. The diagrams presented in this document were processed online (www.cytobank.org). Argon probe was used as it is associated with the emission channels FL1 (FITC), FL2 (PE), and FL3 (PerCP), which emit at the wavelengths 530/30, 575/26, and 682/13 nm, respectively. The signal intensities of fluorescence were calculated from the mean fluorescence intensity of 10,000 events.

2.4. RNA Extraction

Stressed and non-stressed cells at different stages of incubation (0, 4, 24, 48, and 72 h) were harvested by centrifugation at 1800× g for 10 min. RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and further purified using column and wash buffer of the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentrations and quality were determined by the measurement of absorbance (260 nm/280 nm) using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and agarose gel electrophoresis. Approximately 1 μg of the resulting total RNA was used for the synthesis of cDNA using the PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Shiga, Japan) according to the manufacturer's protocol.

2.5. qRT-PCR

2.5.1. Primers Design and Validation, Reference Gene Selection

Specific primer pairs for *alpha-tubulin* (α-TUB), *beta-tubulin* (β-TUB), *Enolase* (ENO), *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase* (DXS), *lycopene β-cyclase* (LCYB), *chloroplast-localized heat shock protein* (HSP70), and *chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase* (RPE) were designed based on the sequences of the corresponding genes in the *D. salina* genome deposited in GenBank. Whereas, primer pairs for *carotene globule protein* (CGP) amplification were designed based on the sequence of the corresponding

gene in *Dunaliella bardawil* genome, as the sequence among *Dunaliella salina* is not available. All primer sequences were designed using Primer-BLAST from NCBI and Primer 3 Input 4.0. Primer pairs used for *Actin* (*Act*) and *18S rRNA* are those cited by [39,40], respectively. Primer set and amplicon characteristics are represented in Table 1. The designed primers obeyed to the following criteria: a length between 18–24 nucleotides, an amplicon length from 100 to 200 bp, chosen temperature (T_m) around 60 °C, and avoiding secondary structures and self- and cross-annealing. The specificity of the designed primer was verified by the blast search function (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Furthermore, the optimal concentrations were set after testing three different primer concentrations ranging from 100 to 200 nM to avoid non-specific products and/or primer-dimer artifacts.

Gene coding for *Act*, *18S RNA*, α -*TUB*, and β -*TUB* was used for the screening of the most stable gene in all experiment conditions as they are known to be classic plant reference gene candidates [41]. Quantification cycle (Cq) values were imported into the comprehensive web-based tool RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>), which integrates commonly used reference gene evaluation programs together, including geNorm, NormFinder, Bestkeeper, and the comparative delta Ct methods [41,42]. Results elaborated by RefFinder were confirmed by GeNorm, which is available on excel file [43].

2.5.2. qPCR Conditions

qPCR was performed using the Step One QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's manual using the LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland). Cycling parameters were an initial denaturation at 95 °C for 5 min, 40 cycles at 95 °C for 10 s, and 60 °C for 30 s. A step of fusion by heating from 60 °C to 95 °C was added to verify the amplification specificity of each primer pair. Data acquisition and analysis were performed by LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (Roche). Relative gene expression was calculated using reference genes α -*TUB*. The Cq values were corrected with the estimated PCR efficiency, which was evaluated using a four-point standard curve consisting of a 2-fold dilution series. All reactions were performed in triplicate. The relative quantification of the stressed sample at different times versus non-stressed sample at T0 was calibrated, and the fold changes were then calculated using the following Equation (1) [44]:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control-sample})}} \quad (1)$$

Calculated fold changes were analyzed statistically using XLSTAT 2017.5.47467 version (Addinsoft). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey (honest significant difference) HSD test and Dunnett test were applied.

2.6. Retrieval of Protein Sequences and In Silico Analysis

The amino acid sequences of LCYB and CGP from *Dunaliella sp.* were retrieved from the protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) under the accession numbers of ACA34344.1 and AFU62958.1, respectively. The nucleotide sequence of SUMO (small ubiquitin-related modifier) was searched by blast against the Expressed Sequence Tag (EST) database of *Dunaliella sp.* Then, the open reading frame (ORF) sequences were generated from the corresponding cDNA (GenBank: HO848823.1) using ORFfinder from NCBI, and the obtained proteins were blasted against the non-redundant protein database. The protein sequence corresponding to ORF2 presented 52.87% and 49.47% with SUMO protein from two Chlorophyta *Ostreococcus tauri* and *Monoraphidium neglectum*, respectively. The motifs search was performed using the motif search tools from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.genome.jp/tools/motif/>).

Table 1. Primers used in this study and their corresponding amplicons size, melting temperature T_m (°C) based on melt curve analysis, amplification efficiency E (%), and their reference or access number.

Gene Name	Abbreviation		Primer Sequence (5'→3')	Amplicon Size (bp)	T _m (°C)	E (%)	Reference/Access Number
<i>Actin</i>	<i>Act</i>	F R	ACCACACCTTCTTCAACGAG GGATGGCTACATACATGGCA	150	86.76	111.35	[39]
<i>18S RNA</i>	<i>18S</i>	F R	TGGGTAGTCGGGCTGGTC CGCTGCGTTCTTCATCGTT	-	83.2	92.6	[40]
<i>Alpha tubulin</i>	<i>α-TUB</i>	F R	GAGATCACCAACGCTGCCTTTGA CACCACATCACCGCGGTACAT	105	86.03	106.2	JF346103.1
<i>Beta tubulin</i>	<i>β-TUB</i>	F R	AGGAGGGCGAGTTTGAGGGT AGCGCGGTGGACTTGAACAG	137	83.12	92.4	DQ080916.1
<i>Enolase</i>	<i>ENO</i>	F R	TGAAGGGCATGGACCCCAGG TGGCAGTTGCCAGGGAGACA	123	85.66	97.23	KM008612.1
<i>1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase</i>	<i>DXS</i>	F R	AGGACTTACGCCTGGCCACAT GCAGCAACCAGGCCAGTGTT	102	85.67	94.86	FJ469276.1
<i>Lycopene β-cyclase</i>	<i>LCYB</i>	F R	CCTGCAATCACACAGGCGG GGGGTTTCTGGCGTCCTCT	130	87.91	97.1	EU327876.1
<i>Carotene globule protein</i>	<i>CGP</i>	F R	GGCAACCGAGGCAGTGACTACCA GGAACTCCGGTGGACATCTGGTT	104	85.18	111	JX646677.1
<i>Chloroplast-localized heat shock protein</i>	<i>HSP70</i>	F R	TGCAGGCTGGTGTGCTGTCT AGGGTGGTGTTCGGGGTGAT	124	87.88	99.03	AJ271605.2
<i>Chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase</i>	<i>RPE</i>	F R	TGATCAAGGACCTGGGCTGCAA AGCCAGGGTTCACGGACATGA	120	85.96	97.33	JF346108.1

Prediction of posttranslational modifications was performed with SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) bioinformatics tools from the ExPASy bioinformatics resource portal (www.expasy.org). Sumoylation was further assessed using SUMOplot (<http://www.abgent.com/tool/sumoplot>). Multiple sequence alignment of LCYB sequences was performed with Clustalw using default parameters [45] and formatted with Esript 3.0 [46]. TMHMM server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) [47] was used to predict transmembrane helices.

2.7. Three-Dimensional Protein Modeling

Homology modeling was performed with the SWISS-MODEL server (<http://www.expasy.org/swissmod/>). For the LCYB model, the crystal structure of geranylgeranyl reductase (PDB ID 4OPL) was used as a template since no structure of LCYB was found in the database [16]. The modeled structure was further validated by performing the Ramachandran map analysis using the PROCHECK server [48]. However, the generated model was truncated in its N-terminal and C-terminal ends due to the non-total coverage sequence with the template. For SUMO protein, the solution structure of SUMO from *Trypanosoma brucei* was used as a template (PDB ID 2k8h.1), and the generated model was equally validated.

The models were viewed using The Discovery Studio software [Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.5, 2015] and The PyMol Molecular Graphics System v1.2r3 pre (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA). Possible active sites of LCYB were determined using the CASTp web server [49].

2.8. Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)-Docking

The FAD docking was performed using the Galaxy web server, where parameters are set as default. GalaxyDock performs conformational space annealing (CSA) global optimization to find the optimal binding pose of a ligand both in the rigid-receptor mode and the flexible-receptor mode [50].

3. Results

3.1. Characterization of *Dunaliella* in the Two Cultural Conditions

3.1.1. Influence of Stressed Condition on Cell Growth

Dunaliella sp. was grown in F/2 medium under unstressed (DSC) and stressed (DSS) conditions. In the latter case, a rise in salinity and light intensity was applied against a decrease in nitrogen source. The follow-up of the growth among 29 days showed that DSS maintained the same growth rate as DSC during the first 6 days of culture (Figure 1a). Subsequently, DSC continued to grow during the follow-up while DSS appeared to stop dividing.

3.1.2. Pigments Accumulation

The production of pigments by DSC and DSS during one month of culture was followed by biochemical quantification. For DSC, the increase in pigment concentration over the time was due to the increase in cell numbers and not to an intracellular over-accumulation as we noticed that the concentrations presented in $\mu\text{g/mL}$ increased over time (Figure 1b) whereas those presented in pg/cell were almost constant (Figure 1c). Whereas for DSS, the metabolism of cells was totally oriented to carotenoid accumulation. Chlorophyll production measured in the culture ($\mu\text{g/mL}$) and on the intracellular side ($\mu\text{g/cell}$) were maintained at a basal level (Figure 1b,c). Carotenoids production in culture and intracellularly increased simultaneously (Figure 1b,c).

The accumulation of carotenoids by DSS was greater than that in DSC. For example, the number of carotenoids produced was 3.38 ± 0.33 and 17.96 ± 0.67 pg/cell in DSC and DSS, respectively, on day 17, which represents a five-fold increase. The ratio of carotenoids/chlorophylls in DSS culture vs. DSC culture was highly increased, reaching 18 times at the end of the exponential phase.

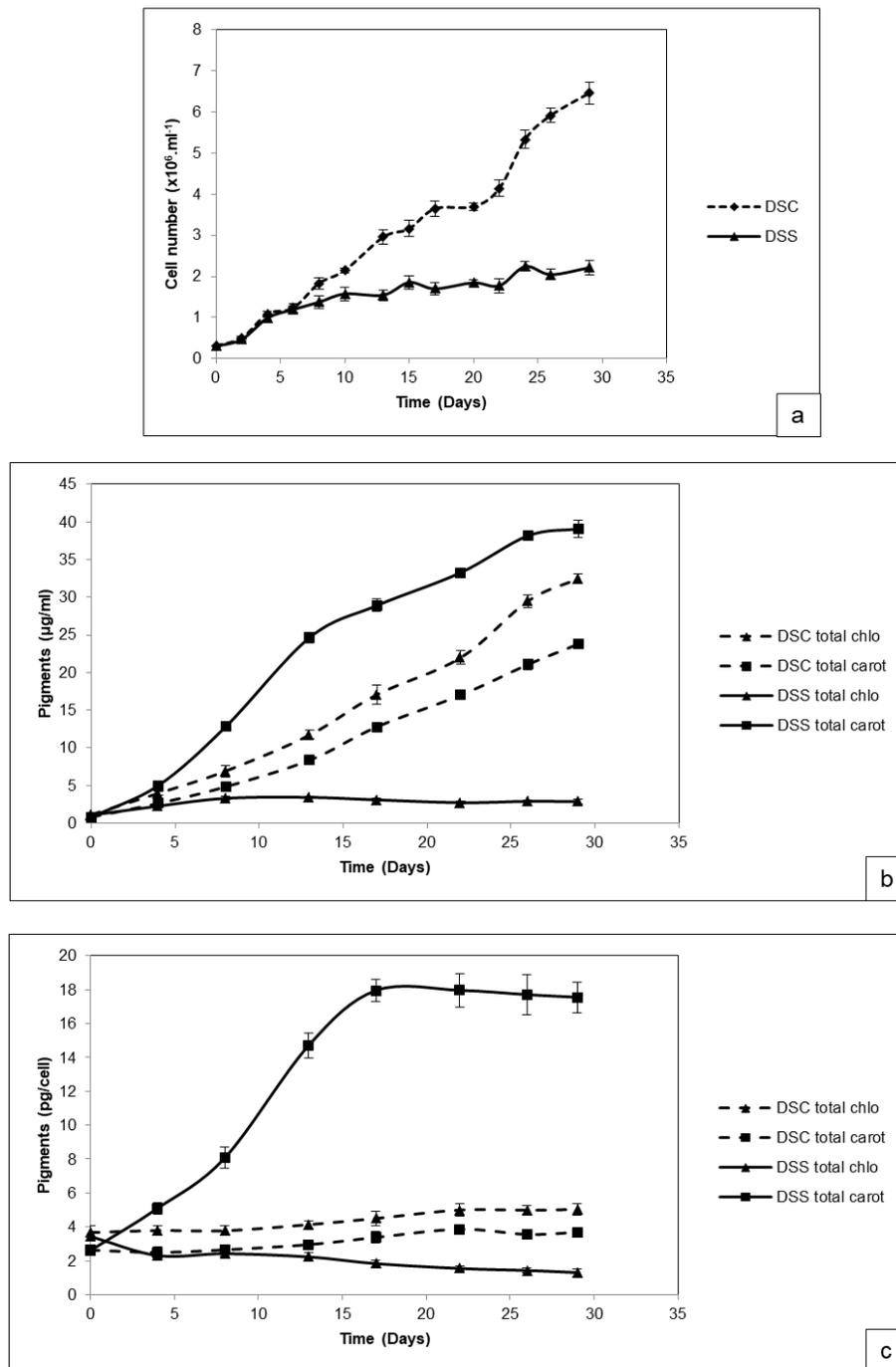


Figure 1. Follow-up of growth kinetic of *Dunaliella* sp. cultivated under unstressed (DSC) and stressed (DSS) conditions by cell counting through a hemocytometer (a). Pigment quantification among DSC and DSS expressed as µg/mL (b) and pg/cell (c) for 29 days.

3.1.3. Flow Cytometry Analysis

Cell populations were selected based on cell size FSC (Forward Scatter) and granulation SSC (Side Scatter) (Figure 2a). For DSC, there were two subpopulations with different granularity characteristics: a major sub-population (65%) with high SSC and a sub-population (35%), which was less grainy. While for DSS, a unique cell population was present resembling the major subpopulation of DSC.

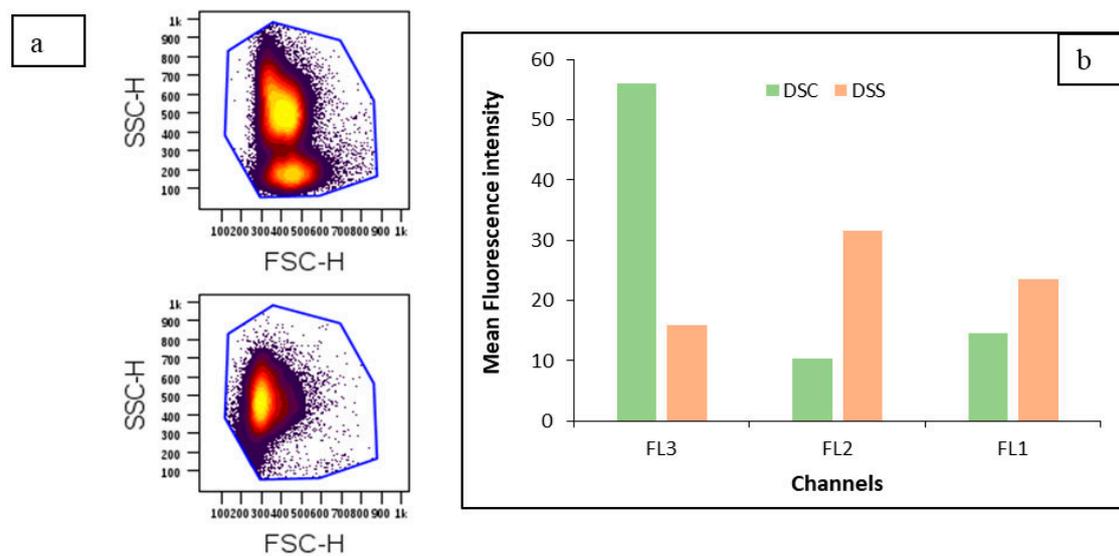


Figure 2. Flow cytometry analysis: counters plots control of population gated under unstressed condition ((a). above) and stressed condition ((a). below). Mean fluorescence intensities of *Dunaliella* sp. Cells were obtained upon excitation with FL1 (FITC, 530/30 nm), FL2 (PE, 575/26 nm), and FL3 lasers (PerCP, 682/13 nm) (b).

The mean fluorescence intensities of the stressed and unstressed cells were also determined (Figure 2b). Fluorescence was detected on the channel FL1, FL2, and FL3. The red fluorescence emission signal FL3 (682/13 nm) was more adequate to detect the fluorescence of chlorophyll *a* as its fluorescence emission spectrum is characterized by a major peak at 683/20 nm, attributable to the activity of PSII [51]. Stressed cells had a reduced fluorescence emission in FL3 corresponding to a regression of intracellular content of chlorophyll measured by biochemical methods. In contrast, an important increase of fluorescence emission was detected through FL1 and FL2 channels, which was likely due to the overproduction of carotenoids in stressed cells compared to unstressed ones [52,53].

3.2. Transcriptional Analysis

3.2.1. Evaluation of Reference Gene Stability

The comprehensive ranking generated by RefFinder for the total experimental conditions revealed that alpha-tubulin (*α-Tub*) was the most stable gene followed by the actin gene (*Act*), while 18S RNA was the least stable gene (Supplementary Figure S1a). The analysis via GeNorm showed an expression stability value (M) less than 1.5 for all tested genes, which indicated that they were all accepted as reference gene candidates (Supplementary Figure S1b). Nonetheless, GeNorm classified *α-Tub* and *Act* as the best stable reference genes since they had lower M values compared to those of 18S RNA.

3.2.2. Gene Expression Profile under Stressed Conditions

A follow-up of the expression of some genes involved in the carotene accumulation process during the first 72 h of stress time was processed by quantitative PCR. The first gene followed was *ENO* involved in the glycolysis cycle and giving an idea about carbon origin (polysaccharide degradation, photosynthesis, etc.) and destiny (isoprenoids synthesis, carbohydrate synthesis, etc.) in the cell. Its transcript level decreased 0.48 times during the first 24 h of stress. Then, it tended to re-stabilize after 72 h by having a relative expression level close to 1 (Figure 3a) and without a significant difference in its expression with unstressed cells (Figure 3g). On the other hand, the *DXS* mRNA level doubled after 24 h of stress (Figure 3b), while after 72 h, the comparison with unstressed culture showed a significant decrease in its expression level (Figure 3g).

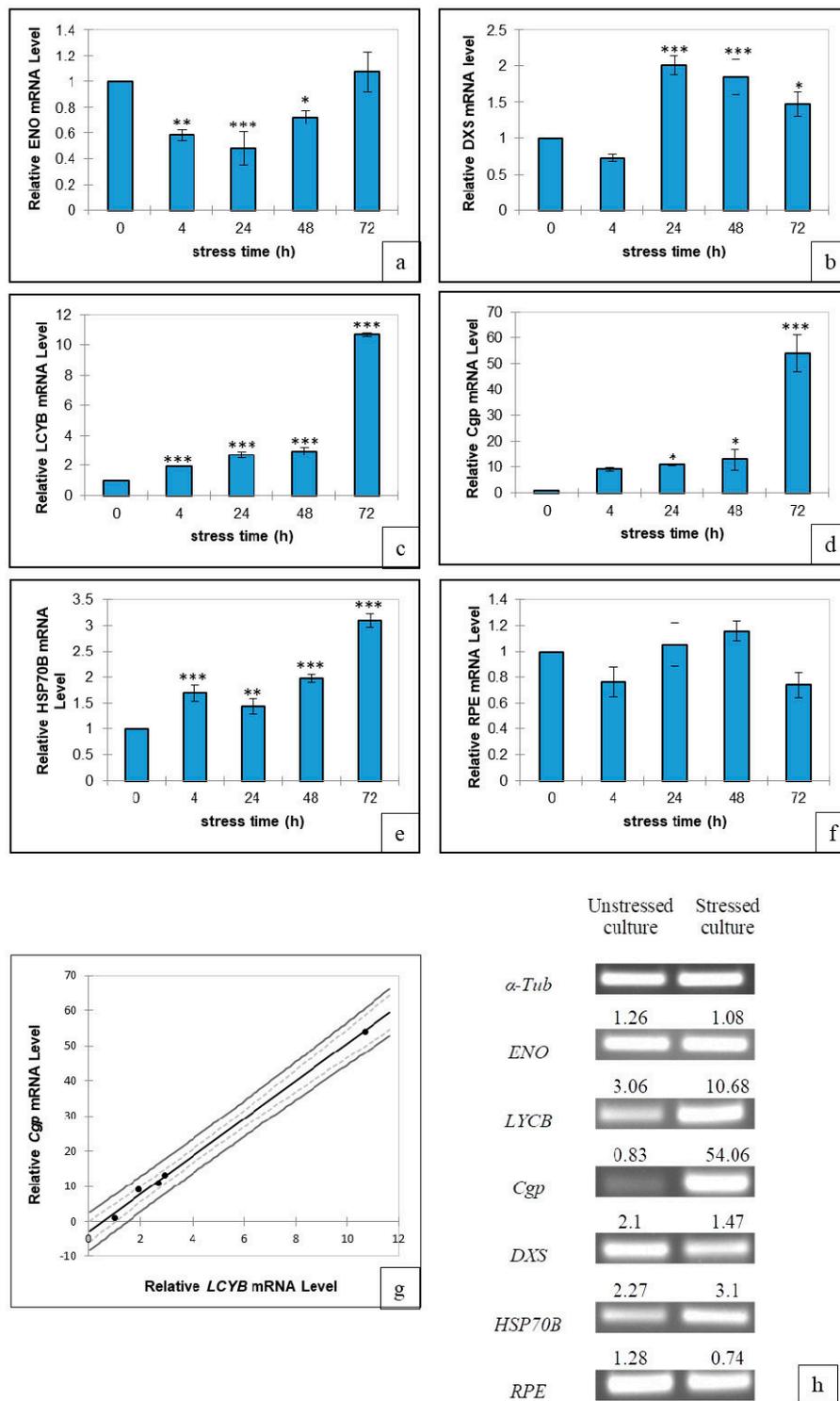


Figure 3. Gene expression levels as a function of stress time. The amounts of *ENO* (a), *DXS* (b), *LCYB* (c), *CGP* (d), *HSP70* (e), and *RPE* (f) mRNA were normalized against that of the α -*Tub* gene. Agarose gel electrophoresis of the selected gene in *Dunaliella* sp. under stressed and unstressed conditions upon 72 h of cell culture (g). Bands intensity correlates with values found by qPCR quantification. Linear regression between the relative expression of *LCYB* and *CGP*, showing a linear relationship between the expressions of these two genes (h). An asterisk indicates a significant difference between gene expressions at different stressed times, according to the one-way ANOVA test followed by Tukey test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. Data are expressed as means \pm SD (n = 3). — Model, - - - - confidence interval (Mean 95%), ——— confidence interval (obs. 95%).

The two genes *LCYB* and *CGP*, which are directly implicated in carotene accumulation, showed the most important rise. Data showed that their expression was increased since 4 h of stress time (Figure 3c,d) at an exponential pace. For the *LCYB* gene, its expression was found to be about 3-fold higher in stressed culture than the unstressed one during the first 72 h (Figure 3g). However, for *CGP*, the expression level in the stressed cell was very high; it was improved by almost 11-fold at 24 h (Figure 3d). There was a drastic increase in their expression between 24 h to 72 h of stress conditions: up to 10-fold for *LCYB* and to 54-fold for *CGP* (Figure 3c,d). We noticed also a positive correlation in their mRNA expression ($R^2 = 0.997$).

The less important increase was registered in HSP70B mRNA expression level, where the increase reached 3 and 2.27 times at 72 h in stressed and non-stressed conditions, respectively (Figure 3e,g). Chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase (RPE) transcript level showed no significant variation during the first 72 h of stress (Figure 3f,g).

3.3. In Silico Analysis

The following in silico analysis was focused on the two genes showing the most important changes in their transcriptional levels. The motif search results showed that CGP proteins presented a SOUL heme-binding protein motif (PF04832) ranged from residue 283 to residue 350, while *LCYB* possessed FAD-binding motifs (PF00890), ranging from residue 123 to residue 154.

Prediction of posttranslational modifications (PTMs) for CGP showed four putative protein kinase C phosphorylation sites distributed in the N terminal part, two probable N-myristoylation sites, and two sumoylation sites (Table 2). On the other hand, *LCYB* was found to have eight probable protein kinase C phosphorylation sites mostly distributed in its N-terminal part, one N-glycosylation site (residue 51), six N-myristoylation sites, and one high probability sumoylation site, as well as two sumoylation interaction motifs (Table 2).

Table 2. Putative SUMO (small ubiquitin-related modifier) interacting motifs in CGP (carotene globule protein) and *LCYB* (lycopene β -cyclase), showing scores of predicted sites (bold) and the lysine residue (underlined) implicated in interaction with SUMO.

Enzyme	Position	Group	Score
CGP	K308	WLLGM AK <u>PE</u> DEAKK	0.79
	K262	AVSEA F <u>KEG</u> ETEIS	0.68
LCYB	K271	HARKL V <u>KYD</u> QEFNP	0.93
	124–128	QRQPAADLLVVGSGPSGLA	0.70
	149–153	AGGFVVCVIDLDPYAPMIP	0.62

3.3.1. Enzyme Modeling

An investigation of CGB, *LCYB*, and SUMO (small ubiquitin-related modifier) protein 3D structures was undertaken to understand or find possible molecular determinants related to their up-regulation. However, only *LCYB* and SUMO protein were successfully modeled, since no structural PDB files having an acceptable identity with CGP were found in the database. Thus the following part was essentially focused on *LCYB* molecular study and its probable interaction with SUMO protein in *Dunaliella*.

3.3.2. Alignment Analysis

The amino acid sequence of *LCYB* from *D. salina* (accession number: ACA34344.1) was compared with those of known β -lycopene cyclase homologous proteins (Figure 4). *D. salina* *LCYB* showed high similarity with many β -lycopene cyclases from other microalgae, e.g., 68% identity with that from *Haematococcus lacustris* (AAO64977.1), 65% with that from *Chlamydomonas eustigma* (GAX83195.1). In contrast, less identity was observed with plant *LCYB* (50% with that from *Arabidopsis thaliana*

(AAA81880.1) and very low identity with that from cyanobacteria (33% with LYBC from *Acaryochloris marina* (WP_012166204.1). The sequence alignment also revealed that *D. salina* LCYB exhibited N-terminal and C-terminal insertions when compared to plant and cyanobacteria LCYB in addition to an internal insertion of 15 residues corresponding to the $\alpha 6$ helix in the generated 3D model. Several conserved regions in the protein sequences already identified in other lycopene cyclases from bacteria and plants were also found in *D. salina* LCYB [18]. Amongst these conserved sequences, PTFLYAM and FLEETSL, highlighted in red in Figure 4, were involved in the formation of $\beta 12$ and $\beta 13$ strands. To further understand the role of these conserved regions in the enzyme activity, we proposed further investigation of the 3D model.

3.3.3. Overall 3D Model of *D. salina* LCYB

Because no structure has been reported in the LCYB family, the crystal structure of geranylgeranyl reductase from a *Sulfolobus acidocaldarius* strain, which displays a 27% sequence identity with *D. salina* LCYB, was used as a template, as described previously by [16].

The overall structure of the enzyme could be divided into two distinct domains: a catalytic domain involving a FAD binding site, as well as a substrate-binding site and a transmembrane domain (Figure 5). The catalytic domain belongs to the Rossmann-fold family structure, consisting of a core height-stranded β -sheet flanked by four α -helices. In our case, the catalytic domain also comprised of residues Gly128-Ser129-Gly130-Pro131-Ser132-Gly133, known as a G-x-G-x-x-G motif, for nucleotide-binding [54].

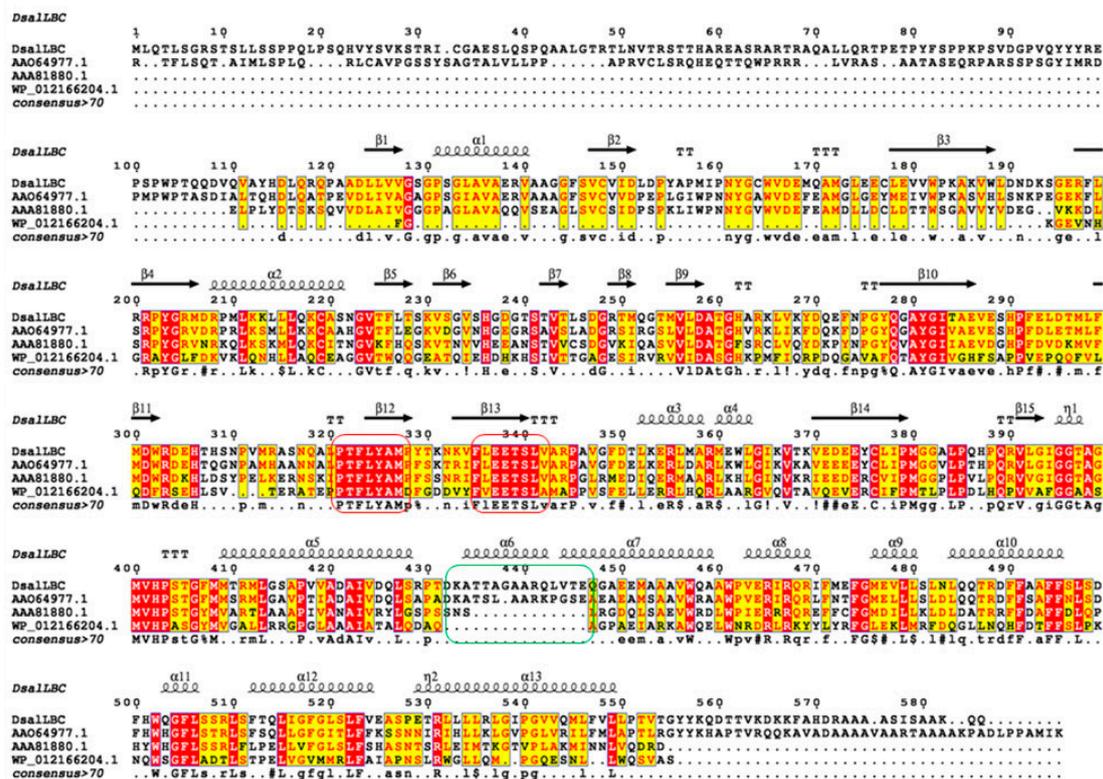


Figure 4. Multiple sequence alignment of LCYB from *D. salina* in comparison to other LCYB. The secondary structure elements of the generated 3D model indicate DsallLBC: *Dunaliella salina* LCYB (accession number: ACA34344.1), AAO64977.1: accession number of LCYB from *Haematococcus lacustris*, AAA81880.1: accession number of LCYB from *Arabidopsis thaliana*, WP_012166204.1: accession number of LCYB from *Acaryochloris marina*. Internal insertion corresponding to $\alpha 6$ helix is shown in a green frame, and the conserved sequences, PTFLYAM and FLEETSL, are highlighted in a red frame. Strict β -turns are presented as TT letters, and strict α -turns are shown as TTT.

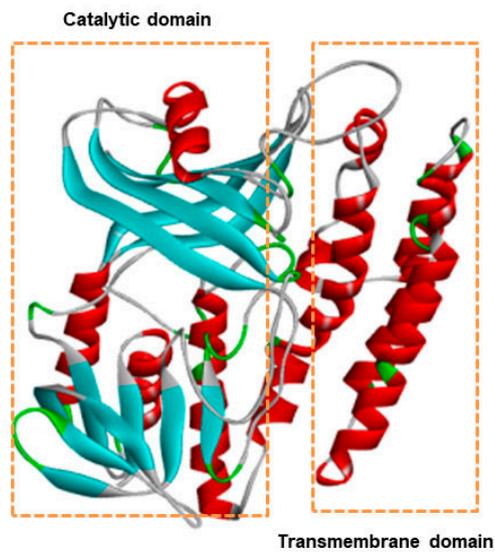


Figure 5. Ribbon representation of the LCYB 3D model, showing the catalytic domain and the transmembrane domain.

The second domain consisted of only three large helices covering the total length of the enzyme, which are suspected to constitute the transmembrane part of the enzyme, as predicted by the TMHMM server.

Calculations of the size and shape of binding sites performed using the CAST program (Figure 6) demonstrated the presence of a small cavity for FAD-binding (radius probe was set to 2), with a total volume of 139.5 \AA^2 , and a larger cavity for the substrate binding (radius probe was set to 1.4), with a total volume of 480.14 \AA^2 and an interior length of about 35 \AA , able to accommodate a large and hydrophobic substrate like lycopene.

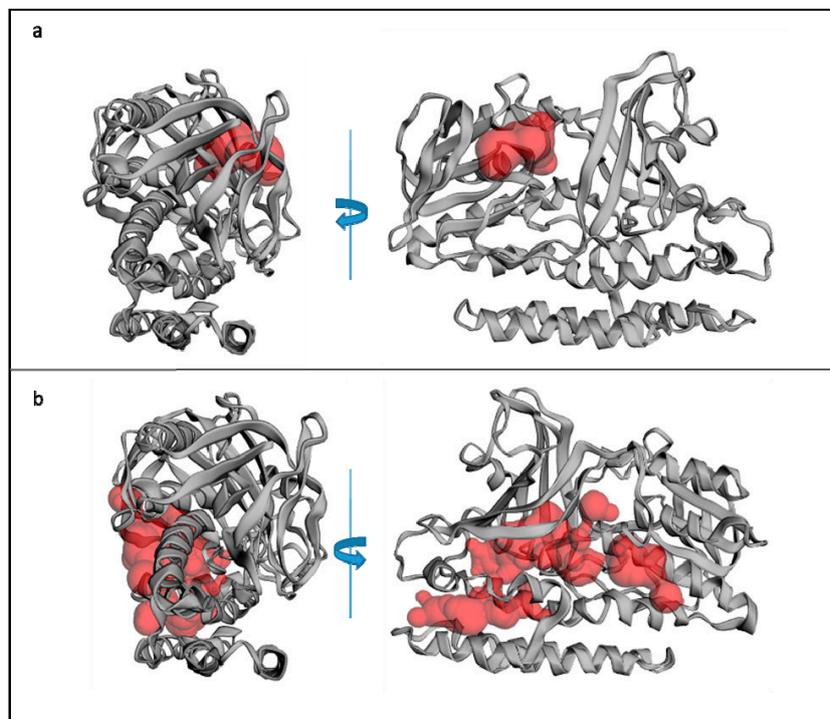


Figure 6. The volume (red) of the probable LCYB Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) binding site (a) and substrate binding site (b), calculated using the CAST program.

3.3.4. Overall 3D Model of *D. salina* SUMO Protein

The predicted structure of SUMO consisted of two α -helices (α 1, 41–53; α 2, 74–79) and one twisted β -sheet (β 1, 19–25; β 2, 32–37; β 3, 61–63; β 4, 85–89). The β -sheet consisted of four antiparallel β -strands (Figure 7a). The structure represented typical ubiquitin-like fold; in fact, the structural comparison showed that the Root Mean Square Deviation (RMSD) value between SUMO from *Dunaliella* and human SUMO-Smt3 (PDB ID: 1WM3) was 2.1 Å. The 3D model of SUMO was equally highly similar to that of *Saccharomyces cerevisiae* Smt313 (PDB ID: 3UF8) with an RMSD of 2.1 Å, reinforcing the hypothesis of the SUMO protein conservation among eukaryotes [55].

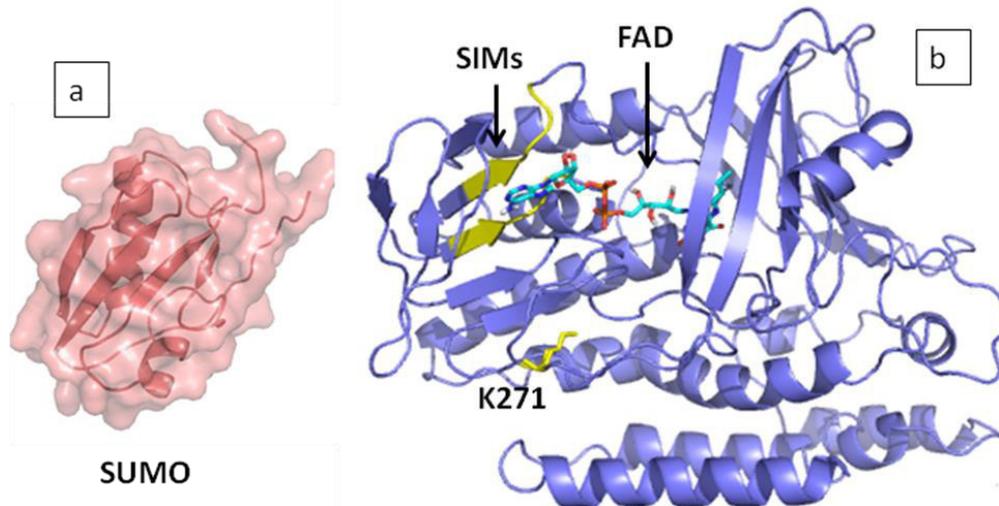


Figure 7. 3D model of SUMO (small ubiquitin-related modifier) protein from *Dunaliella* sp. (a) 3D model of LCYB, showing docked FAD molecule, SUMO interaction motifs, and SUMO lysine site in yellow color (b).

4. Discussion

Dunaliella is a green microalga, well-known by its high production of carotenoids under specific conditions. In this context, we characterized carotenoids production among an isolated strain of *Dunaliella* sp. cultured under two conditions: unstressed and stressed. The growth rate was influenced by the stress condition, causing a decrease in the DSS growth rate after a week. This was probably due to the depletion of the nitrogen source initially used in the medium. Similar results were also found by Sánchez-Estudillo et al. [56], where *D. salina* grown under nitrogen limitation maintained the same growth rate as those under nitrogen sufficiency during 8 days and then decreased to the half in about 20 days. The decrease in cell number was accompanied rather with an increase in intracellular carotenoids accumulation and a decrease of chlorophyll amount. Lv et al. in 2016 [21] studied the effect of nutrition depletion on carotenoid production that increased from approximately 2 pg/cell in complete medium to 9 pg/cell in nitrogen-depleted medium on day 15. This observation is in agreement with a previous study showing that the limitation of nitrogen availability accompanied by an increase of salinity and light intensity induced carotenoid accumulation [34]. The increase of salinity engenders also an increase in glycerol and polysaccharide synthesis accompanied by starch degradation [57–59].

For a better characterization of microalgae cells, they were subjected to flow cytometry analysis. Among DSC, we noticed the presence of two populations, which could be due to different evolution cells stage. The analysis of cells at the end of the exponential phase did not permit to display the increase in size and volume of DSS cells versus DSC. Davidi et al. [32] showed that during the first day of environmental stress, cells accumulated lipid globules, causing an increase of cell granularity. After two days, this granularity declined as the stress level would be reduced due to the increase in

β -carotene accumulation, and the cell's granularity would become almost like the unstressed one [60]. Based on autofluorescence properties of chlorophylls and carotenoids pigment, we confirmed the deviation of *Dunaliella* metabolism to carotenoids accumulation. In view of this change observed at the phenotypic level, we decided to analyze its response during the first three days of stress, at the transcriptional level of *ENO*, *DXS*, *LCYB*, *CGP*, *HSP70*, and *RPE* genes. For this purpose, the first step was the determination of the best reference gene, which appeared to be the α -*Tub*. Two other studies have also reported the stability of the α -*Tub* gene under severe conditions, one of which was conducted with *Dunaliella* sp. grown under high light stress [61]. Similarly, a second study realized with *Syntrichia caninervis* under abiotic stress; the α -*Tub* gene was also found to be stable amongst 15 reference genes, and *18S* was the less unstable one [41].

Enolase is a ubiquitous enzyme that catalyzes the penultimate reversible step of glycolysis, which is the unique dehydration of D-2-phosphoglycerate (2-PGA) to phosphoenolpyruvate (PEP) [62]. Its regulation is a key step in the orientation of the organism's metabolism to glycerol or tricarboxylic acid formation [63]. In our study, we found that the transcript level of *ENO* declined during the first 24 h of stress, which was in accordance with results found by Xia et al., reporting a decrease in mRNA expression and ENO activity during 12 h of hyperosmolarity stress [59]. The expression of *ENO* tended to increase and restabilize at 72 h of culture with a relative expression level close to 1 (Figure 3a) and similar to that of DSC (Figure 3h). The same profile was found by Ruan et al., where under hypersaline stress (3 M), the expression level of ENO protein and its activity decreased after 3 h of stress among *D. salina* and re-increased at 6 h [62]. The authors explained that the down-regulation of *ENO* inhibited the transformation of 2-PGA to pyruvate, which decreased the amount of available carbon for the tricarboxylic acid cycle and the formation of PEP. *Dunaliella* is indeed capable of surviving under hyperosmotic stress, thanks to the rapid accumulation of osmoprotectants like glycerol. In this condition, starch reserved in the chloroplast will be degraded into glucose to be converted to glycerol [2]. As a result, 2-PGA and then DHAP (dihydroxyacetone phosphate) will be accumulated in the middle of the glycolysis pathway. The DHAP is then transformed via GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) and GPP (glycerol-3-phosphate phosphatase) to glycerol. The restabilization of *ENO* gene expression after 72 h allowed a sufficient supply of carbon to PEP synthesis and, subsequently, of the pyruvate, essential for the synthesis of isoprenoids. This hypothesis was in accordance with that of Ramos et al. [2], supposing that response to salt stress goes through two stages where, in the first step, it accumulates glycerol and glycine betaine, and in a later time, it produces neutral lipid and carotenoid.

The pyruvate and G3P (glyceraldehyde-3-phosphate) will be converted to DXP (deoxyxylulose 5-phosphate) by *DXS*, catalyzing the first reaction in MEP (methylerythritol 4-phosphate) pathway [1]. Therefore, it is implicated in the synthesis of isoprenoids, such as carotenoids, chlorophylls, volatiles [64], and squalene [65]. The regulation of the MEP pathway required more clarification, resulting in the disagreement for the regulation of *DXS*. Lv et al. [21] found that the transcript level of *DXS* increased under nitrogen deprivation to provide more substrate to carotene synthesis. While Sánchez-Estudillo et al. [56] reported that the mRNA level of *DXS* decreased under nitrogen limitation on account of growth decrease, low photosynthetic activity, and chloroplast development. Our results showed a *DXS* increase at 24 h, but it trended to stabilize after 72 h with lower expression level than non-stressed cells. The discrepancy in result between publications suggested the possibility of the existence of more than one isoform of *DXS* having different expression profiles and functions like among the microalgae, *Botryococcus braunii*, and plants (tomato, Arabidopsis, rice, maize, citrus fruit) [64,66]. Besides, the expression of *DXS* is subject to translational, posttranslational, and posttranscriptional modulations [67,68]. In fact, it was demonstrated that *DXS* expression was regulated by feedback exercised by isopentenyl diphosphate (IDP) and Dimethylallyl diphosphate (DMADP) [67,69]. It is important to recall the assumption that *D. salina* lost the mevalonate (MVA) pathway and uses only the MEP pathway to provide isoprenoids precursors [2]. Also, Sánchez-Estudillo and his collaborators supposed that carotenogenesis, dependent on the regulation of enzymes, is located in the final step of the

MEP pathway [56]. This supposition was confirmed by the significant rise at 72 h of the expression level of *LCYB*, which is involved in the cyclization of linear lycopene to β -carotene. Thus, the accumulation of this isoprene is directly related to the activity of this enzyme and the molecular regulation and control of its gene [20]. Our result was in accordance with those of Ramos et al. [18]. In *D. bardawil*, *LCYB* was regulated in salt stress, thanks to two salt regulated elements (SRE), having GT1GMSCAM4 sequence in the promoter and a GT-rich region in its first intron [70]. The promoter sequence of *LCYB* also contains a light-inducible element (GATABOX, CGCGBOXAT, SORLIP1AT) and W-boxes, a binding domain for the WRKY transcriptional factor [71]. WRKY transcription factor family is of high interest since it is involved in diverse biotic/abiotic stress response and developmental/physiological processes [70]. Moreover, our data showed that the increase in *LCYB* was concomitant with a rise in a lipid-associated protein CGP. It has a crucial role in maintaining the stability of β C-plastoglobules as it is localized at the periphery of the chloroplast [31–33], preventing the coalescence of the β -carotene globule, thanks to its hydrophilic layer, which covers the hydrophobic pigment core [33]. The gene coding for *CGP* is present in four different copies in *D. salina* 'Teodoresco' [32]. High light and/or nitrogen deficiency induces the accumulation of *CGP* in *D. bardawil* in parallel with β -carotene [33]. In accordance with our results, an increase in *CGP* mRNA expression was noticed during the first hours of nitrogen deprivation of *D. bardawil* [32]. This increase was associated with an accumulation of triacylglycerol (TAG) and β -carotene [72]. *D. bardawil* mobilizes TAG from the cytoplasm into the chloroplasts to form more plastoglobules [32]. In the non-carotenogenesis condition, the absence of these lipids globules was noticed.

Heat shock protein (HSP70B) is a 70 kDa protein. It is a member of ATP-dependent molecular chaperones families, highly conserved and encoded by a single gene in green algae [73]. The increase in HSP70 expression lasting for 72 h of stress time can be explained by a cell requirement for chaperone molecule. A similar result was obtained by Yokthongwattana et al., 2001 [74], where the level of HSP70 gene expression increased immediately under irradiance stress by shifting cells from 75 to 2500 $\mu\text{mol photon. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ among *D. salina*. Authors revealed that cells lost D1 protein by photodamage; thus, it would be replaced by the accumulation of HSP70B, which could afford conformational protection to the dissembled PSII core complex. In fact, protein misfolding is a process under oxidative and environmental stress, leading to an increase in molecular chaperone and protease expression [75].

The RPE catalyzes the reversible epimerization reaction of D-ribulose-5-phosphate into D-xylulose-5-phosphate in the Calvin cycle. During these first three days of stress, the level of its mRNA was significantly less expressed in stressed condition than in unstressed one after 72 h of stress. Similarly, but at the proteomic level, the amount of this enzyme was also decreased among *Dunaliella* under stress [34] and among *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen deprivation [76]. This means that the photosynthetic efficiency is affected by nitrogen amount [76], but, at the same time, the down-regulation of this enzyme allows the accumulation of xylulose-5P, which probably would serve as a substrate for G3P production in the pentose phosphate cycle [34].

In order to identify if these transcriptional changes go along with posttranslational ones, bioinformatics tools were used to analyze protein sequences of the two genes (*CGP* and *LCYB*) having the most increased transcriptional levels. Prediction of PTMs showed numerous possible phosphorylation, palmitoylation, and myristoylation sites, as well as sumoylation sites. These results corroborated the fine regulation of the two enzymes after their fold and the major regulatory role they have in modulating the ratio of carotenoid biosynthesis. Unlike plants, data concerning posttranslational regulation modalities of *CGP* and *LCYB* were not well studied for microalgae. In addition, the presence of SUMO protein in *Dunaliella* was not reported previously.

Posttranslational modification by SUMO is a major regulating mechanism for eukaryotic protein functions. SUMO becomes commonly covalently attached to specific targets (lysine residue) through a succession of molecular "handoffs" relating multienzyme cascades consisting of an E1 activating enzyme, an E2 conjugating enzyme, and an E3 ligase. Attachment of SUMO is known to control target functions, such as protein-protein interactions, protein-DNA interactions, and subcellular localization.

Sumo regulates equally many important processes, such as signaling, transcription, DNA repair, and other stress responses. In plants, it was demonstrated that sumoylation plays an important role in reacting to stress and pathogens [77]. For microalga, three SUMO homologs and SUMO-related proteins were identified in *C reinhardtii* and were established to be essential for the survival of the strain under stress conditions [78]. Concerning the regulation of LCYB by sumoylation, recent research reported the detection of a recognition sequence for sumoylation in LCYB from *Bixa orellana* that could modulate enzyme activity or localization [79]. To the best of our knowledge, this is the first report for a possible regulation by the sumoylation of LCYB in *Dunaliella* sp., and to further investigate the attachment modalities between the two proteins, we tried to carry out a 3D modeling analysis. For this purpose, a crystal structure of geranylgeranyl reductase from a *Sulfolobus acidocaldarius* strain was used since it displays an acceptable sequence identity/coverage, and it was used in the previous reports of LCYB models. The overall structure was divided into two distinct domains: a catalytic domain involving a FAD-binding site, as well as a substrate-binding site and a transmembrane domain. In fact, several studies have shown that lycopene cyclases use FAD as a cofactor [80] and that many of the enzymes involved in lycopene and carotene transformations are membrane-bound [81]. We found that the binding site was not far from the membrane helices and that the FAD-binding domain existed in the diagonally opposite side of the enzyme (Figure 6a). The inspection of the putative SUMO interacting residue (K271), as well as sumoylation interaction motifs, showed that they were both located on the same side and were very close to each other and the FAD-binding site (Figure 7b). This observation could be interesting in understanding the regulation mechanism exerted by SUMO on LCYB, and the overall work is expected to help the future investigation of transcriptional/translational regulation studies in *Dunaliella* sp.

5. Conclusions

In this study, *Dunaliella* sp. was submitted to stress conditions by varying simultaneously the salinity, the light intensity, and the nitrogen availability. Mentioned conditions result in the deviation of the metabolism for the carotenoid accumulation. The latter could substitute chlorophyll with the advantage of preserving cell viability until roughly the end of the exponential phase. Flow cytometry analyses revealed that stressed and unstressed cells exhibited differences in their intrinsic and extrinsic characteristics. At the transcriptional level, the expression of genes, closely related to the synthesis and the accumulation of β -carotene, increased significantly. On the other hand, the inspection of the three-dimensional model of lycopene- β -cyclase, a key enzyme in the carotenoid synthesis pathway, highlighted possible further regulation by posttranslational modification, especially sumoylation.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3417/9/24/5389/s1>, Figure S1: Geomean of ranking values of the candidate reference genes based on the RefFinder algorithm (a); Average expression stability M values of remaining control genes based on GeNorm algorithm (b). The mean Cq of three independent replicate experiments was used to generate Data.

Author Contributions: Conceptualization, S.A., C.P., and I.F.; methodology, I.F.; software, H.B.H.; validation, H.B.H., M.B., and P.B.; formal analysis, H.B.H.; investigation, F.E.; resources, C.P.; data curation, H.B.H.; writing—Original draft preparation, F.E.; writing—Review and editing, F.E.; visualization, P.B.; supervision, S.A., C.P., and I.F.; project administration, C.P. and I.F.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments: We are very grateful to David Gosset from the “Plateforme de Cytométrie en flux et imagerie cellulaire—P@CYFIC du Centre de Biophysique Moléculaire” (CNRS, Orléans, France) for his excellent technical assistance for Flow cytometry experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ye, Z.-W.; Jiang, J.-G.; Wu, G.-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 352–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ramos, A.A.; Polle, J.; Tran, D.; Cushman, J.C.; Jin, E.; Varela, J.C. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: Genetic advances and future perspectives. *Algae* **2011**, *26*, 3–20. [[CrossRef](#)]
3. Chen, H.; Jiang, J.-G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *219*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gong, M.; Bassi, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1396–1412. [[CrossRef](#)]
5. Merhan, O. The biochemistry and antioxidant properties of carotenoids. *Carotenoids* **2017**, *5*, 51.
6. García-González, M.; Moreno, J.; Manzano, J.C.; Florencio, F.J.; Guerrero, M.G. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* **2005**, *115*, 81–90. [[CrossRef](#)]
7. Domonkos, I.; Kis, M.; Gombos, Z.; Ughy, B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 539–561. [[CrossRef](#)]
8. Ben-Amotz, A.; Shaish, A.; Avron, M. Mode of action of the massively accumulated beta-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.* **1989**, *91*, 1040–1043. [[CrossRef](#)]
9. Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Rengasamy, R. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 517–523. [[CrossRef](#)]
10. Nishino, H.; Tokuda, H.; Murakoshi, M.; Satomi, Y.; Masuda, M.; Onozuka, M.; Yamaguchi, S.; Takayasu, J.; Tsuruta, J.; Okuda, M.; et al. Cancer prevention by natural carotenoids. *BioFactors Oxf. Engl.* **2000**, *13*, 89–94. [[CrossRef](#)]
11. Pasquet, V. Recherche Bioguidée de Molécules Anticancéreuses Issues de Microalgues Marines. Ph.D. Thesis, Université de La Rochelle, La Rochelle, France, 2011.
12. Jayappriyan, K.R.; Rajkumar, R.; Venkatakrisnan, V.; Nagaraj, S.; Rengasamy, R. In Vitro Anticancer Activity of Natural β -Carotene from *Dunaliella Salina* EU5891199 in PC-3 Cells. *Biomed. Prev. Nutr.* **2013**, *3*, 99–105.
13. Yang, D.-J.; Lin, J.-T.; Chen, Y.-C.; Liu, S.-C.; Lu, F.-J.; Chang, T.-J.; Wang, M.; Lin, H.-W.; Chang, Y.-Y. Suppressive effect of carotenoid extract of *Dunaliella salina* alga on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells via NF- κ B and JNK inactivation. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 607–615. [[CrossRef](#)]
14. Jaswir, I. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 7119–7131.
15. Ben-Amotz, A.; Katz, A.; Avron, M. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **1982**, *18*, 529–537. [[CrossRef](#)]
16. Chen, X.; Han, H.; Jiang, P.; Nie, L.; Bao, H.; Fan, P.; Lv, S.; Feng, J.; Li, Y. Transformation of β -lycopene cyclase genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* conferred salt tolerance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 909–921. [[CrossRef](#)]
17. Cui, H.; Wang, Y.; Qin, S. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids in eukaryotic algae. *Plant Mol. Biol. Report.* **2011**, *29*, 1013–1020. [[CrossRef](#)]
18. Ramos, A.; Coesel, S.; Marques, A.; Rodrigues, M.; Baumgartner, A.; Noronha, J.; Rauter, A.; Brenig, B.; Varela, J. Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* Lcy-beta gene encoding a functional lycopene beta-cyclase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 819–828. [[CrossRef](#)]
19. Fazeli, M.R.; Tofighi, H.; Madadkar-Sobhani, A.; Shahverdi, A.R.; Nejad-Sattari, T.; Mirzaie, S.; Jamalifar, H. Nicotine inhibition of lycopene cyclase enhances accumulation of carotenoid intermediates by *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Eur. J. Phycol.* **2009**, *44*, 215–220. [[CrossRef](#)]
20. Zhu, Y.-H.; Jiang, J.-G.; Chen, Q. Characterization of cDNA of lycopene beta-cyclase responsible for a high level of beta-carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **2008**, *86*, 285–292. [[CrossRef](#)]

21. Lv, H.; Cui, X.; Wahid, F.; Xia, F.; Zhong, C.; Jia, S. Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152226. [[CrossRef](#)]
22. Mendoza, H.; Río, M.J.D.; Reina, G.G.; Ramazanov, Z. Low-temperature-induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*). *Eur. J. Phycol.* **1996**, *31*, 329–331. [[CrossRef](#)]
23. Lamers, P.P.; Janssen, M.; De Vos, R.C.H.; Bino, R.J.; Wijffels, R.H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yilancioglu, K.; Cokol, M.; Pastirmaci, I.; Erman, B.; Cetiner, S. Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shaker, S. Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth, β -carotene production and lipid profile of *Dunaliella salina*. *J. Young Pharm.* **2017**, *9*, 43–46. [[CrossRef](#)]
26. Wongsansilp, T.; Juntawong, N.; Wu, Z. Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation. *J. Biol. Res. Boll. Della Soc. Ital. Biol. Sper.* **2016**, *89*, 5866. [[CrossRef](#)]
27. Gomez, P.I.; Barriga, A.; Cifuentes, A.S.; Gonzalez, M.A. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) *Chlorophyta*. *Biol. Res.* **2003**, *36*, 185–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rad, F.A.; Aksoz, N.; Hejazi, M.A. Effect of salinity on cell growth and β -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 2282–2289.
29. Farhat, N.; Rabhi, M.; Falleh, H.; Jouini, J.; Abdelly, C.; Smaoui, A. Optimization of Salt Concentrations for a Higher Carotenoid Production in *Dunaliella salina* (chlorophyceae). *J. Phycol.* **2011**, *47*, 1072–1077. [[CrossRef](#)]
30. Lamers, P.P.; Janssen, M.; De Vos, R.C.H.; Bino, R.J.; Wijffels, R.H. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 631–638. [[CrossRef](#)]
31. Davidi, L.; Levin, Y.; Ben-Dor, S.; Pick, U. Proteome Analysis of Cytoplasmatic and Plastidic β -Carotene Lipid Droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 60–79. [[CrossRef](#)]
32. Davidi, L.; Shimoni, E.; Khozin-Goldberg, I.; Zamir, A.; Pick, U. Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 2139–2156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Katz, A.; Jimenez, C.; Pick, U. Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 1657–1664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ben Amor, F.; Elleuch, F.; Ben Hlima, H.; Garnier, M.; Saint-Jean, B.; Barkallah, M.; Pichon, C.; Abdelkafi, S.; Fendri, I. Proteomic analysis of the *Chlorophyta* *Dunaliella* new strain AL-1 revealed global changes of metabolism during high carotenoid production. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chtourou, H.; Dahmen, I.; Jebali, A.; Karray, F.; Hassairi, I.; Abdelkafi, S.; Ayadi, H.; Sayadi, S.; Dhouib, A. Characterization of *Amphora* sp., a newly isolated diatom wild strain, potentially usable for biodiesel production. *Bioprocess Biosys. Eng.* **2015**, *38*, 1381–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wellburn, A.R.; Lichtenthaler, H. Formulae and Program to Determine Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents. In *Advances in Photosynthesis Research; Advances in Agricultural Biotechnology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1984; pp. 9–12. ISBN 978-90-247-2943-2.
37. Mendoza, H.; De la Jara, A.; Freijanes, K.; Carmona, L.; Ramos, A.A.; de Sousa Duarte, V.; Varela, S.; Carlos, J. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: A new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electron. J. Biotechnol.* **2008**, *11*, 5–6. [[CrossRef](#)]
38. Dammak, M.; Haase, S.M.; Miladi, R.; Ben Amor, F.; Barkallah, M.; Gosset, D.; Pichon, C.; Huchzermeyer, B.; Fendri, I.; Denis, M.; et al. Enhanced lipid and biomass production by a newly isolated and identified marine microalga. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 209. [[CrossRef](#)]
39. Chen, H.; Lao, Y.-M.; Jiang, J.-G. Effects of salinities on the gene expression of a (NAD⁺)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 1291–1297. [[CrossRef](#)]
40. Chen, X.-J.; Zhang, X.-H.; Hu, L.-D.; Zhang, J.-Q.; Jiang, Y.; Yang, Y.; Yan, Y.-B. DsCaf1 is involved in environmental stress response of *Dunaliella salina*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *82*, 369–374. [[CrossRef](#)]
41. Li, X.; Zhang, D.; Li, H.; Gao, B.; Yang, H.; Zhang, Y.; Wood, A.J. Characterization of reference genes for RT-qPCR in the desert moss *Syntrichia caninervis* in response to abiotic stress and desiccation/rehydration. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 38. [[CrossRef](#)]

42. Xie, F.; Xiao, P.; Chen, D.; Xu, L.; Zhang, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *80*, 75–84. [[CrossRef](#)]
43. Vandesompele, J.; Preter, K.D.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Roy, N.V.; Paepe, A.D.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ben Amor, F.; Ben Hlima, H.; Abdelkafi, S.; Fendri, I. Insight into *Arthrospira platensis* $\Delta 9$ desaturase: A key enzyme in poly-unsaturated fatty acid synthesis. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 1873–1879. [[CrossRef](#)]
47. Xia, J.-X.; Ikeda, M.; Shimizu, T. ConPred_elite: A highly reliable approach to transmembrane topology predication. *Comput. Biol. Chem.* **2004**, *28*, 51–60. [[CrossRef](#)]
48. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Thornton, J.M. PROCHECK: Validation of Protein-Structure Coordinates. Available online: <http://xrpp.iucr.org/Fb/ch21o4v0001/> (accessed on 13 February 2018).
49. Tian, W.; Chen, C.; Lei, X.; Zhao, J.; Liang, J. CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W363–W367. [[CrossRef](#)]
50. Shin, W.-H.; Kim, J.-K.; Kim, D.-S.; Seok, C. GalaxyDock2: Protein-ligand docking using beta-complex and global optimization. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 2647–2656. [[CrossRef](#)]
51. Pedrós, R.; Moya, I.; Goulas, Y.; Jacquemoud, S. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 498–502. [[CrossRef](#)]
52. Nonomura, A.M.; Coder, D.M. Improved Phycocatalysis of Carotene Production by Flow Cytometry and Cell Sorting. *Biocatalysis* **1988**, *1*, 333–338. [[CrossRef](#)]
53. Ukibe, K.; Katsuragi, T.; Tani, Y.; Takagi, H. Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *286*, 241–248. [[CrossRef](#)]
54. Ahn, J.-W.; Kim, K.-J. Crystal structure of 1'-OH-carotenoid 3,4-desaturase from *Nonlabens dokdonensis* DSW-6. *Enzym. Microb. Technol.* **2015**, *77*, 29–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shang, Q.; Xu, C.; Zhang, J.; Zhang, X.; Tu, X. Solution structure of SUMO from *Trypanosoma brucei* and its interaction with Ubc9. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2009**, *76*, 266–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sánchez-Estudillo, L.; Freile-Pelegri, Y.; Rivera-Madrid, R.; Robledo, D.; Narváez-Zapata, J.A. Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 787–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Mishra, A.; Jha, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3382–3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhao, L.; Gong, W.; Chen, X.; Chen, D. Characterization of genes and enzymes in *Dunaliella salina* involved in glycerol metabolism in response to salt changes. *Phycol. Res.* **2013**, *61*, 37–45. [[CrossRef](#)]
59. Xia, B.-B.; Wang, S.-H.; Duan, J.-B.; Bai, L.-H. The relationship of glycerol and glycolysis metabolism pathway under hyperosmotic stress in *Dunaliella salina*. *Cent. Eur. J. Biol.* **2014**, *9*, 901–908. [[CrossRef](#)]
60. Facht, M.; Hermsdorf, D.; Rihko-Struckmann, L.; Sundmacher, K. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Algal Res.* **2016**, *13*, 227–234. [[CrossRef](#)]
61. Park, S.; Polle, J.E.W.; Melis, A.; Lee, T.K.; Jin, E. Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8*, 120–128. [[CrossRef](#)]
62. Ruan, K.; Duan, J.; Bai, F.; Lemaire, M.; Ma, X.; Bai, L. Function of *Dunaliella salina* (*Dunaliellaceae*) enolase and its expression during stress. *Eur. J. Phycol.* **2009**, *44*, 207–214. [[CrossRef](#)]
63. Polle, J.E.W.; Neofotis, P.; Huang, A.; Chang, W.; Sury, K.; Wiech, E.M. Carbon Partitioning in Green Algae (*Chlorophyta*) and the Enolase Enzyme. *Metabolites* **2014**, *4*, 612–628. [[CrossRef](#)]
64. Peng, G.; Wang, C.; Song, S.; Fu, X.; Azam, M.; Grierson, D.; Xu, C. The role of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and phytoene synthase gene family in citrus carotenoid accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *71*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Kajikawa, M.; Kinohira, S.; Ando, A.; Shimoyama, M.; Kato, M.; Fukuzawa, H. Accumulation of squalene in a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by genetic modification of squalene synthase and squalene epoxidase genes. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Matsushima, D.; Jenke-Kodama, H.; Sato, Y.; Fukunaga, Y.; Sumimoto, K.; Kuzuyama, T.; Matsunaga, S.; Okada, S. The single cellular green microalga *Botryococcus braunii*, race B possesses three distinct 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases. *Plant Sci.* **2012**, *185–186*, 309–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ghirardo, A.; Wright, L.P.; Bi, Z.; Rosenkranz, M.; Pulido, P.; Rodríguez-Concepción, M.; Niinemets, Ü.; Brüggemann, N.; Gershenzon, J.; Schnitzler, J.-P. Metabolic flux analysis of plastidic isoprenoid biosynthesis in poplar leaves emitting and nonemitting isoprene. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 37–51. [[CrossRef](#)]
68. Guevara-García, A.; San Román, C.; Arroyo, A.; Cortés, M.E.; de la Luz Gutiérrez-Nava, M.; León, P. Characterization of the *Arabidopsis* clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell* **2005**, *17*, 628–643. [[CrossRef](#)]
69. Banerjee, A.; Wu, Y.; Banerjee, R.; Li, Y.; Yan, H.; Sharkey, T.D. Feedback Inhibition of Deoxy-d-xylulose-5-phosphate Synthase Regulates the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16926–16936. [[CrossRef](#)]
70. Liang, M.-H.; Lu, Y.; Chen, H.-H.; Jiang, J.-G. The salt-regulated element in the promoter of lycopene β -cyclase gene confers a salt regulatory pattern in carotenogenesis of *Dunaliella bardawil*. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 982–989. [[CrossRef](#)]
71. Liang, M.-H.; Jiang, J.-G. Analysis of carotenogenic genes promoters and WRKY transcription factors in response to salt stress in *Dunaliella bardawil*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 37025. [[CrossRef](#)]
72. Rabbani, S.; Beyer, P.; Lintig, J.V.; Hugueney, P.; Kleinig, H. Induced β -Carotene Synthesis Driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicellular Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 1239–1248. [[CrossRef](#)]
73. Chiu, C.-C.; Chen, L.-J.; Su, P.-H.; Li, H. Evolution of chloroplast J proteins. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70384. [[CrossRef](#)]
74. Yokthongwattana, K.; Chrost, B.; Behrman, S.; Casper-Lindley, C.; Melis, A. Photosystem II Damage and Repair Cycle in the Green Alga *Dunaliella salina*: Involvement of a Chloroplast-Localized HSP70. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 1389–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Trösch, R.; Mühlhaus, T.; Schroda, M.; Willmund, F. ATP-dependent molecular chaperones in plastids—More complex than expected. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **2015**, *1847*, 872–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Dong, H.-P.; Williams, E.; Wang, D.; Xie, Z.-X.; Hsia, R.; Jenck, A.; Halden, R.; Li, J.; Chen, F.; Place, A.R. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to Long-Term Nitrogen Starvation and Recovery1. *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 1110–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Enserink, J.M. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div.* **2015**, *10*, 4. [[CrossRef](#)]
78. Knobbe, A.R.; Horken, K.M.; Plucinak, T.M.; Balassa, E.; Cerutti, H.; Weeks, D.P. SUMOylation by a stress-specific small ubiquitin-like modifier E2 conjugase is essential for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 753–765. [[CrossRef](#)]
79. Trujillo-Hdz, J.A.; Cárdenas-Conejo, Y.; Turriza, P.E.; Aguilar-Espinosa, M.; Carballo-Uicab, V.; Garza-Caligaris, L.E.; Comai, L.; Rivera-Madrid, R. Functional polymorphism in lycopene beta-cyclase gene as a molecular marker to predict bixin production in *Bixa orellana* L. (achiote). *Mol. Breed.* **2016**, *36*, 135. [[CrossRef](#)]
80. Yu, Q.; Schaub, P.; Ghisla, S.; Al-Babili, S.; Krieger-Liszkay, A.; Beyer, P. The lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (formerly *Erwinia uredovora*) catalyzes an FADred-dependent non-redox reaction. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12109–12120. [[CrossRef](#)]
81. Moise, A.R.; Al-Babili, S.; Wurtzel, E.T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 164–193. [[CrossRef](#)]



Annexe 3

Article

Proteomic Analysis of the Chlorophyta *Dunaliella* New Strain AL-1 Revealed Global Changes of Metabolism during High Carotenoid Production

Faten Ben Amor^{1,2}, Fatma Elleuch^{2,3}, Hajer Ben Hlima¹, Matthieu Garnier⁴, Bruno Saint-Jean⁴, Mohamed Barkallah¹, Chantal Pichon³, Slim Abdelkafi¹ and Imen Fendri^{2,*}

¹ Unité de Biotechnologie des Algues, Biological Engineering Department, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax 3038, Tunisia; faten_benamor@yahoo.fr (F.B.A.); hajer_benhlma@yahoo.fr (H.B.H.); mohamedbarkallah@gmail.com (M.B.); slim.abdelkafi@enis.tn (S.A.)

² Laboratoire de Biotechnologie Végétale Appliquée à l'Amélioration des Cultures, Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Sfax 3000, Tunisia; fatma.elleuch@ymail.com

³ Center for Molecular Biophysics (CBM), CNRS UPR 4301, Orléans 45071, France; pichon@cnrs-orleans.fr

⁴ Laboratoire BRM-PBA Ifremer, Nantes 44311, France; Matthieu.Garnier@ifremer.fr (M.G.); Bruno.Saintjean@ifremer.fr (B.S.-J.)

* Correspondence: imen.fendri@yahoo.fr; Tel.: +216-95-682-765

Received: 20 July 2017; Accepted: 31 August 2017; Published: 20 September 2017

Abstract: The green microalgae *Dunaliella* genus is known for the production of high added value molecules. In this study, strain AL-1 was isolated from the Sebkhah of Sidi El Hani (Sousse, Tunisia). This isolate was identified both morphologically and genetically via 18S rRNA gene sequence as a member of the genus *Dunaliella*. Strain AL-1 was found to be closely related to *Dunaliella salina*, *Dunaliella quartocincta* and *Dunaliella polymorpha* with more than 97% similarity. Response surface methodology was used to maximize carotenoid production by strain AL-1 by optimizing its growth conditions. The highest carotenoid content was obtained at salinity: 51, light intensity: 189.89 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and nitrogen: 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Proteomic profiling, using two-dimensional gel electrophoresis, was performed from standard and optimized cultures. We detected 127 protein spots which were significantly differentially expressed between standard and optimized cultures. Among them 16 protein spots were identified with mass spectrometry and grouped into different functional categories using KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) such as photosynthetic Calvin cycle, regulation/defense, energy metabolism, glycolysis, and cellular processes. The current study could be of great interest in providing information on the effect of stressful conditions in microalgae carotenoid production.

Keywords: proteome; *Dunaliella*; 18S rRNA gene; carotenoids; bidimensional gel electrophoresis; mass spectrometry

1. Introduction

Due to a number of benefits, microalgae have recently gained much interest. In fact, they are easy to cultivate and they present high biomass productivity. In addition, their cultivation does not need arable land, they do not vie with food production, and they can produce a great variety of secondary metabolites by adaptation to environmentally changing conditions [1,2]. These molecules have a high potential to be used in biotechnological applications [1].

In the few last years there has been a growing demand for antioxidant, colorant, and bioactive compounds obtained from natural sources [3]. As a matter of fact, carotenoids synthesized by microalgae have been attracting attention. These pigments provide protection to the photosynthetic apparatus in plants by dissipating excess energy [2]. They also take part in oxygenic photosynthesis, as

accessory pigments for harvesting light or as structural molecules that stabilize protein folding in the photosynthetic apparatus [4]. Moreover these lipophilic compounds function as scavengers of reactive oxygen species which mainly arise from sunlight absorption by chromophores and consequently protect chlorophylls, proteins, lipids, and DNA from oxidative damages. Carotenoids produced by green algae, are attractive materials in food, pharmaceutical, and cosmeceutical industries due to their strong properties. They have been associated in recent years with lowering the risks of cancer [5].

The aptitude to produce these large amounts of specific organic compounds by some *Dunaliella* members has made them superlative organisms for cell factory applications [6]. Amongst others, *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*), a unicellular biflagellate green alga, has been highly researched and utilized as a source of various industrial compounds such as carotenoids, glycerol, and unsaturated fatty acids [7].

The unicellular green algae *D. salina* can be considered as a powerful biological system able to tolerate and acclimate to a wide range of salt concentrations by production and accretion of the compatible solute glycerol at concentrations that are relative to the external NaCl [8,9]. Additionally to their halotolerance; some *Dunaliella* species display remarkable properties of tolerance to high light [10,11]; low temperature, and limited nutrients [12], achieved by the buildup of massive amounts of carotenoids, glycerol, unsaturated fatty acids, and many other compounds.

The halotolerant algae *D. salina* acclimate to various kinds of environmental stress by regulating the expression of numerous stress inducible genes [13]. This is achieved by some changes in metabolism involving the up-regulation or down-regulation of many metabolic pathways.

Rapidly developing genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics have become crucial in understanding the microorganism's response mechanism to the changes occurring in their physical environment [14]. Proteomic study and two-dimensional electrophoresis (2-DE), have been the main techniques of separation and comparison of complex protein mixtures in *D. salina* [15]. When consolidated with mass spectrometry [16], these combined methods could precisely determine molecular mass and analyze the molecular structure [17,18].

In this paper, a response surface methodology (RSM) was applied to determine the influence of culture conditions (light intensity, salinity, and nitrogen deficiency) on carotenoid production. We analyzed the protein expression during carotenoid accumulation in the isolated strain AL-1 with 2-DE. A differential protein expression map, mass spectrometry, and bioinformatics analysis were used to analyze and identify the differentially expressed proteins with the aim of extending our knowledge on physiological changes in cells under stressful conditions.

2. Results and Discussion

2.1. Identification of the Newly Isolated *Dunaliella* Strain

To valorize strains belonging to the Tunisian biotope, which have bioactive compounds that can be used in biotechnological applications, a new halotolerant microalga was isolated from Sebkhah of Sidi El Hani (Sousse, Tunisia). The cell shape of our isolate varies from cylindrical, ovoid, and fusiform to about spherical. This strain is unicellular and biflagellate. The cellular size is measured as approximately 8–18 μm diameter. These characteristics are consistent with previous morphological characteristics of *Dunaliella* genus [19]. The 18S rRNA gene sequence of strain AL-1 (comprising about 1800 bp) was amplified using the universal primers EukA and EukB as described by Chtourou et al. [20,21] to analyze the strain phylogenetic position. Phylogenetic analysis showed that strain AL-1 is a member of *Dunaliellaceae* family and *Dunaliella* genus. The isolated strain was found to be closely affiliated to *D. salina*, *D. quartolecta*, and *D. polymorpha* with more than 97% similarity.

Microalgae cells change shape (fusiform to spherical) and color (green to orange) with changing cultural conditions (under optimized conditions).

2.2. Experimental Design and Validation of Optimized Growth Conditions

Previous findings have shown that within stressful conditions such as high light intensity [10], salt concentration [9] or nitrogen deficiency [12], *Dunaliella* strains could accumulate a high amount of carotenoids.

In order to ameliorate the carotenoid production of our isolated strain, an optimization of the culture conditions was performed considering preliminary analyses of nitrogen concentration (NaNO_3), salinity (NaCl), and light intensity (Table 1).

Table 1. Variables and experimental levels for optimizing culture conditions.

Factor	Coded Symbole	Level		
		−1	0	+1
Salinity	X_1	58.44	87.66	116.88
Light intensity ($\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	X_2	70	155	240
Nitrogen ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_3	0.02	0.06	0.1

A response surface methodology (RSM) was then used to examine the effect of interactions between these factors on carotenoid production. Nemrod-W 2D and 3D plots (Figure 1; Table 2) show that the established model indicates that only b_2 is slightly significant while the quadratic effects b_{22} and b_{33} have a very significant effect on the production of microalga carotenoids.

Table 2. Statistical analysis of the coefficients for carotenoid response.

Coefficient	Value	Student's <i>t</i> Test	Significance (%)
b_0	6.421	10.77	0.0120 ^a
b_1	−0.513	−1.41	21.9
b_2	1.395	3.82	1.24 ^c
b_3	−0.125	−0.34	74.6
b_{11}	−0.327	−0.61	56.9
b_{22}	−2.781	−5.17	0.355 ^b
b_{33}	−2.305	−4.29	0.781 ^b
b_{12}	−0.646	−1.25	26.6
b_{13}	0.188	0.36	73.1
b_{23}	0.135	0.26	80.5

^a Significant at 99.9%, ^b Significant at 99%, ^c Significant at 95%.

In fact, the carotenoid production from cultures performed at optimized conditions was three times higher than that from cultures in F/2 medium under standard conditions. It increased effectively from $1.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, mass spectrometry (MS) at light intensity of $80 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 27 salinity and $1.075 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrogen to $6.86 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS at light intensity $189.89 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 51.01 salinity and $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrogen. This result confirms the successful application of the Box-Behnken methodology to optimize factors and study their interaction for the best carotenoid production.

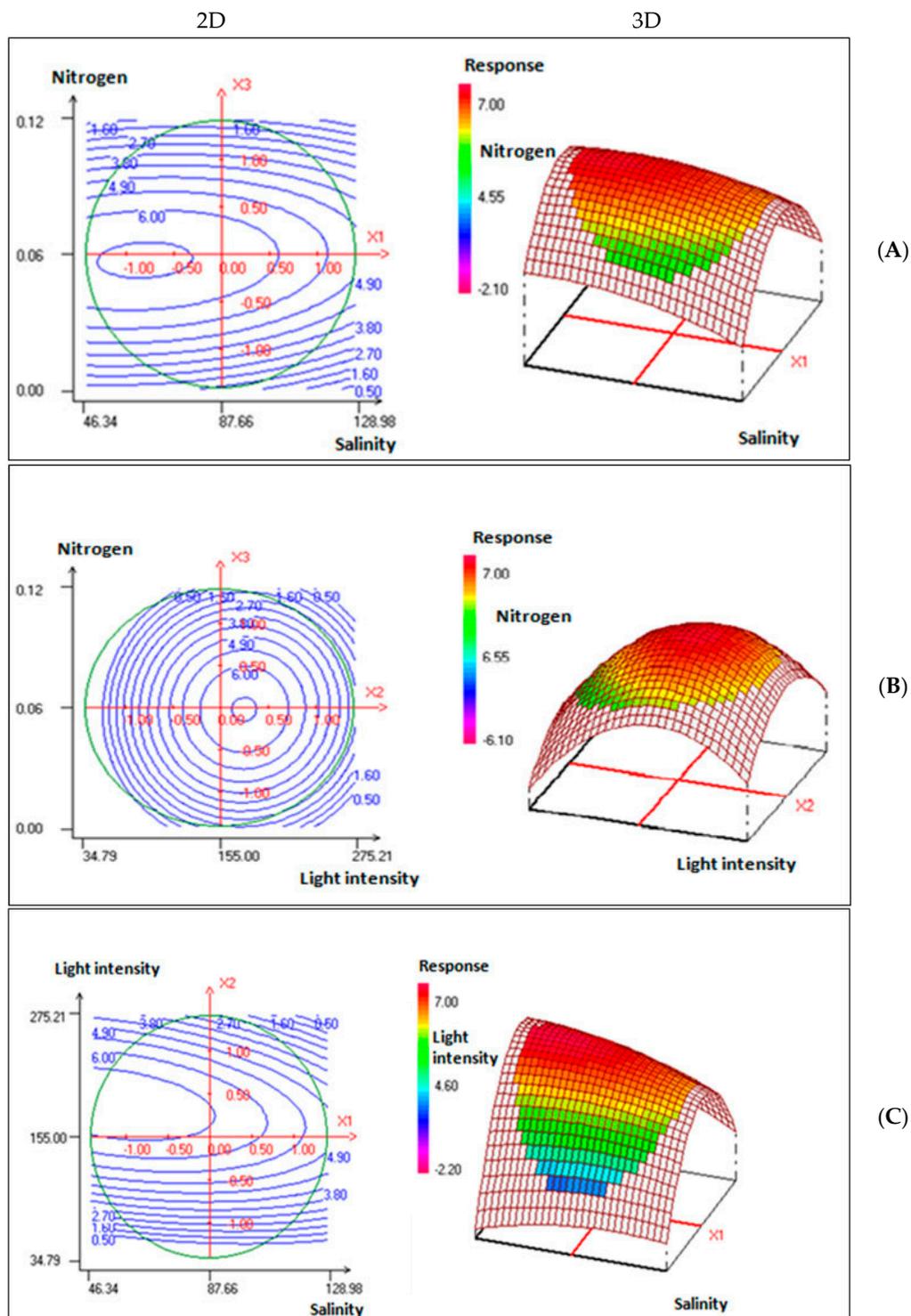


Figure 1. (A) Contour plots and response surface plot showing the effect of nitrogen, salinity concentration, and their mutual interaction on fixed light intensity. (B) Contour plots and response surface plot showing the effect of nitrogen concentration, light intensity, and their mutual interaction on salinity concentration fixed. (C) Contour plots and response surface plot showing the effect of light intensity, salinity concentration, and their mutual interaction on nitrogen concentration fixed.

The variance's analysis (ANOVA) through Fisher's F test of the carotenoid production of *Dunaliella* sp. was performed to ensure the statistical significance and the adequacy of the model. The model was found to be significant at 95% confidence level by the F -test as shown in Table 3, with a p -value

of regression ≤ 0.05 . In addition, the model did not exhibit lack of-fit ($p > 0.05$) denoting the failure of the model to represent data in the experimental domain at points that were excluded from the regression [22].

Table 3. Variance analysis for carotenoid production response.

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	Ratio	Significance (%)	Significance
Regression	64.4768	9	7.1641	6.7147	2.47 ^c	Significant
Residual	5.3346	5	1.0669	-	-	-
Lack of fit	5.1483	3	1.7161	18.423	5.2	Not significant
Error	0.1863	2	0.0932	-	-	-
Total	69.811	14	-	-	-	-

$R^2 = 0.924$; ^c Significant at 95%.

The obtained model quality was evaluated by calculating of the correlation coefficient value as well as the determination coefficient (R^2).

The experimental results were analyzed and an approximating function of *Dunaliella* sp. carotenoid production was obtained in the form of the Equation (1):

$$Y_{\text{carotenoids}} = 6.421 - 0.513X_1 + 1.395X_2 - 0.125X_3 - 0.327X_1^2 - 2.781X_2^2 - 2.305X_3^2 - 0.646X_1X_2 + 0.188X_1X_3 + 0.135X_2X_3 \quad (1)$$

where $Y_{\text{carotenoids}}$ represent the predicted carotenoid content; X_1 represent the salinity; X_2 the light intensity, and X_3 the nitrogen.

As a result, the optimized conditions for carotenoid yield were as follows: salinity, 51.01; light intensity, 189.89 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and nitrogen, 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

The R^2 value of 0.924 for Equation (1) was relatively high and indicated that the experimental carotenoid content values are in good agreement with the predicted carotenoid production levels from this model. The interaction between each independent factor and R^2 can be considered statistically significant.

2.3. Proteomic Analysis

2.3.1. Two-Dimensional Electrophoresis Profiles of Total Proteins in Response to Carotenoid High Production

In order to extend our knowledge of the molecular mechanisms implicated in the production of carotenoids under stress conditions, we undertook a differential comparative proteomic analysis of the isolated strain growing in standard and optimized cultures for production of these pigments. As shown in (Figure 2) and based on SameSpot software analysis, the spots revealed significant difference in proteome from the newly isolated strain cultured in two metabolic conditions (standard and optimized). Our proteomic study resulted in analysing 1173 protein spots of which 127 were differentially expressed. Among them, 57 protein spots were down-regulated and 70 were up-regulated.

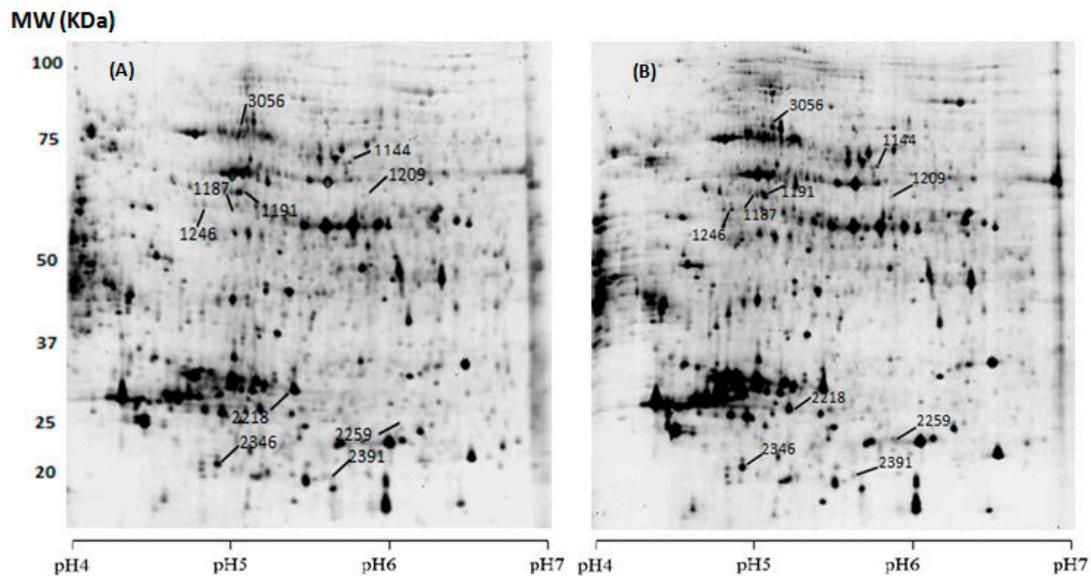


Figure 2. 2-DE of whole cell proteoms of *Dunaliella* AL-1 strain at exponential phase of standard (A) and optimized (B) cultures. Proteins of both cultures at exponential phase were extracted. For each technical duplicates, 30 μ g of whole cell proteins were separated on a pH 4–7 gradient and 12% polyacrylamide sodium dodecyl sulfate (SDS) gel and then revealed by silver staining. Six gels were included for image and statistical analysis. Identified spots by mass spectrometry (MS) are localized on the gels.

The present work showed that exposure to these stressful environmental conditions distorted the accumulation of many *Dunaliella* strain AL-1 proteins. These proteins were found to be involved in a different metabolic pathway positioning through KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), whose functions were involved in carbon and energy metabolism, carbohydrate metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, protein chaperone, and cellular processes.

2.3.2. Spot Identification

Protein spots that showed consistent differences in all gel images and detected by SameSpot Software (Figure 2) were selected for automated MS/MS spectrometry analysis and peptide mass fingerprinting (Tables 4 and 5). Table 4 also shows if the particular spot was up- or down-regulated under optimized conditions, promoting high carotenoid production. We found that 11 spots contained 16 unique proteins (Table 5). Some of these proteins, like heat shock protein (HSP), the α - and β -subunit of mitochondrial ATP synthase, enolase, carbonic anhydrase, α - and β -tubulin, were up-regulated in optimized conditions; whereas photosystem I light-harvesting cholrophyll-a/b protein and chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase were down-regulated.

Table 4. Identification of *Dunaliella* strain AL-1 proteins induced by carotenoid production conditions.

Spot Number	Hypothetical Function	ANOVA (<i>p</i>)	Fold	Standard Conditions	Stressful Conditions	Up/Down
1144	Enolase	3.218×10^{-4}	3.1	2.936×10^5	8.967×10^5	up
3056	Carbonic anhydrase	5.285×10^{-4}	3.1	1.958×10^6	6.082×10^6	up
1246	ATP synthase CF1 <i>beta</i> subunit (chloroplast)	0.001	4.1	3.382×10^5	1.370×10^6	up
1209	ATP synthase CF1 <i>alpha</i> subunit (chloroplast)	0.002	3.4	1.002×10^5	3.448×10^5	up
1187	<i>beta</i> -tubulin, partial	0.003	3.1	2.854×10^5	8.967×10^5	up
2391	Photosystem I light-harvesting chlorophyll-a/b protein	0.005	3.5	4.321×10^6	1.227×10^6	down
1191	ATP synthase CF1 <i>beta</i> subunit (chloroplast)	0.011	5.0	4.455×10^5	2.232×10^6	up
2259	Chloroplast ribulose phosphate -3-epimerase	0.014	5.4	2.089×10^6	3.860×10^5	down
2218	ATP synthase CF1 <i>alpha</i> subunit (chloroplast)	0.021	2.7	3.416×10^6	1.273×10^6	up
2346	Photosystem I light-harvesting chlorophyll-a/b protein 2	0.086	2.1	7.220×10^6	3.412×10^6	down
1255	Heat shock protein HSP70	0.021	2.9	3.357×10^5	9.837×10^5	up

Table 5. Mass spectrometry (MS) identification of spots.

Class	Spot Number	MW [kDa]/pI Theoretical	Score	SC [%]	Peptides	Hypothetical Function	Protein Accession Number
Carbon and energy metabolism	3056	64.2/4.6	130.4	4.2	4	Carbonic anhydrase	P54212
	1209	54.5/5.2	62.4	4.8	2	ATP synthase CF1 <i>alpha</i> subunit (chloroplast)	ACS95056
	2218	54.5/5.2	100.7	5.0	2	ATP synthase CF1 <i>alpha</i> subunit (chloroplast)	ACS95056
	1187	51.8/4.8	3017.7	89.6	82	ATP synthase CF1 <i>beta</i> subunit (chloroplast)	ACS95063
	1246	51.8/4.8	71.7	9.8	2	ATP synthase CF1 <i>beta</i> subunit (chloroplast)	ACS95063
	1191	51.8/4.8	754.6	40.6	13	ATP synthase CF1 <i>beta</i> subunit (chloroplast)	ACS95063
	2259	28.2/9	67.9	8.3	2	Chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase	AEF79975
Carbohydrate metabolism (Glycolysis/Gluconeogenesis)	1144	52.1/5.3	2202.8	55.5	51	Enolase	AIJ00881
Protein chaperon (stress)	1255	71.7/5.2	459.2	11.8	13	Heat shock protein HSP70	CAB71138
	1246	71.7/5.2	217.6	8.2	5	Heat shock protein HSP70	CAB71138
Photosynthesis	2391	24.7/6.4	200.0	15.4	5	Photosystem I light-harvesting chlorophyll-a/b protein	ACN94453
	2346	24.7/6.4	161.9	16.7	4	harvesting chlorophyll-a/b protein 2	ACN94453
Cellular Processes (Cytoskeleton)	1187	39.1/4.7	952.7	46.1	22	<i>beta</i> -tubulin, partial	AAY84712
	1187	49.4/4.9	326.5	19.7	9	<i>alpha</i> -tubulin protein	AEF79970
	1191	39.1/4.7	1683.3	57.3	47	<i>beta</i> -tubulin, partial	AAY84712
	1191	49.4/4.9	489.9	26.6	13	<i>alpha</i> -tubulin protein	AEF79970

2.3.3. Functional Classification of Identified Proteins

The optimized culture conditions for carotenoid production appear to affect considerably the metabolism of *Dunaliella* sp. AL-1. In fact, the potential roles of the differentially expressed proteins associated with applied stress in microalga are examined below.

ATP synthase CF1 alpha and beta subunits (chloroplast) (migrated in different spots: 1209, 2218, 1187, 1246, and 1191): The enzyme related to energy metabolism, photosynthesis, and also metabolic flexibility. The great quantity of these enzymes is consistent with proteomics findings demonstrating up-regulation of energy metabolism in the *Dunaliella* strain at high salinity [23]. As described by Liska et al. [23], the increased level of ATP and redox energy generating enzymes suggest enhanced energy metabolism at high salt in *Dunaliella salina*. In accordance with these results, we found that

carotenoid production was stimulated 346% at high salinity, in fact, it increased from $1.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS under standard conditions (salinity 27) to $6.86 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS under optimized conditions (salinity 51) (Figure 1). Producing more ATP and redox energy could play a role in supplying the metabolic pathways for an enhanced transport of CO_2 and ions [16].

Carbonic anhydrase (spot 3056): Carbonic anhydrase, as a metalloenzyme, is found in almost every type of tissue and plays a crucial role in catalyzing the equilibration of carbon dioxide (CO_2) and carbonic acid (H_2CO_3) [24]. It is vital for many eukaryotic physiological processes like respiration, photosynthesis, and CO_2 transport. The activity regulation of carbonic anhydrase is associated with numerous factors and does not follow a similar pattern for all the studied microalgae [25]. Under high carotenoid production conditions, when the salinity reaches 51, the CO_2 solubility decreases and it becomes the rate-limiting phase in photosynthesis [26]. Our analysis reveals that the carbonic anhydrase was up-regulated in AL-1 *Dunaliella* strain. This suggests that carbonic anhydrase enhances carbon acquisition [16]. It should be noted that, previous proteomics analysis showed also an up-regulation of this enzyme with light intensity in *Chlamydomonas reinhardtii* [26]. Similar to the present finding, Dionisio-sese et al. [27] indicated that light caused an increase in cabII-1 transcript abundance in *Chlamydomonas* by virtue of its role in the light reactions of photosynthesis.

Heat shock protein HSP 70 (spots 1246 and 1256): HSPs are a group of functionally related proteins triggered by various stressful conditions. They have multiple roles including membrane translocation, protein degradation, protein folding, misfolded proteins repair, and protein homeostasis regulation in normal and stressed cells [28]. Low temperature, osmotic, salinity, oxidative, desiccation, heavy metals, UV light, nitrogen deficiency or water deprivation are among the stressful conditions for cells, which have been found to provoke the synthesis of HSPs according to several studies [29]. Therefore, up-regulation of HSP in *Dunaliella* can also be described altogether as part of the stress response [30]. High level expression of HSPs can be generated by exposure to different environmental stress conditions [31]. We identified in this context of stressful conditions (N deficiency, high salinity, high light intensity), two HSPs 70 kDa proteins, which were up-regulated (2.9 fold).

Several studies have shown that nitrogen starvation could induce oxidative stress in plants, which could be part of the production of stress responsive proteins. Hockin et al. found that a lower protein content associated with nitrogen starvation could limit electron transfer over the photosynthetic complex in diatoms, rising the production of ROS, and thus oxidative stress [32]. Recently, some other studies have reported increase in HSP70 expression in response to salinity stress [33,34]. Yokthongwattana et al. [6] studied the involvement of HSP70B in the repair of photodamaged Photosystem II (PSII) and showed the strong correlation between patterns of HSP70B gene expression and the rate of PSII photodamage further with a low light vs high light.

Enolase (Spot 1144): The conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate (PEP) is catalyzed by the key enzyme in the glycolytic pathway; the enolase [35]. This abundant glycolytic enzyme is absolutely a multifunctional protein and could be considered as a surface receptor and also as a heat shock protein [36]. As observed, our analysis found up-regulation of the enolase under carotenoid accumulating conditions (3.1 fold). It was noted also that enolase functions as a cell associated stress protein implicated in cellular protection during hypoxia [37]. Recently, Ruan et al. reported that enolase is involved in both temperature and salt stress in algae [38].

Chloroplast ribulose phosphate-3-epimerase (Spot 2259): Ribulose phosphate-3-epimerase is involved in the biological process and takes part in several important metabolic pathways, comprising carbohydrate biosynthesis and the Calvin cycle. This enzyme which catalyzes the reversible epimerization of D-ribulose 5-phosphate to D-xylulose 5-phosphate, showed a decrease in expression under carotenoid biosynthesis conditions (5.4 fold). On the contrary, authors have found an increase in the expression level of this protein subsequently with nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* [39]. As suggested previously by Nowitzki et al. [40] and Mastrobuoni et al. [41], the increased expression of this enzyme may participate in the increased yield of ribulose-1,5-bisphosphate,

hence favoring carbon fixation and production of glyceraldehyde-3-P (G3P), which is the precursor for triglyceride biosynthesis.

Photosystem I light-harvesting chlorophyll-a/b protein 2 (Spots 2346 and 2391): Protein complexes are major components of the photosynthetic apparatus that absorb light and transfer excitation energy to the photochemical reaction [42]. Previous observations have also mentioned that the functional Chlorophyll antenna size of photosystem I (PSI) was diminished significantly in response to irradiance stress during cell growth [43]. It is concluded that excessive irradiance during cell growth induces a down-regulation of the Chlorophyll antenna size of PSI in *Dunaliella* AL-1.

Flagellar Proteins (Spots 1187 and 1191): In eukaryotic cells, microtubules are highly dynamic structures composed of, α - and β -tubulin heterodimers. They are known to play a key role in major processes such as cell motility, intracellular trafficking, and mitosis [44,45].

Recent studies have suggested that microtubules play a major role in plant development as potent players in detecting stressful conditions, and as a consequent cellular response inducer [46].

Our study showed that α - and β -tubulins, known to compose the flagellum, were up-regulated in *Dunaliella* strain AL-1. These findings are in agreement with previous results [23] which explained the functional meaning of increased yield of cytoskeletal proteins under high salt conditions by strengthening the cell cytoskeleton. However, recent results [42] reported a down-regulation of flagellar proteins under salt stress. This metabolism is not yet well known in microalgae, but we suspect that up-regulation of tubulins in response to these stressful conditions may result in a profound reorganization of these membrane skeleton structures involved in plasma membrane integrity as well as harbouring signalling complexes and ion channels. In fact, the response of cytoskeleton protein to stress is well documented in plants. Authors have linked the changes in abundance of cytoskeleton-associated proteins to an adaptive response during osmotic stress [47]. Livanos et al., discussed well the interplay between ROS and tubulin cytoskeleton and highlighted the reorganization and remodelling of tubulin in response to ROS homeostasis [46].

Taken together, the identified carotenoid production induced proteins in *Dunaliella* sp. AL-1 revealed a down-regulation of PSI light proteins and ribulose phosphate-3-epimerase, an important enzyme in the Calvin cycle. These findings show that *Dunaliella* sp. strain AL-1 when producing a high amount of carotenoids, have a reduced photosynthetic CO₂ assimilation as a consequence. Nonetheless, carbon continued to be assimilated as seen from the up-regulation of carbonic anhydrase. The latter is involved in the first step of CO₂ fixation in the photorespiration process. Slowing down the light depended-photosynthesis would be offset not only by enhancing photorespiration but also by stimulating carbohydrate degradation (e.g., oxidative pentose phosphate cycle, and glycolysis cycle). In fact, as shown in (Figure 3), the down-regulation of the Calvin cycle enzyme ribulose phosphate-3-epimerase leads to the accumulation of xylulose-5P, a substrate for G3P production in the pentose phosphate cycle. Consistent with this prediction, we found that enolase, an important enzyme in the glycolysis cycle, was also up regulated under carotenoid production conditions. The accumulation of PEP molecules produced by enolase leads to an increased yield of pyruvate, the latest product of glycolysis pathway. The regulated metabolic pathways for a subsequent accumulation of G3P and pyruvate would be probably the first step of the carotenoid production by the methylerythritolphosphate (MEP) pathway.

The present data suggest that carotenoid production conditions are considered as stressful conditions for *Dunaliella* sp. strain AL-1, which in turn reacts by reducing photosynthetic assimilation and accelerating photorespiration. The findings revealed also an important accumulation of the xylulose-5P product. This is described for the first time, to the best of our knowledge, in carotenoid production conditions. It is suspected to play a crucial role as precursor or activator for isopentenyl pyrophosphate (IPP) production in non-mevalonate pathway (Figure 3).

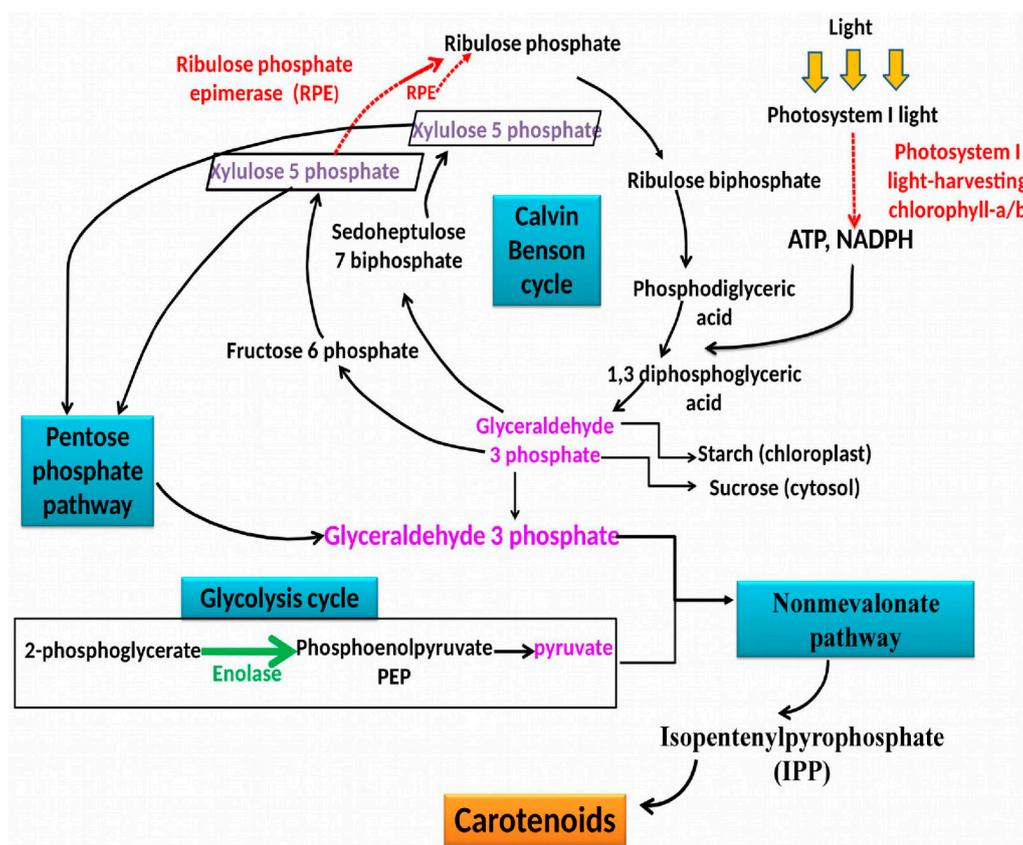


Figure 3. Schematic presentation of the regulated metabolic pathways under carotenoid production conditions in *Dunaliella* strain AL-1. Red dotted arrows indicate the down regulated enzymes while green thick arrows show the up regulated enzyme identified in this work. Blue boxes denote pathway names.

3. Materials and Methods

3.1. Algal Strain, Medium and Culture Conditions

The alga used in this study was isolated from the Sebkhah of Sidi El Hani (Sousse, Tunisia), which is located thirty kilometers from the south-west of Sousse. First, two hundred milliliters of each sample were filtered using a 0.22 μm pore size membrane. Subsequently each membrane was flooded into 50 mL of F/2 medium [48]. Flasks were incubated at 28 $^{\circ}\text{C}$ at a continuous illumination intensity ($80 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) provided by cool-white fluorescence tubes (TL5 tungsten filament lamps; Philips Co., Taipei, Taiwan). Every two days, the cultures were visually examined and the algal development was confirmed by inverted microscopy analysis at $40\times$ magnification (Motic microscope AE2000, Barcelona, Spain) [49].

Isolation of a pure microalga was performed by combining serial dilutions, plating, and micromanipulation techniques. In order to check the culture purity, each dilution series was microscopically analyzed.

3.2. DNA Extraction, PCR Amplification, Sequencing, and Phylogenetic Analysis

The microalgal strain was identified based on 18S rRNA gene sequence. Genomic DNA extraction was performed using Quick-G DNA MiniPrep D3006 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) as recommended by the manufacturer. The 18S rRNA gene was amplified by PCR using universal primers: *EukA* (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and *EukB* (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') [21]. PCR condition was as follows: denaturation by

heating at 95 °C for 3 min and subjected to 35 cycles at 95 °C for 30 s, at 55 °C for 30 s, and at 72 °C for 2 min and a final elongation step at 72 °C for 7 min [50]. PCR products were purified and sequenced with *EukA* and *EukB* primers. All 18S DNA sequences of the isolated strains were compared to all microalgal sequences available in the Gene Bank data base using the BLAST program.

3.3. Carotenoid Analysis

To quantify carotenoids, 2 mL of each culture in their exponential phase (standard and optimized conditions) were centrifuged at 4000 × *g* during 10 min. The pellet was solubilized in ethanol 96% and sonicated for 30 min to extract all pigments. After sonication, the solution was centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min and carotenoids were assayed spectrophotometrically using the Equation (2) given by Wellburn and Lichtenthaler [51].

$$[\text{carotenoids}] (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (1000 \times A_{470} - 2.05 \times [\text{chlorophyll a}] - 114.8 [\text{chlorophyll b}]) / 245 \quad (2)$$

3.4. Experimental Design and Data Analysis

In this present paper, a Box-Behnken design [52] was applied to optimize the best experimental conditions of three independent factors affecting the carotenoid production of *Dunaliella* sp.: salinity (X_1), light intensity (X_2), and nitrogen (X_3). The amount of carotenoids (Y) was fixed as the design experiments response which could be described by a second order polynomial function. Nemrod-W[®] software (LPRAI, Marseille, France) was used, for the experimental design, regression and statistical analysis [49,53] (Logiciel Nemrod-W, LPRAI, Marseille, France). Tables 1 and 2 show independent variables of the Box–Behnken plan in coded levels where Y is the response variable, β_0 the constant, X_i and X_j the coded variables ranging between +1 and −1. The coefficients for the linear, quadratic, and interaction effects are β_i , β_{ii} and β_{ij} , respectively. Furthermore, the experiments were randomized to avoid systematic error, and three central replicates were added to estimate the pure experimental error. In the current work, the experiment design contained 15 trials for optimizing culture conditions and the levels of independent variables were set to three levels: low (−1), medium (0), and high (+1).

3.5. Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to validate the results of carotenoid production of the RSM design.

3.6. Proteomic Analysis

3.6.1. Protein Extraction

For proteomics, 400 mL of exponential phase cultures (standard and optimized) were centrifuged at 2500 × *g* for 20 min at 5 °C. Pellets were rinsed twice with distilled water, rapidly frozen at −80 °C then lyophilized. The lyophilized pellets were used for total protein extraction following the protocol reported by Lee and Lo [54]. In brief, cells were added by 1 mL TRIzol Reagent[™] (Ambion, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Germany) then sonicated for 3 min using a Vibra-Cell[®] 75022 sonicator (Bioblock, Illkirch, France) in an ice bath. After that 200 μL of chloroform were added to the cell lysate before shaking and centrifugation for 10 min at 4 °C (12,000 × *g*). Ethanol (300 μL) was added to the lower phase after removing the hydrophilic one. After centrifugation for 10 min at 4 °C (16,000 × *g*), the supernatants was mixed with one volume of 20% trichloroacetic acid (TCA) and 0.14% β-mercaptoethanol, in cold acetone. After an overnight incubation, proteins were precipitated at −20 °C, the mixtures were centrifuged for 10 min at 4 °C (16,000 × *g*). Finally, the pellets were washed with cold acetone then re-suspended in a buffer containing urea (6 M), thio-urea (2 M), CHAPS (4%), and Bio-Lyte 3/10 (2%) [55]. Two biological replicates were performed for each condition.

3.6.2. Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE)

Extracts were analyzed on analytic 2-DE gels by referring to the O'Farrell protocol [56]. The second-dimension electrophoresis was performed on 12% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gels to separate proteins having molecular weight ranging from 10 to 120 kDa. 2D Clean-up kit (GE Healthcare, Freiburg, Germany) was used to purify 30 µg and 300 µg of protein for analytic and preparative gels, respectively. The aliquots were then re-suspended in 330 µL rehydration buffer containing urea (6 M), thio-urea (2 M), CHAPS (4%), Bio-Lyte 3/10 (2%), bromophenol blue (0.01%), tributylphosphine (3.3 mM), and DTT (5%). The dry immobilized pH gradient (IPG) strips (linear pH 4–7 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France)), were rehydrated for 18 h at 50 V before applying isoelectric focusing (IEF) using the Bio-Rad Protean IEF Cell at 66,000 V·h. The strips were first treated with a buffer containing urea (6 M), SDS (2%), Tris-HCl (0.05 M) pH 8.8, glycerol (30%) added with DTT (2%) and tributylphosphine (3.3 mM). Then they were treated with the same buffer supplemented this time with iodoacetamide (4%) [55]. Finally, the visualization of proteins was carried out by the silver staining and Bio-Safe colloidal Coomassie blue (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) methods for analytic and preparative gels, respectively. Two technical replicates were performed for each extract.

3.6.3. Image Acquisition and Data Analysis

Bio-Rad GS800 densitometer was used to register analytic gels images. The latter were analyzed with the Progenesis SameSpots, version 3.0, software (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK). The quality control (QC) of the software, was used to verify the gel's quality. The vector alignment tool of SameSpots Workflow was employed for an automatic pixel level geometric alignment of the gels monitored by manual corrections. The background-corrected abundance of each spot was calculated, and the abundance ratio was determined by dividing the sample abundance by the reference abundance. Spot volumes were normalized to calibrate data between different sample runs, and normalized spots were then statistically analyzed by using the statistics module in SameSpots. ANOVA tests were carried out to evaluate significant differences between standard and optimized cultures. The significant differentially expressed protein spots were elaborated using the criterion a *p*-value <0.05 to exclude false positives, a power >0.8 to guarantee reproducibility among gels of standard and optimised cultures, and a fold number >2 for the biological significance.

3.6.4. In-Gel Tryptic Digestion and Protein Identification by Mass Spectrometry

The differentially expressed protein spots of interest were further identified by mass spectrometry (MS). Protein samples of each condition group were run in parallel on separate preparative polyacrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue (Colloidal Blue stain kit; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Bands of interest were excised from gels and automated tryptic digestion was conducted as previously described [57,58]. Gel bands were excised in a sterile laminar flow hood, transferred individually to 1.5 mL microtubes and cut into cubes of roughly 1 mm³. Gel cubes were de-stained for 1 h and 30 min at 4 °C using a solution of 45% acetonitrile and 55 mM ammonium bicarbonate. After gel cube washing and in-gel trypsin proteolysis of proteins, the peptides produced were extracted onto Poros beads and purified with ZipTips (Millipore, Molsheim, France) as previously described [58].

Extracted proteolytic peptides were analyzed by nanoUltraHPLC-nanoESI UHR-QTOF MS. Experiments were performed using an UltiMate™ 3000 NanoRSLC System (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) connected to a Bruker MaXis UHR-QTOF 2 GHz mass spectrometer equipped with an online nano-ESI ion source. The LC-MS setup was controlled by Bruker Hystar™ software version 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peptides were pre-concentrated online on a Dionex Acclaim PepMap100 C18 reverse-phase precolumn (inner diameter 100 µm, length 2 cm, particle size 5 µm, pore size 100 Å), and separated on a nanoscale Acclaim Pepmap100 C18 column (inner diameter 75 µm, length 25 cm, particle size 2 µm, pore size 100 Å) at a flowrate of 450 nL/min using a 2–35% gradient

of acetonitrile in 0.1% formic acid. Peaks with the three highest intensities and a minimum of 400 ion counts were selected for collision-induced dissociation (CID) MS/MS fragmentation using an isolation window of 3–9 Da depending on the m/z value.

Acquired MS/MS spectra were searched against the UniProtKB/Swiss-Prot/TrEMBL and non-redundant protein sequences from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the Mascot identification engine (version 2.3, Matrix Science, London, UK). The search was conducted allowing for a maximum of two missed cleavages, 5 ppm tolerance for precursor ions, and 0.04 Da for fragment ions, respectively. Methionine oxidation was allowed. Since contaminations from human (mainly keratins) origin could be present in the samples analyzed, the search in databases was restricted to microalgae species. In case of peptides matching to multiple members of a protein family, the presented protein was selected based on both the highest score and the highest number of matching peptides.

4. Conclusions

The *Dunaliella* strain AL-1 was isolated and identified based on 18S rRNA gene sequence. Response surface methodology was used to determine the optimal experimental conditions (light intensity, salinity, and nitrogen deficiency) for high carotenoid production from the newly isolated *Dunaliella* AL-1 strain. In this present paper, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) coupled with MS-MS resulted in the understanding of some physiological changes in the cells. In fact, a larger number of different metabolic, stress, and cellular process genes were differentially-expressed under optimized conditions. This allowed us to better understand the metabolic changes in *Dunaliella* sp. strain AL-1 during the production of carotenoids.

Acknowledgments: We are very grateful to Gaël Bougaran (Laboratoire BRM-PBA Ifremer, Nantes, France) for his excellent technical assistance with the proteomic analysis. The authors would like to express their gratitude to Guillaume Gabant from the “Plateforme de Spectrométrie de Masse et Protéomique du Centre de Biophysique Moléculaire” (CNRS, Orléans, France) for mass spectrometry analysis.

Author Contributions: Faten Ben Amor, Slim Abdelkafi and Imen Fendri conceived of and proposed the idea; Faten Ben Amor, Fatma Elleuch, Slim Abdelkafi and Imen Fendri designed the study; Faten Ben Amor, Fatma Elleuch, Mohamed Barkallah, Matthieu Garnier and Hajer Ben Hlima performed the experiments; Faten Ben Amor, Mohamed Barkallah, Matthieu Garnier, Bruno Saint-Jean, Hajer Ben Hlima, Chantal Pichon, Slim Abdelkafi, and Imen Fendri participated in data analysis; Faten Ben Amor, Hajer Ben Hlima, Bruno Saint-Jean, Slim Abdelkafi, and Imen Fendri contributed to writing and revising the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hosseini Tafreshi, A.; Shariati, M. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 14–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Foo, S.C.; Yusoff, F.M.; Ismail, M.; Basri, M.; Yau, S.K.; Khong, N.M.; Chan, K.W.; Ebrahimi, M. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *J. Biotechnol.* **2017**, *241*, 175–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ben Hsouna, A.; Hamdi, N.; Miladi, R.; Abdelkafi, S. *Myrtus communis* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 571–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ibañez, E.; Cifuentes, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 703–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Emtjazjoo, M.; Moghadasi, Z.; Rabbani, M.; Emtjazjoo, M.; Samadi, S.; Mossaffa, N. Anticancer effect of *Dunaliella salina* under stress and normal conditions against skin carcinoma cell line A431 in vitro. *Iran. J. Fish. Sci.* **2012**, *11*, 283–293.
6. Yokthongwattana, K.; Chrost, B.; Behrman, S.; Casper-Lindley, C.; Melis, A. Photosystem II damage and repair cycle in the green alga *Dunaliella salina*: Involvement of a chloroplast-localized HSP70. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 1389–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Lao, Y.-M.; Xiao, L.; Luo, L.-X.; Jiang, J.-G. Hypoosmotic expression of *Dunaliella bardawil* ζ -carotene desaturase is attributed to a hypoosmolarity-responsive element different from other key carotenogenic genes. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 359–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ben-Amotz, A.; Avron, M. The Role of Glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.* **1973**, *51*, 875–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Fazeli, M.R.; Tofighi, H.; Samadi, N.; Jamalifar, H. Effects of salinity on beta-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 2453–2456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hejazi, M.A.; Wijffels, R.H. Effect of light intensity on β -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomol. Eng.* **2003**, *20*, 171–175. [[CrossRef](#)]
11. Xu, Y.; Ibrahim, I.M.; Harvey, P.J. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *106*, 305–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mojaat, M.; Pruvost, J.; Foucault, A.; Legrand, J. Effect of organic carbon sources and Fe^{2+} ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 177–184. [[CrossRef](#)]
13. Avron, M. The osmotic components of halotolerant algae. *Trends Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 5–6. [[CrossRef](#)]
14. Guarnieri, M.T.; Nag, A.; Smolinski, S.L.; Darzins, A.; Seibert, M.; Pienkos, P.T. Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Katz, A.; Waridel, P.; Shevchenko, A.; Pick, U. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. *Mol. Cell. Proteom.* **2007**, *6*, 1459–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Juin, C.; Bonnet, A.; Nicolau, E.; Bérard, J.B.; Devillers, R.; Thiéry, V.; Cadoret, J.P.; Picot, L. UPLC-MSE profiling of Phytoplankton metabolites: Application to the identification of pigments and structural analysis of metabolites in *Porphyridium purpureum*. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2541–2558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Brechlin, P.; Jahn, O.; Steinacker, P.; Cepek, L.; Kratzin, H.; Lehnert, S.; Jesse, S.; Mollenhauer, B.; Kretzschmar, H.A.; Wiltfang, J.; et al. Cerebrospinal fluid-optimized two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) facilitates the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* **2008**, *8*, 4357–4366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Jin, T.; Hu, L.-S.; Chang, M.; Wu, J.; Winblad, B.; Zhu, J. Proteomic identification of potential protein markers in cerebrospinal fluid of GBS patients. *Eur. J. Neurol.* **2007**, *14*, 563–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Oren, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst.* **2005**, *1*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chtourou, H.; Dahmen, I.; Jebali, A.; Karray, F.; Hassairi, I.; Abdelkafi, S.; Ayadi, H.; Sayadi, S.; Dhoub, A. Characterization of *Amphora* sp., a newly isolated diatom wild strain, potentially usable for biodiesel production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, *38*, 1381–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Chtourou, H.; Dahmen, I.; Hassairi, I.; Abdelkafi, S.; Sayadi, S.; Dhoub, A. *Dunaliella* sp. a wild algal strain isolated from the Sfax-Tunisia solar evaporating salt-ponds, a high potential for biofuel production purposes. *J. Biobased Mater. Bioenergy* **2014**, *8*, 27–34. [[CrossRef](#)]
22. Ahmad, A.L.; Wong, S.S.; Teng, T.T.; Zuhairi, A. Optimization of coagulation-flocculation process for pulp and paper mill effluent by response surface methodological analysis. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *145*, 162–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liska, A.J.; Shevchenko, A.; Pick, U.; Katz, A. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 2806–2817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Smith, K.S.; Ferry, J.G. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 335–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Aizawa, K.; Miyachi, S. Carbonic anhydrase and CO_2 concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, *39*, 215–233. [[CrossRef](#)]
26. Eriksson, M.; Villand, P.; Gardeström, P.; Samuelsson, G. Induction and regulation of expression of a low- CO_2 -induced mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 637–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dionisio-Sese, M.L.; Fukuzawa, H.; Miyachi, S. Light-induced carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **1990**, *94*, 1103–1110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Guo, R.; Youn, S.H.; Ki, J.-S. Heat shock protein 70 and 90 genes in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*: Genomic structures and transcriptional responses to environmental stresses. *Int. J. Genom.* **2015**, *2015*, e484626.
29. Li, Z.; Srivastava, P. Heat-shock proteins. *Curr. Protoc. Immunol.* **2004**, *Appendix 1*. Appendix 1T. [[CrossRef](#)]
30. Santoro, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 55–63. [[CrossRef](#)]
31. Choi, Y.E.; Kwon, K.W.; Lee, J.C.; Woo, S.Y. Expression of the rice cytoplasmic cysteine synthase gene in tobacco reduces ozone-induced damage. *Plant Biotechnol. Rep.* **2007**, *1*, 93–100. [[CrossRef](#)]
32. Hockin, N.L.; Mock, T.; Mulholland, F.; Kopriva, S.; Malin, G. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 299–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Larsen, P.F.; Nielsen, E.E.; Koed, A.; Thomsen, D.S.; Olsvik, P.A.; Loeschcke, V. Interpopulation differences in expression of candidate genes for salinity tolerance in winter migrating anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.). *BMC Genet.* **2008**, *9*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tine, M.; Bonhomme, F.; McKenzie, D.J.; Durand, J.-D. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to a range of environmental salinities. *BMC Ecol.* **2010**, *10*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wang, W.-X.; Li, K.-L.; Chen, Y.; Lai, F.-X.; Fu, Q. Identification and function analysis of enolase gene NLEno1 from *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *J. Insect Sci.* **2015**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pancholi, V. Multifunctional alpha-enolase: Its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2001**, *58*, 902–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Aaronson, R.M.; Graven, K.K.; Tucci, M.; McDonald, R.J.; Farber, H.W. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27752–27757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ruan, K.; Duan, J.; Bai, F.; Lemaire, M.; Ma, X.; Bai, L. Function of *Dunaliella salina* (Dunaliellaceae) enolase and its expression during stress. *Eur. J. Phycol.* **2009**, *44*, 207–214. [[CrossRef](#)]
39. Yang, Z.-K.; Ma, Y.-H.; Zheng, J.-W.; Yang, W.-D.; Liu, J.-S.; Li, H.-Y. Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *26*, 73–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Nowitzki, U.; Wyrich, R.; Westhoff, P.; Henze, K.; Schnarrenberger, C.; Martin, W. Cloning of the amphibolic Calvin cycle/OPPP enzyme D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.1) from spinach chloroplasts: Functional and evolutionary aspects. *Plant Mol. Biol.* **1995**, *29*, 1279–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mastrobuoni, G.; Irgang, S.; Pietzke, M.; Aßmus, H.E.; Wenzel, M.; Schulze, W.X.; Kempa, S. Proteome dynamics and early salt stress response of the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jia, Y.-L.; Chen, H.; Zhang, C.; Gao, L.-J.; Wang, X.-C.; Qiu, L.-L.; Wu, J.-F.; Jia, Y.-L.; Chen, H.; Zhang, C.; et al. Proteomic analysis of halotolerant proteins under high and low salt stress in *Dunaliella salina* using two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Genet. Mol. Biol.* **2016**, *39*, 239–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Smith, B.M.; Morrissey, P.J.; Guenther, J.E.; Nemson, J.A.; Harrison, M.A.; Allen, J.F.; Melis, A. Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (Green Algae) to irradiance stress. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1433–1440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Parker, A.L.; Kavallaris, M.; McCarroll, J.A. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Willem, S.; Srahna, M.; Devos, N.; Gerday, C.; Loppes, R.; Matagne, R.F. Protein adaptation to low temperatures: A comparative study of α -tubulin sequences in mesophilic and psychrophilic algae. *Extremophiles* **1999**, *3*, 221–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Livanos, P.; Galatis, B.; Apostolakos, P. The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant Signal. Behav.* **2014**, *9*, e28069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kosová, K.; Prášil, I.T.; Vítámvás, P. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6757–6789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Guillard, R.R.L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*; Smith, W.L., Chanley, M.H., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 1975; pp. 29–60, ISBN 978-1-4615-8716-3.

49. Dammak, M.; Haase, S.M.; Miladi, R.; Ben Amor, F.; Barkallah, M.; Gosset, D.; Pichon, C.; Huchzermeyer, B.; Fendri, I.; Denis, M.; et al. Enhanced lipid and biomass production by a newly isolated and identified marine microalga. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Fendri, I.; Chaari, A.; Dhouib, A.; Jlassi, B.; Abousalham, A.; Carrière, F.; Sayadi, S.; Abdelkafi, S. Isolation, identification and characterization of a new lipolytic *Pseudomonas* sp., strain AHD-1, from Tunisian soil. *Environ. Technol.* **2010**, *31*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wellburn, A.R.; Lichtenthaler, H. Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf extracts in different solvents. In *Advances in Agricultural Biotechnology*; Sybesma, C., Ed.; Advances in Photosynthesis Research; Springer: Dordrecht, The Netherland, 1984; pp. 9–12, ISBN 978-90-247-2943-2.
52. Box, G.E.P.; Behnken, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* **1960**, *2*, 455–475. [[CrossRef](#)]
53. Mathieu, J.E.; Heffner, T.S.; Goodwin, G.F.; Salas, E.; Cannon-Bowers, J.A. The influence of shared mental models on team process and performance. *J. Appl. Psychol.* **2000**, *85*, 273–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lee, F.W.-F.; Lo, S.C.-L. The use of Trizol reagent (phenol/guanidine isothiocyanate) for producing high quality two-dimensional gel electrophoretograms (2-DE) of dinoflagellates. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *73*, 26–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Garnier, M.; Carrier, G.; Rogniaux, H.; Nicolau, E.; Bougaran, G.; Saint-Jean, B.; Cadoret, J.P. Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *J. Proteom.* **2014**, *105*, 107–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007–4021. [[PubMed](#)]
57. Abdelkafi, S.; Abousalham, A.; Fendri, I.; Ogata, H.; Barouh, N.; Fouquet, B.; Scheirlinckx, F.; Villeneuve, P.; Carrière, F. Identification of a new phospholipase D in *Carica papaya* latex. *Gene* **2012**, *499*, 243–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ben Halima, N.; Khemakhem, B.; Fendri, I.; Ogata, H.; Baril, P.; Pichon, C.; Abdelkafi, S. Identification of new oat β -amylase by functional proteomics. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1864*, 52–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 4



Article

Deciphering the Biological Activities of *Dunaliella* sp. Aqueous Extract from Stressed Conditions on Breast Cancer: from in Vitro to in Vivo Investigations

Fatma Elleuch ^{1,2} , Patrick Baril ², Mohamed Barkallah ³, Federico Perche ², Slim Abdelkafi ³ ,
Imen Fendri ^{1,*} and Chantal Pichon ^{2,*}

¹ Laboratoire de Biotechnologie Végétale Appliquée à l'Amélioration des Cultures, Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Sfax 3000, Tunisia; fatma.elleuch@ymail.com

² Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS UPR 4301, 45071 Orleans, France; patrick.baril@cnrs.fr (P.B.); federico.perche@cnrs-orleans.fr (F.P.)

³ Unité de Biotechnologie des Algues, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, University of Sfax, Sfax 3038, Tunisia; mohamedbarkallah@gmail.com (M.B.); slim.abdelkafi@enis.tn (S.A.)

* Correspondence: imen.fendri@fss.usf.tn (I.F.); Chantal.PICHON@cnrs.fr (C.P.); Tel.: +21695682765 (I.F.); +33238255595 (C.P.)

Received: 26 January 2020; Accepted: 27 February 2020; Published: 3 March 2020



Abstract: In order to harness local resources to improve well-being and human health, we aim in this study to investigate if the microalgae *Dunaliella* sp. isolated from the Tunisian coastal zone possesses any anticancer activity. *Dunaliella* sp. was cultured under normal (DSC) or stressed (DSS) conditions and extracted using different procedures. The biological activity assessment was performed on the Triple Negative Breast Cancer (TNBC) using 4T1 murine cells as a model. Results indicate that: (i) aqueous extract was the most cytotoxic compared to ethanolic and hydroalcoholic extracts; (ii) DSS activity was superior to that of DSC. DSS extracts induced apoptosis rather than necrosis, as evidenced by DNA fragmentation, PARP-1 cleavage and caspase-3 activation. Evaluation in an orthotopic TNBC model validated the anticancer activity in vivo. Intratumoral injection of DSS extract resulted in reduced tumor growth and an enhanced immune system activation. On the transcriptional side, the expression level of the immunosuppressive enzyme *Arg-1* was decreased, as well as those of *NOS-2* and *COX-2* genes. These results suggest a potential anticancer activity of Tunisian *Dunaliella* sp. deserving further attention.

Keywords: cancer; *Dunaliella*; microalgae; 4T1 cells

1. Introduction

Microalgae represent an important source of biologically active compounds. *Dunaliella salina* is an interesting microalga as it is characterised by its ability to produce diverse metabolites depending on the culture conditions. This green microalgae is well known for its high production of carotenoids, especially β -carotene, with production reaching up to 10–14% dry weight, but also polyunsaturated fatty acids, glycerol and other antioxidants [1]. Thanks to these features, *Dunaliella* is on the list of products authorized for food supplementation and their conditions of use according to French law (NOR: ERNC1406332A, 24 June 2014). *Dunaliella* is a source of the food supplement E160 (β -carotene). There are some studies reporting the effect of *Dunaliella* in whole powder form against fibrosarcoma [2], colitis [3], DMBA-induced breast cancer [4], thanks to its immunological and anti-leukemic properties [5]. Further studies have focused on identifying the active compounds in *Dunaliella* extracts. Other studies have been performed with fractions extracted with different solvents like hexane, ethanol and methanol, mainly used in order to extract β -carotene or to purify it. Those extracts have been studied to assess their

antioxidant activity [6,7], antimicrobial activity against pathogens isolated from patients with external otitis [8], inflammatory and immune response [9–11]. Concerning anti-cancer activity, their effect in lung carcinoma [12], leukemic cancer [13], cutaneous carcinoma [14], prostate cancer [15], breast carcinoma [16], and oral squamous carcinoma [17] have been assessed. The majority of these extracts were shown to induce cell cycle arrest at G0/G1 phase and apoptosis cell death.

Breast cancer is the most common form of cancer amongst women around the world contributing to 25.4% of the total number of new cases diagnosed in 2018 according to the World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research [18]. Breast cancer is subdivided into four groups depending on the presence or the absence of three receptors for oestrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) [19]. The type with the worst prognosis is Triple Negative Breast Cancer (TNBC), characterized by the total absence of these three receptors, which is extremely difficult to handle by either hormonal and/or targeted therapies [20]. These aggressive tumors represent 12 to 17% of cases and are characterised by an elevated nuclear grade, mitotic activity and high power to metastasize to the viscera [21]. Many treatments are currently proposed comprising the use of PARP inhibitors to induce cancer cell death [22].

In healthy cases, mechanisms of cell death, such as apoptosis (programmed process), necrosis (accidental process) and autophagy are the gatekeepers responsible for maintaining homeostasis of the organism. Hallmarks of cancer include selective growth and proliferative advantages, altered stress responses favouring overall survival, vascularization, invasion and metastasis, metabolic rewiring, an abetting microenvironment, and immune activity [23].

Apoptosis is triggered through the intrinsic or mitochondrial pathway by activation of caspase-9 and in the extrinsic pathway by caspase-8 activation. The perforin/granzyme pathway also leads to caspase-3 activation [24]. Candé et al., have described an independent caspase pathway through the translocation of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) to the nucleus causing chromatin condensation [25]. Effector caspases-3, 6 and 7 cleave various substrates such as PARP, cytokeratins, the nuclear protein NuMA, the plasma membrane cytoskeletal protein α -fodrin, etc., resulting in biochemical modifications such as protein cleavage and DNA breakdown; and morphological changes such as cell shrinkage, pyknosis, karyorrhexis and membrane blebbing [24]. Thereby, PARP-1 cleavage (deactivation) is considered as a marker of apoptosis [21]. In fact, PARP-1 is the most studied protein of PARP-family, containing at least 18 members, as it represents approximately 85% of the total activity of cellular PARP [26,27]. Its major role is to repair DNA damage by detecting single stranded DNA to maintain genomic integrity. PARP-1 is composed of a 54 kDa catalytic domain, a 46 kDa DNA Binding Domain (DBD) and a 22-kD auto-modification domain (AMD) [27]. It is a substrate of caspase-3 and 7, calpains, cathepsins, granzymes and matrix metalloproteases creating various exposed structural domains that subsequently induce specific forms of cell death [27]. As a substrate of caspase-3, 7, cathepsin B and cathepsin D, it can be cleaved into 89 and 24 kDa fragments.

Cancer cells have the ability to escape both apoptosis and immunological surveillance [28,29]. The goal of cancer immunotherapy is to reinforce the immune system and to restore such immunosurveillance. The presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) is positively correlated with prognosis [30–33], depending obviously on the identity of infiltrating immune cells. If these infiltrates are CD8⁺ T lymphocytes or NK cells, they will have a beneficial effect by enhancing tumor destruction [34,35]. CD4⁺ T-helper 1 cells (Th1) are also involved in the orchestration of antitumor responses by activating the antigen presenting cells as dendritic cells and enhancing CD8 T lymphocyte infiltration through IFN- γ , TNF- α and IL-2 production [36]. One of the features of tumor cells is their ability to produce a specific environment favouring the infiltration of immunosuppressive cells such as Treg (immunosuppressor), Th2 (T helper CD4⁺ type 2) and under some circumstance Th17 (proinflammatory), M2 macrophages, N2 neutrophils and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [34,36,37]. For breast cancer, there is a positive correlation between the presence of TILs and the improvement of clinical outcomes [30]. To our knowledge, this study reports for the first time how an aqueous extract of an isolated strain *Dunaliella* sp is effective against breast cancer by inducing

cell death pathways. The study combines both in vitro and in vivo experiments performed with 4T1 aggressive TNBC.

2. Results

2.1. 4T1 Mammary Carcinoma Cells Sensitivity towards DS Extracts

The first set of experiments was to determine the effect of DS extracted from different procedures on the viability of 4T1 cells. When cells were treated by DSC aqueous extract at 1 and 0.75 mg/mL during 24 h, the cell viability was significantly reduced to 10% and 60%, respectively (Figure 1a). Lower doses did not show any effect. After 48 h, the cytotoxicity was more pronounced, as only 4% of cells treated with 1 mg/mL of DSC survived with a significant reduction of cell viability for all doses except for a 0.05 mg/mL dose (Figure 1b).

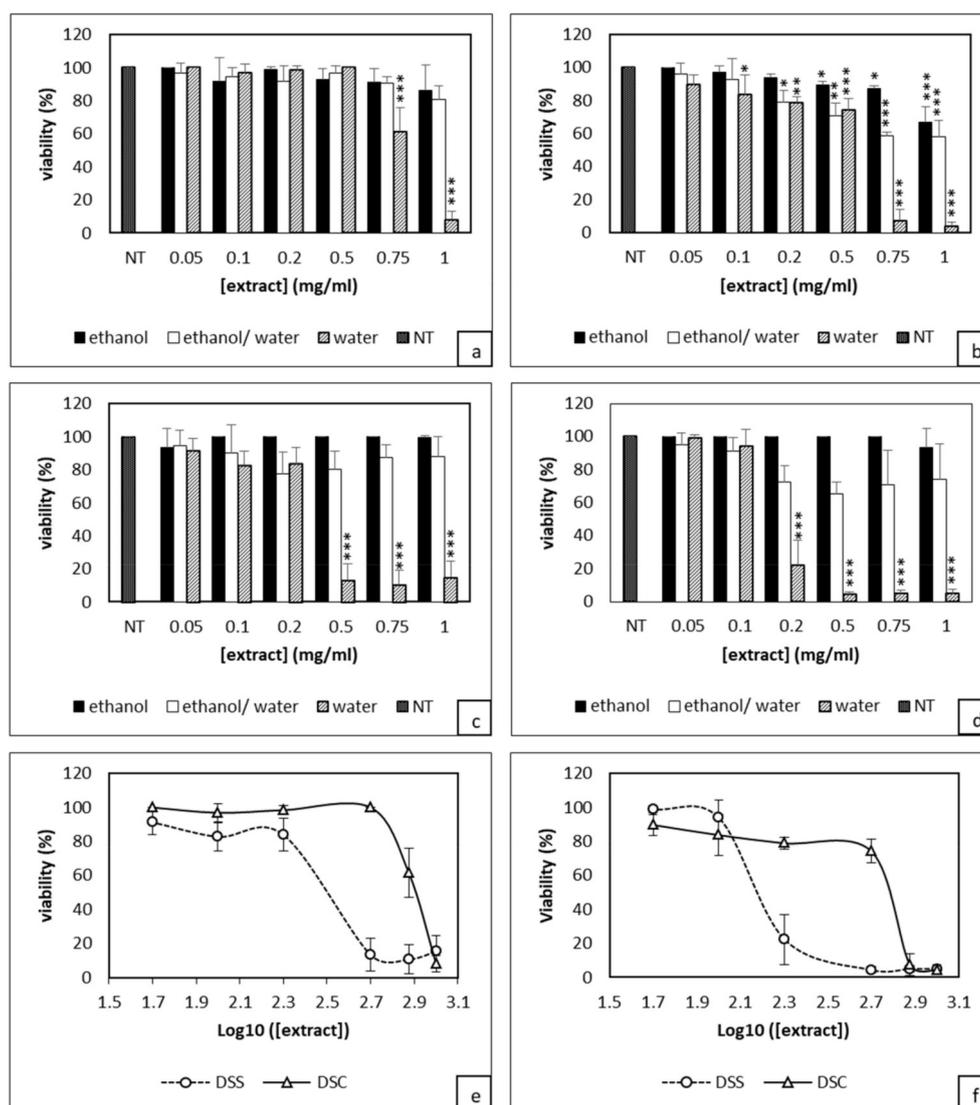


Figure 1. Evaluation of *Dunaliella* extracts from normal (DSC) or stressed (DSS) conditions effect on 4T1 cells viability through XTT assay. Cells were treated with either DSC (a,b) or DSS (c,d) for either 24h (a,c) or 48h (b,d). Estimation of IC₅₀ values after 24h (e) and 48 h (f) of DSC and DSS treatments. Results shown are mean values ± standard deviation of three independent experiments (***p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05) according to One-way ANOVA using XLSTAT.

In contrast, ethanolic and hydroalcoholic extracts showed no significant effect after 24 h treatment. The ethanolic extract used at 1 mg/mL only became cytotoxic after 48 h with 40% of dead cells compared to controls (Figure 1b). Similar data were obtained with both 1 and 0.75 mg/mL of DSC hydroalcoholic extract. However, for cells treated with 0.5 and 0.2 mg/mL, there was only 20% of cytotoxicity compared to control cells. Concerning DSS-based experiments, ethanolic and hydroalcoholic extracts did not show any antiproliferative activity after either 24 or 48 h treatment. By contrast, the aqueous extract exhibited a very high cytotoxicity. At 0.5 mg/mL, almost 90% cytotoxicity was observed after 24 h (Figure 1c). As for DSC, this effect was further enhanced after 48 h treatment; DSS at 0.2 mg/mL became cytotoxic with only 22% of viable cells; for higher concentrations, only 4% of live cells were left (Figure 1d). As observed for DSC, cell treatment with 0.1 and 0.05 mg/mL of DSS did not result in any significant effect on the cell viability. Overall, the above data indicate that aqueous extract was superior to the ethanolic and hydroalcoholic extracts. DSC and DSS aqueous extracts act in a dose-dependent-manner. After 24 h treatment, the IC_{50} values of DSC and DSS aqueous extracts were 0.804 ± 0.046 mg/mL and 0.317 ± 0.026 mg/mL, respectively (Figure 1e). After 48 h treatment, these concentrations decreased to 0.608 ± 0.008 mg/mL and 0.149 ± 0.008 mg/mL (Figure 1f). Next, we performed a Crystal Violet staining known to bind exclusively to proteins and DNA of viable cells remaining attached to the plate [38]. Crystal Violet staining nicely demonstrated the superiority of DSS over DSC extracts (Figure S1). Overall, this first set of data show that aqueous extract of DSS has a cytotoxic activity which is dose and time dependent.

2.2. Deciphering DSS Cytotoxicity Mechanism

Next, we performed different experiments to assess through which mechanism DSS might act to induce the cytotoxicity towards 4T1 cells.

2.2.1. Qualitative Evaluation by TUNEL Assay

We first performed a TUNEL assay on DSS- and DSC-treated cells to qualitatively detect the presence of apoptotic cells. As shown in Figure 2, intense brown staining of cell nuclei was observed in 4T1 cells treated with 0.5 mg/mL DSS extract as soon as 18 h post-incubation.

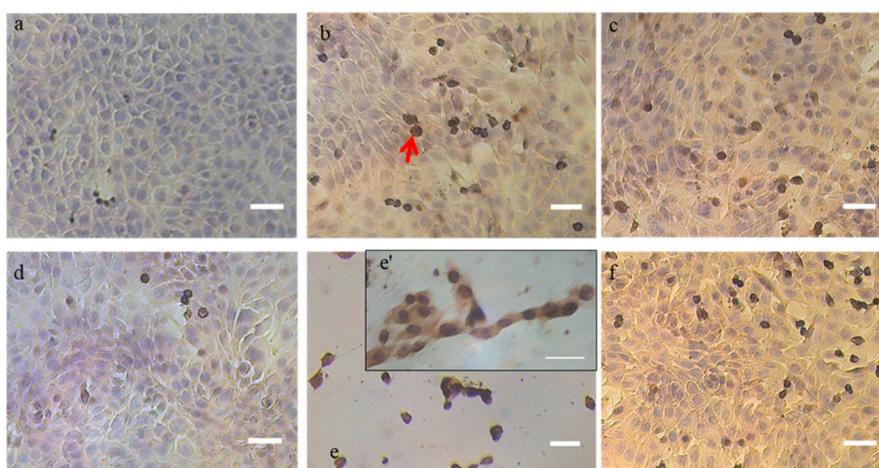


Figure 2. Detection of apoptotic cells in situ by DNA fragmentation through TUNEL assay. The apoptotic cells are stained dark brown (red arrows) after counterstaining with hematoxylin. (a) untreated cells at 10X magnification, (b) DNase-treated cells for 20 min at 10U (positive control) at 10X magnification, (c) 0.5 mg/mL DSS treated cells after 18 h at 10X magnification, (d) 0.5 mg/mL DSC-treated cells after 18 h at 10X magnification, (e and e') 0.5 mg/mL DSS treated cells after 24 h observed at 10X and 40X magnification, respectively, (f) 0.5 mg/mL DSC-treated cells after 24 h at 10X magnification. Note: Scale bar = 50 μ m

The apoptotic effect of the DSS extract on the 4T1 cells was even more pronounced 24 h post incubation and was similar to DNase-treated cells. Less nuclei were stained in cells treated with DSC extract compared to DSS treatment at these early and late time points albeit more than for non-treated cells.

2.2.2. Qualitative evaluation by Western blot

We investigated the activation of caspase-3 proteins and the deactivation of PARP-1 involved in apoptosis mechanism in cells treated with 0.5 mg/mL DSC and DSS. Western blots, shown in Figure 3, reveal that caspase-3 was activated in cells treated with 0.5 mg/mL DSS extract. The active form of caspase-3 was detected from 6 h and it increased over time. Concomitantly, the cleaved form of PARP-1 was produced starting at 6 h and it rose over time. At 12 h post-treatment, the cleaved PARP-1 form was detected majorly. Cell treatment with 0.5 mg/mL of the DSC extract during 12 h did not lead to any induction of the apoptotic effects of these extracts. Taken together, this blots data confirms again the superiority of DSS over DSC.

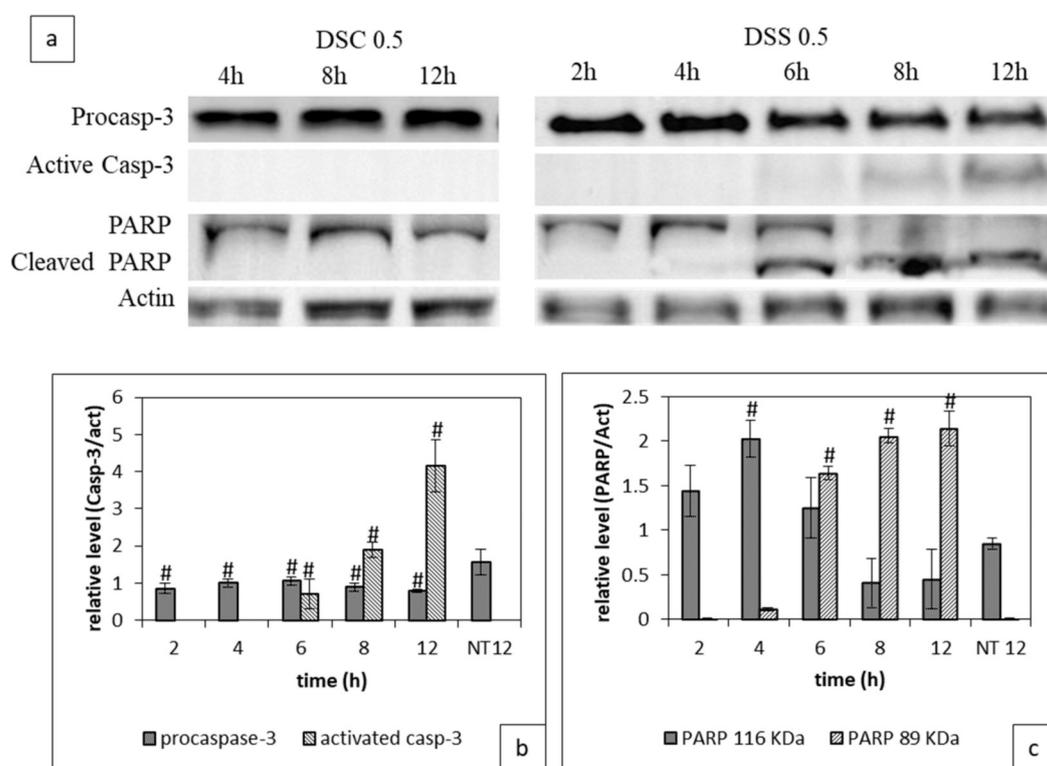


Figure 3. Impact of DSC and DSS treatment on Caspase-3 activation and PARP-1 cleavage. Cells were treated with either DSC or DSS at 0.5 mg/mL during 2 to 12 h before processing for western blot analysis as described in Material and Methods. (a) PARP-1 uncleaved and cleaved form, pro and active Caspase-3 immunoblotting (b) Full-length western blot images giving details are available in Figure S2; Quantitative evaluation of the expression of pro and caspase-3, (c) Quantitative evaluation of the expression of PARP-1 at 116 and 89 KDa. Results shown are mean values \pm standard deviation of three independent assays through Image J ($\# p < 0.05$) according to one-way ANOVA using Origin 8.

2.3. Tumor Growth Inhibition by *Dunaliella* Extracts

Last, we sought to confirm the in vitro results by investigating whether aqueous *Dunaliella* extract could effectively suppress growth tumor in vivo. 4T1 breast mammary cells were orthotopically implanted into the mammary glands of Balb/c mice. Ten days post-implantation, mice were treated by intra-tumor injection of either DSC or DSS aqueous extract at the dosage of 5 mg/kg. As illustrated in Figure 4, mice treated with DSC extract and PBS have similar tumor growth trends. By contrast,

DSS aqueous extract treatment significantly reduced the tumor size compared to control mice ($p < 0.5$). The relative tumor volume (RTV) was two times lower than those of control mice. There was also a delay in the development of the tumor over time, which allowed us to extend the treatment by 3 days before animal sacrifice in this group. It worth noting that none of the mice did lost weight during this follow-up period (Figure S3).

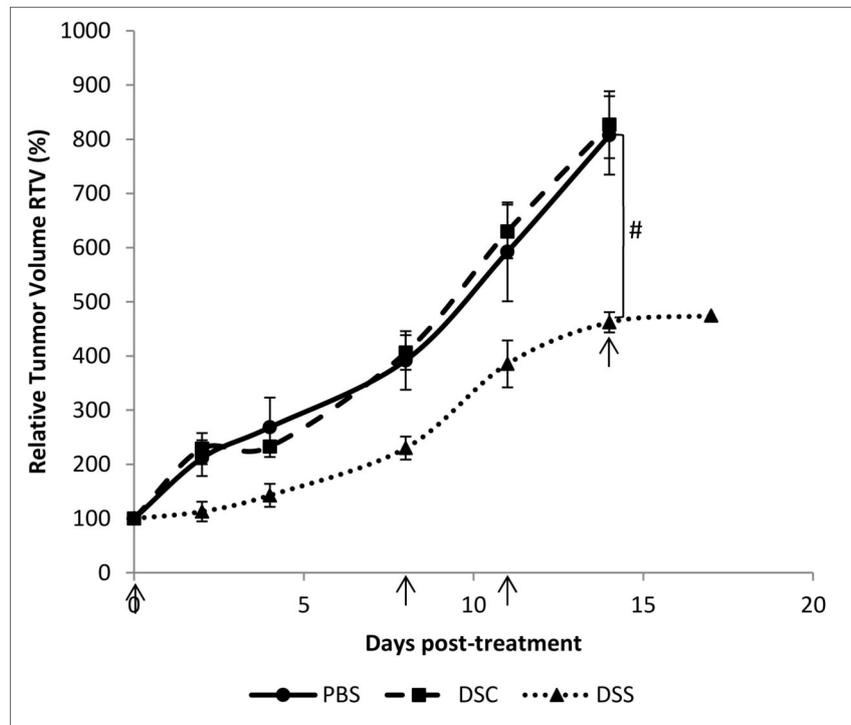


Figure 4. Relative tumor volume of mice bearing 4T1 cells orthotopically implanted and treated with DSC and DSS aqueous extracts at 5 mg/kg (10, 18, 21 and 24 days post-implantation). Results shown are mean values \pm standard error of the mean ($\# p < 0.05$) according to one-way ANOVA using Origin 8.

2.4. Assessment of Immune Activation

This last decade, it has been demonstrated that cancer development is associated with immune system modulation *via* the tumor immunosuppressive microenvironment [39]. We wanted first to check whether aqueous DSS and DSC extract treatments could trigger an immunostimulatory activity by evaluating the types of tumor-infiltrating immune cells. Figure 5 shows that compared to tumors of mice treated with PBS or DSC extract, those of mice treated with DSS aqueous extract contained a higher infiltration of NK (NK1,1⁺) cells, more activated T cells (CD3⁺, CD8⁺, CD107⁺) and plasmacytoid dendritic cells (CD11c⁺int CD80⁺) against a decrease in myeloid derived suppressor cells (MDSC: CD11c⁺MHCII⁺Gr1⁺).

Second, we investigated how could be modulated the expression of *arginase-1* (*Arg-1*), *cyclooxygenase 2* (*COX-2*) and *nitric oxide synthase-2* (*NOS-2*) genes in DSS-treated tumors compared to non-treated ones. As shown in Figure 6, there was a transcriptional modulation of *Arg-1*, *NOS-2* and *COX-2* expression in treated tumors. A small but significant decrease of *Arg-1* expression was found in DSS-treated tumors compared to DSC and PBS-treated ones. The expression of *NOS-2* and *COX-2* couple was diminished significantly after DSS treatment. By contrast, their expression was significantly increased in DSC-treated tumors with no modulation of *Arg-1*. Those data are in line with those found in Figure 4 and confirm that DSS extract holds a potential anti-tumor activity by acting on immune cells and on the metabolism.

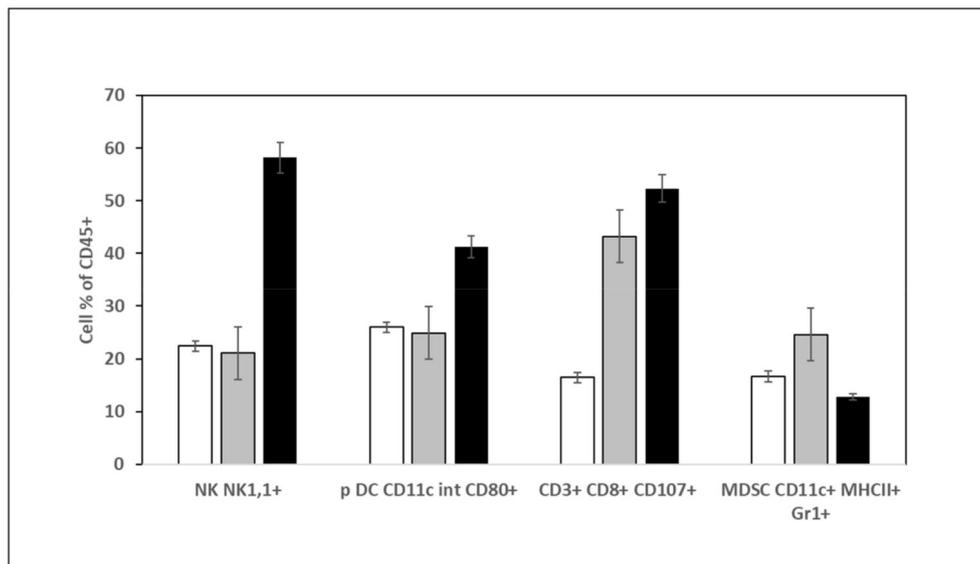


Figure 5. Quantification of immune cells in the tumor of mice treated either with PBS, DSC or DSS at 5 mg/kg. Cells extracted from tumors were processed for immunophenotyping and analyzed by flow cytometry. White: Non-treated mice; grey: DSS treated mice; black: DSC treated mice.

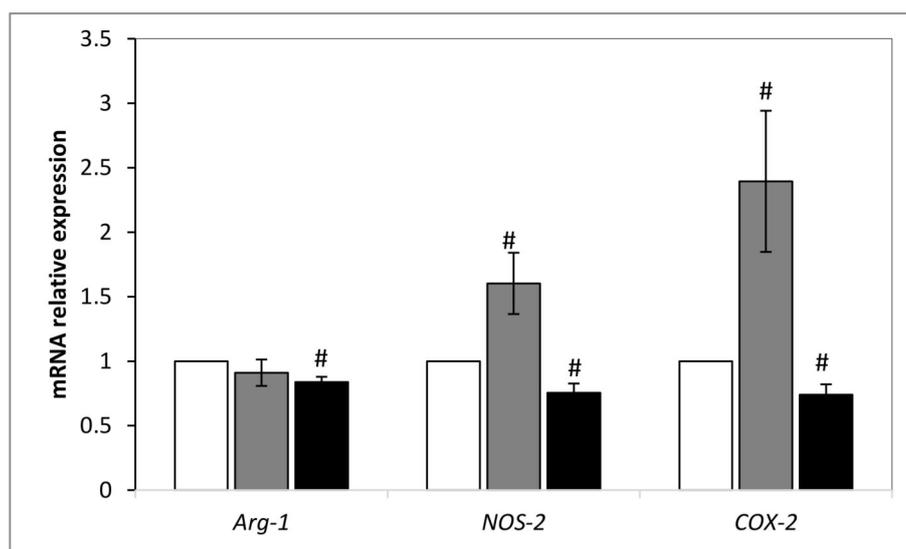


Figure 6. Relative expression level of *Arg-1*, *NOS-2* and *COX-2* after DSC and DSS treatment by normalization against *GAPDH* gene. Results shown are mean values \pm standard error of the mean where (# $p < 0.05$) indicates a significant difference between gene expressions among mice treated with PBS and those extract-treated, according to the one-way ANOVA test followed by Tukey test using Origin 8. White: Non-treated mice; grey: DSS treated mice; black: DSC treated mice.

3. Discussion

This study was performed with an isolated *Dunaliella* sp. strain from the Tunisian coast identified to have 97% of similarity with *Dunaliella salina* [40]. *Dunaliella salina* is known for its high production of antioxidants, mainly β -carotene, which leads to its anticancer activity [4,5,12–17]. *D. salina* is also able to produce hydrophilic compounds such as flavonoids, tannins and alkaloids [41]. We looked for the possible anti-cancer activity of our strain cultivated under standard or non-stressed condition (DSC) or a stressed condition (DSS) in order to enhance carotenoids and antioxidant productivity as reported previously [14]. Flavonoids and phenolic compound levels can be also increased in stressed conditions

of nitrogen deficiency and UV B irradiance, in addition to the production of antioxidant enzymes and glutathione [42]. DSC and DSS were extracted by maceration either in ethanol, ethanol/water (V/V) or in distilled water followed by a sonication step. Extraction in water led to the most active extracts against murine breast carcinoma 4T1 cells suggesting that compounds responsible for this cytotoxicity were hydrophilic. The fact that DSS extract was almost four times more toxic than DSC one could be explained either by an over accumulation of those compounds under stressed conditions and a better lysis of stressed over non-stressed cells by the sonication step. Indeed, *Dunaliella* lacks a rigid cell wall and can be lysed by osmotic shock [43]. It is interesting that aqueous extraction bore higher biological anti-cancer activity compared to other solvents. Water has been widely used as a solvent for plants and other green microalgae extractions, thanks to its "safe" nature. The extract obtained is easy for freeze-drying and thereafter soluble in aqueous solution as culture medium. Thus, it avoids any residual cytotoxic effect of solvents and the need of solubilising the extract in DMSO as for ethanolic extract.

An aqueous extract of *Chlorella vulgaris*, which is a green microalga has been reported to have a significant anti-proliferation activity towards Ehrlich ascites carcinoma (EACC) cells and human hepatocarcinoma HepG2 cells, respectively [44]. Sonicated aqueous extract of a mixture of microalgae (not identified specifically) have been shown to be effective against the proliferation of different types of cancer cells from lung (A549, H460), prostate (PC3, DU145), stomach (N87), breast (MCF7), pancreas (BxPC3) and bone (MNNG) [45]. The present study reports for the first time that *Dunaliella* aqueous holds an efficient antitumor activity against breast cancer cells growth both in vitro and in vivo by intratumoral injection. Previous reports related on the use of *D. salina* were performed with ethanolic extract or the whole powder with an oral administration requiring at least more than two weeks of treatments with high doses from 300 mg/kg up to 1000 mg/kg [2,4,5].

The ethanolic and hydroalcoholic extracts of DSC were found to be active, which is in correlation with previous cellular studies performed in A549 lung cancer cells [12], A431 cutaneous carcinoma cells [14], HL-60 and MV-4-11 leukemia cells [13]. In contrast, DSS ethanolic extract was not efficient, suggesting that the procedure led to the extraction of some compounds that may stimulate cell growth. DSS ethanolic extract likely contained high amount of β -carotene, tocopherol and ascorbic acid compared to DSC as reported by [14]. Paolini et al., have shown that β -carotene is rather associated with a significant increase in the incidence of lung cancer, cardiovascular disease and mortality in smokers and asbestos workers [46,47]. This property depends also from the ratio of the 9-*cis*/all-*trans* β -carotene form and greater this ratio is, the better the antioxidant and antiproliferative power of β -carotene will be [48].

In this study, we decided to go deeper in the investigation of the cell death mechanism induced by DSS extract. TUNEL assay labelling the 3'OH ends of apoptotic nucleus showed an intense brown staining of nucleus of 4T1 cells treated with DSS extract, which means that the extract triggers cell death by apoptosis. This result was confirmed by caspase-3 activation and PARP-1 cleavage [49]. Caspase-3 activation and PARP-1 deactivation were found in cells treated with DSS extract in 12 h treatment with DSS but not with DSC. This difference is in accordance with the cytotoxicity assay. Activated caspase-3 cleaves PARP-1 into two fragments of 89 and 24 kDa. The fragment of 24 kDa binds to the damaged DNA irreversibly through two zinc finger motifs and acts as a *trans*-dominant inhibitor of active PARP-1 and other DNA repairing enzymes [27]. When cells have a severe damage of DNA, PARP-1 activity must be amplified which results in an increase of the reparative form of PARP-1 (un-cleaved form) as we observed after 4 h treatment with DSS. If this activity is not controlled, it leads to a passive necrotic cell death resulting from prolonged ATP depletion [27]. In this study, the reparative process was blocked by caspase activity that cleaves PARP-1 as observed after 6 h of treatment. Cells were then induced to apoptotic death. It is worth to note that for TNBC, DNA damage of cancer cells was observed during chemotherapy and inhibiting PARP-1 is important to block DNA repair mechanisms [21].

Data obtained from in vivo experiments confirmed the growth-inhibitory effect of DSS aqueous extract on murine breast carcinoma cells. We decided to treat the mice by intra-tumoral injection instead of oral administration that requires a high dosage extract with daily intake, rather difficult to master, as reported in previous studies [2–5]. The treatment with 5 mg/kg of DSS extract led to a delay of tumor growth rate and a significant reduction of tumor volume without affecting the weight of mice. Knowing the impact of the immune system in cancer growth and the possible adjuvant effect of phytochemicals, we conducted an analysis of immune cells amount inside tumors. It was proven previously that treatment of rat hepatocellular carcinoma with β -carotene inhibited significantly tumor growth, enhanced NK cells infiltration as well as production of IL-2 and TNF- α , resulting in an improved clinical outcomes as attested by significant decrease of blood alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase activities [50]. Moreover, carotenoids influence immune function by regulating membrane fluidity and gap-junctional communication [51]. Finally, flavonoids also have anti-proliferative effects on cancer cells through suppression of the PI3k/Akt/mTOR pathway and activation of T CD4+ [52]. In our study, we show for the first time that DSS extract treatment could result in an increase (3-fold) of NK recruitment inside the tumors compared to non-treated and DSC treated tumors. The major recruited cells were NK cells, which are part of the innate immunity and having a crucial role in immunosurveillance mechanism. Those cells induce a cell death by triggering apoptosis independent or dependent caspase using two mechanisms that are the exocytosis of cytotoxic granules containing perforin and granzyme or the induction of apoptosis *via* death receptors [50]. NK can be activated by natural compounds such as vitamins A, B, C, D, and E, lectins, polysaccharides, and other phytochemicals [50], therefore, microalgae extracts contain various compounds that could likely activate NK cells. A similar effect has been reported previously with WEHI-3-induced leukemic mice treated with oral administration of 922 mg/kg of *D. salina* during 2 weeks [5]. We observed that pDC number was almost doubled in DSS-treated tumors compared to non-treated and DSC-treated tumors. Those cells could play a role in immunosurveillance of tumors. Indeed, the activation of those cells could induce a large production amount of type I interferon (IFN) [51]. In fact, IFNs can induce apoptosis of cancer cells by direct cytotoxic effects or *via* enhancement of death-inducing molecules [52]. Our data highlight as well that the number of CD8⁺ T cytotoxic T lymphocytes, another type of key cells in the antitumor response, was also enhanced (~3-fold). Those cells belong to the adaptive immunity system and are activated by NK cells [28]. The rise in CD8⁺ T cells infiltration was seen to be associated with a good prognostic among breast cancer patients [53]. Recently, an interesting study reported that activated pDCs were able to kill 4T1 breast cancer cells through TRAIL and granzyme B death-initiating molecules [54]. Authors have established that pDC were the initiator of the sequential activation of NK and CD8⁺ T cells; both increased upon DSS treatment. Our results shows also a decrease in number of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the tumor, which are immature myeloid cells with potent immunosuppressive potential [55].

Since metabolic changes occur during cancer development, we checked the modulation of *Arg-1*, *NOS-2* and *COX-2* expression, three key enzymes involved in tumorigenesis. Our data reveal a reduced expression of *Arg-1* and *NOS-2* in tumors treated with DSS extract. This immunosuppressive enzyme is produced both by cancer cells and polymorphonuclear neutrophils and M2 macrophage subtype. It transforms L-arginine to L-ornithine and urea [56]. The depletion of L-arginine from the tumor microenvironment inhibits the re-expression of the CD3 ζ chain [57] and induces the down-regulation of T cell receptor making T cells anergic [55]. L-Arginine is also catabolized by iNOS (or NOS-2) that produces nitric oxide (NO) leading as well to an induction of T cell anergy [55]. Therefore, the transcriptional level decrease of these two genes influences positively the function of T cells. The inhibition of iNOS has been reported to significantly reduce tumor growth, lung metastases and tumor initiation [58]. Another predictive biomarker of immune inhibition is COX-2. It is involved in the transformation of arachidonic acid to prostaglandin. Its activity can suppress DC, NK, T cells, type-1 immunity and promotes type-2 immunity [59]. Therefore, the decrease of its expression in DSS-treated tumors is coherent with the enhancement of anti-tumor immunity. Note that the enzymatic activity of

COX-2 has been found to be reduced in DMBA induced mammary cancer cells treated by *D.salina* powder [4]. Nassar et al. have shown that high expression of COX-2 in breast carcinoma was positively correlated with tumor size and tumor grade [60]. It is important to point out that the crosstalk between NOS-2 and COX-2 occurred *via* their respective key products NO and PGE-2. Simultaneous inhibition of those two genes by aminoguanidine and aspirin/ indomethacin resulted in a significant reduction of the growth of a xenograft murine breast cancer model [61].

The findings of this study have to be seen in light of some limitations. The activity of the extract on normal cells would be interesting to assess, but it deserves more complete work that is beyond the topic of our current study. Moreover, as we intentionally choose the intratumoral route of administration to concentrate the extracts in the targeted tissues; it is unlikely that the extract would diffuse outside of the tumour site. This administration route allows a maximal concentration of the extract in the targeted tumour tissues and, consequently, a maximal anti-tumoral effect. Such local intra-tumor injection is widely used for targeted therapy as immunotherapy [62,63]. Despite these advantages, there is some restriction because only accessible sites of sufficient size can be injected [64].

4. Materials and Methods

4.1. Cancer Cell Line Culture

4T1 mouse mammary tumor cells (ATCC[®] CRL-2539[™], Rockville, MD, USA), were grown as monolayers, at 37 °C in 5% CO₂–95% air humidified atmosphere. They were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (*v/v*), penicillin 100 U.mL⁻¹ and streptomycin 100 µg.mL⁻¹. The medium was purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

4.2. Microalgae Culture

Dunaliella sp. having 97% of similarity with *D. salina*, *D. quartolecta* and *D. polymorpha* was isolated from the Sebkha of Sidi El Hani (Sousse, Tunisia) [40]. It was cultivated in F/2 medium based on artificial sea water (ASW). Cells were grown under unstressed (DSC) and stressed (DSS) conditions as previously optimized by Elleuch et al. [65].

4.3. Extracts Preparation

In order to extract various molecules from the lyophilized powder of the isolated strain, three extracts of different polarities were prepared according to a modified protocol of [66] with either in ethanol, water and ethanol/water (1/1, *V/V*). For ethanol-based extraction, 1 g of DSC or DSS freeze-dried microalgae, were added to 100 mL ethanol, ground until well homogenized and incubated for 2 h at 4 °C in darkness. For water extract, a sonication step for 15 min at 40 kHz was added, and then the mixture was centrifuged at 5000× *g* for 10 min at 4 °C. The extraction was repeated twice to recover the maximum amount of compound. Ethanol extract was concentrated by evaporation under a nitrogen flow to dryness in the dark while the water and ethanol/water extracts were freeze-drying. All dry extracts were stored at -20 °C until use.

4.4. Cytotoxicity Evaluation

A XTT kit (Cell Proliferation Kit II, Roche) from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) assay was performed to determine the cytotoxicity of the different extract prepared. This assay is based on the property of living cells to reduction of the yellow 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide tetrazolium salt (XTT) into a soluble derivative of brightly orange formazan by mitochondrial oxidoreductases enzymes, so the coloration intensity is directly correlated to the number of living cells.

In brief, approximately 1 × 10⁴ cells/well were seeded onto 96 wells plate. After 24 h, the medium was discarded and cells were treated for 24 and 48 h with fresh medium containing different

concentrations (from 0.05 mg to 1 mg/mL) of indicated extracts from DSC and DSS. Ethanolic and 50% hydroalcoholic dried extracts were previously dissolved in culture medium containing 2% DMSO. Note that since ethanolic and hydroalcoholic extracts were dissolved in 2% DMSO, control cells were treated with the medium containing the corresponding concentration of DMSO without the extract. For aqueous extracts were diluted directly in the medium, controls cells were treated with medium without the extract.

After incubation, the medium was discarded, cells were washed twice with PBS and 100 μ L of XTT mixture was added and incubated for 3h. The absorbance was measured for each well at wavelength 450 nm and 650 nm using a multilabel microplate reader Victor spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

The percentage of viability was calculated according to the manufacturer's instructions. As negative controls for aqueous and ethanolic/hydroethanolic extracts conditions, cells were incubated in culture medium (RPMI) containing 2% DMSO. The absorbance of the medium alone is also considered as the blank for the test. Each condition was tested in triplicate.

4.5. Cristal Violet Assay

4T1 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 24 well plates one day before the experiments. Cells were then incubated in presence of different extracts at indicated concentration. After 48 h of treatment, cells were washed twice with PBS and fixed with cold methanol for 10 min. Fixed cells were washed and stained with Crystal Violet (0.5% w/v prepared in 25% methanol) for 10 min at room temperature. The wells were washed until complete discoloration of the supernatant.

4.6. Tunel Assay

TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) is an adequate assay for the detection of apoptotic cells as it labels the 3' OH ends of fragmented DNA in situ on dark brown nuclei by peroxidase staining. The TUNEL assay was conducted using the DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) as described in the manufacturer's instructions with minor modifications of directly staining cells in 48 well plates. Stained sections were analyzed with a light microscope (Nikon Diaphot 300).

Positive control cells were generated by treating fixed cells with DNase I (Sigma) at 10U for 20 min, whereas negative controls are those without terminal TdT enzyme in the TUNEL reaction mixture.

Briefly, 5×10^4 cells/well were seeded onto 48 well plates and cultured at 37 °C for 24 h. After treatment with DSS and DSC at 0.5 and 0.2 mg/mL for 24 h, cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT). Cells were permeabilized with 0.02% Triton X-100 for 5 min at RT. After calibration with equilibration buffer, cells were treated with rTdT Reaction Mix for 1h at 37 °C in a humidified chamber. SSC buffer 1X was applied for 15 min before quenching endogenous peroxidase with 0.3% H₂O₂. Cells were incubated with streptavidin HRP for 30 min at RT. The color development was done with DAB substrate, DAB chromogen and hydrogen peroxide. Finally, cells were washed with deionized water and counterstained with hematoxylin before microscopy analysis (Nikon Diaphot 300).

4.7. Western Blot Experiments

To investigate the cell death pathway, total proteins were extracted after cells treatment for 2, 4, 6, 8 and 12 h. Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed using radioimmune precipitation assay (RIPA) buffer containing 1% of protease inhibitor cocktail and 1% of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) by vortexing the lysate for 3 min. Proteins were recovered in the pellet after centrifugation at 12500 rpm for 10 min at 4 °C. Their concentration was determined using BCA assay (Protein Assay Kit (Interchim, Montlucon, France) and 20 μ g of total proteins were resolved by gel electrophoresis under denaturing conditions SDS-PAGE. Depending on the molecular weight of the proteins to be detected, two types of gel were prepared: the first one at 10% for PARP-1 (116 and 89 KDa) and caspase-9 (37 KDa) and the second one at 14% for caspase-3 (17 KDa). The proteins were heated for

10 min at 95 °C in the presence of Laemmli buffer as a denaturant before loading in the wells of the gels. The migration was performed for 3 h at 150 V and 100 V for the first gel and the second, respectively. Upon migration, the proteins are electrotransferred on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane by Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (15 min, 25 V). The membranes were first treated with 5% non-fat dry milk in TBST (Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20) for 1 h at RT. Then, they were incubated overnight with the indicated primary antibodies at 4 °C: β -actin (ab1801; 1:5000), PARP-1 (# 9542), caspase-3 (# 6992) caspase-9 (# 9504). The last three antibodies were used at a concentration of 1: 1000 as recommended by Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA. <http://www.cellsignal.com>). For the detection of these primary antibodies, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with the anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Enzo Life Sciences, Inc). After each incubation, membranes were washed three times for 10 min with TBST. The protein bands were visualized using ECL chemiluminescence (Bio-Rad) and revealed to the Syngene Pxi (Ozyme, Saint Cyr l'Ecole, France) gel imager controlled by the GeneSys acquisition software. The protein bands were quantified using image software j. bands intensity was normalized to β -actin.

4.8. In vivo Experiments

For animal experiments, mice housing was performed in our animal facility (accreditation number D-45-234-12, Chantal Pichon) according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (Law 87848). A local ethical committee (Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale, Campus d'Orléans, France, French Registration CECCO 03) approved experimental procedures; which did the French Ministry of Agriculture validate according to the document file APAFiS #1964.

A total of 15 females BALB/c mice of 8 weeks of age and about 20 g in weight, were purchased from Elevage Janvier (Le Genest St Isle, France). The mice were housed in the CBM animal facility, at 22 °C, a dual phase (12/12 h) in a humidity and temperature-controlled room under standard laboratory conditions. Mice were divided into 5 groups of 5 mice per cage and were acclimated and quarantined for a week prior to experimentation. This latter was carried out under the accreditation of the CBM laboratory (APAFiS #1964, C. Pichon). The mice were depilated 2 days before tumor implantation. After anaesthesia with isoflurane, the mice received 5×10^5 of 4T1 cells in a total volume of 50 μ L by subcutaneous injection into the mammary gland. 10 days after implantation and the development of a primary tumor (palpable aspect), we started the treatment by intra-tumor injection of DSC and DSS aqueous extracts at 5 mg/kg of mouse. As the extracts were diluted in PBS, the negative control group received 50 μ L of PBS per injection. Subsequently, treatments were performed on days 10, 18, 21 and 24 post-implantation. Tumor growth was monitored by measuring tumor volume using a calliper. Tumor volumes were normalized respectively to the volume of the tumor at day 0 of treatment through Equation (1) expressing the relative tumor volume (RTV) [67]. Mice were also daily observed individually and weighed during the experiment. The animals were sacrificed by cervical decapitation at the end of the protocol:

$$RTV = \frac{\text{Tumor Volume at day } X}{\text{Tumor Volume at day } 0} \times 100 \quad (1)$$

4.9. Immune Cell Identification

Implanted tumors were harvested after 15 days of treatment for analysis of immune cells. Tumors were suspended in PBS and cut into small pieces of 3–4 mm then centrifuged at 350xg for 10 min. The pellets were subsequently suspended in collagenase I (Gibco: ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) at a concentration of 1 mg/mL in presence of 3 mM CaCl₂ and incubated for 1 h at 37 °C with agitation. The obtained suspension was filtered, washed with PBS and cells were suspended in fresh PBS. Cells were incubated for 1 h at RT in the dark with labelled antibody listed in Table 1 which are used at a dilution of 1/100 in 1% BSA. Before cell flow cytometry analysis (Fortessa x 20,

Becton Dickinson Biosciences, Rungis, France), cells were filtered and suspended in PBS. Multicolor CompBeads (BD Biosciences, Rungis France) were used for the cytometer settings according to the manufacturer's instructions.

Table 1. List of antibodies used for immune cells identification.

Recognized Antigen	Fluorochrome	Clone	Reference BD Pharmingen
CD3	PerCP/Cy5.5	145-2C11	551163
CD8	BV510	341	742916
NK1.1	BV60	PK136	563220
CD11c	BV711	HL3	563048
MHCII	PE/Cy7	L243	335830
CD80	FITC	16-10A1	553768
CD107a	BV78	61D4B	564349
Gr-1	APC-Cy TM 7	RB6-8C5	557661

4.10. RNA Extraction and qPCR Analysis

Total RNA was extracted from harvested tumors by TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) after cutting tissue into small pieces. For better grinding of tissues, they were incubated for 10 min at -80 °C before being ground with Precellys 24 (Precellys, Bertin, France) using the following program: 5500 vibrations, 3 cycles of 30 s each. One µg of the obtained RNA_t was used for the synthesis of cDNA using the kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, MA, USA). qPCR was performed using TB GreenTM Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, Shiga, Japan) according to the manufacturer's protocol. Primers used are cited in the Table 2. For all experiments, we checked efficiency and specificity of primers. PCR reactions were run on StepOnePlusTM Real-Time PCR System. Fold changes were calculated through the equation given by [68] by normalization against *GAPDH* reference gene.

Table 2. Primers used for qPCR.

Genes (Mouse)	Primer Sequence (5' → 3')	Amplicon Size	References
<i>GAPDH</i>	TCTCCCTCACAAATTTCCATCCCAG GGGTGCAGCGAACTTTATTGATGG	–	[69]
<i>Arg-1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	185	
<i>NOS-2</i>	CCAAGCCCTCACCTACTTCC CTCTGAGGGCTGACACAAGG	127	[70]
<i>COX-2</i>	TGAGTACCGCAAACGCTTCT CTCCCAAAGATAGCATCTGG	169	

5. Conclusions

Data from this study confirm other studies reporting the anti-proliferative activity of *D. salina* extract. This report shows for the first time the potentiality that an aqueous extract of *D. salina* grown under stress conditions holds when delivered inside tumors at doses as low as 5 mg/kg. The immunomodulatory effect of *D. salina* is of importance and opens an avenue of the use of microalgae extract as an immune adjuvant for anti-breast cancer therapeutic strategies.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1719/s1>.

Author Contributions: All authors have read and agree to the published version of the manuscript. Conceptualization, F.E., S.A., I.F. and C.P.; cell culture, P.B., and F.E., animal studies, P.B., and F.E., transcriptional analysis, F.E., M.B.; immune cells analysis, F.E., F.P., C.P., writing-original draft preparation, F.E.; writing-review and editing, F.I., C.P.; supervision, S.A., I.F. and C.P.; project administration, S.A., I.F. and C.P.; funding acquisition, S.A., I.F. and C.P.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgments: Authors are grateful to Eiffel scholarship program of excellence and CNRS for the PICS exchange program obtained between France and Tunisia. We thank Rudy Clemençon for his involvement in animal experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

DSS	<i>Dunaliella</i> sp. cultured under stressed conditions
DSC	<i>Dunaliella</i> sp. cultured under unstressed (control) conditions
TNBC	Triple negative breast cancer
PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymerase-1
<i>Arg-1</i>	<i>Arginase-1</i>
<i>NOS-2</i>	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
<i>COX-2</i>	<i>CycloOxygenase-2</i>
GAPDH	GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
DMBA	7,12-Dimethylbenz(a)anthracene
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
DBD	DNA binding domain
AMD	Auto-modification domain
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
TIL	Tumor-infiltrating lymphocyte
RTV	Relative tumor volume
DC	Dendritic cells
MHC	Major histocompatibility complex
PGE-2	ProstaGlandin E2
NO	Nitric oxide
ASW	Artificial sea water
DMSO	Dimethyl sulfoxide
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
RIPA	Radiolmmune Precipitation Assay
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
BCA	BiCinchoninic Acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris-buffered saline Tween
RT	Room temperature
PBS	Phosphate buffered saline
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein-1
AIF	Apoptosis-inducing factor
TNF	Tumor necrosis factor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

References

1. Ramos, A.A.; Polle, J.; Tran, D.; Cushman, J.C.; Jin, E.; Varela, J.C. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. As a model for abiotic stress tolerance: Genetic advances and future perspectives. *Algae* **2011**, *26*, 3. [[CrossRef](#)]
2. Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Balasubramanyam, D.; Rengasamy, R. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiol. Res.* **2007**, *162*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Abdel-Daim, M.M.; Farouk, S.M.; Madkour, F.F.; Azab, S.S. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2015**, *37*, 126–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Srinivasan, R.; Chaitanyakumar, A.; Mageswari, A.; Gomathi, A.; Kumar, J.G.S.P.; Jayasindu, M.; Bharath, G.; Shravan, J.S.; Gothandam, K.M. Oral administration of lyophilized *Dunaliella salina*, a carotenoid-rich marine alga, reduces tumor progression in mammary cancer induced rats. *Food Funct.* **2017**, *8*, 4517–4527. [CrossRef] [PubMed]
5. Chuang, W.C.; Ho, Y.C.; Liao, J.W.; Lu, F.J. *Dunaliella salina* exhibits an antileukemic immunity in a mouse model of WEHI-3 leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 11479–11487. [CrossRef] [PubMed]
6. Hu, C.-C.; Lin, J.-T.; Lu, F.-J.; Chou, F.-P.; Yang, D.-J. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chem.* **2008**, *109*, 439–446. [CrossRef]
7. Murthy, K.N.C.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Swamy, M.M.; Sowmya, P.R.; Ravishankar, G.A. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—A green microalga. *Life Sci.* **2005**, *76*, 1381–1390. [CrossRef] [PubMed]
8. Pane, G.; Cacciola, G.; Giacco, E.; Mariottini, G.L.; Coppo, E. Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6440–6452. [CrossRef]
9. Yang, D.-J.; Lin, J.-T.; Chen, Y.-C.; Liu, S.-C.; Lu, F.-J.; Chang, T.-J.; Wang, M.; Lin, H.-W.; Chang, Y.-Y. Suppressive effect of carotenoid extract of *Dunaliella salina* alga on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells via NF- κ B and JNK inactivation. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 607–615. [CrossRef]
10. Lin, H.-W.; Chen, Y.-C.; Liu, C.-W.; Yang, D.-J.; Chen, S.-Y.; Chang, T.-J.; Chang, Y.-Y. Regulation of virus-induced inflammatory response by *Dunaliella salina* alga extract in macrophages. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *71*, 159–165. [CrossRef]
11. Chou, P.Y.; Huang, G.J.; Cheng, H.C.; Wu, C.H.; Chien, Y.C.; Chen, J.S.; Huang, M.H.; Hsu, K.J.; Sheu, M.J. Analgesic And Anti-Inflammatory Activities Of An Ethanol Extract Of *Dunaliella Salina* Teod. (Chlorophyceae). *J. Food Biochem.* **2010**, *34*, 1288–1302. [CrossRef]
12. Sheu, M.-J.; Huang, G.-J.; Wu, C.-H.; Chen, J.-S.; Chang, H.-Y.; Chang, S.-J.; Chung, J.-G. Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Vivo* **2008**, *22*, 369–378.
13. Bechelli, J.; Coppage, M.; Rosell, K.; Liesveld, J. Cytotoxicity of Algae Extracts on Normal and Malignant Cells. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/lrt/2011/373519/> (accessed on 1 July 2018).
14. Emtyajoo, M.; Moghadasi, Z.; Rabbani, M.; Emtyajoo, M.; Samadi, S.; Mossaffa, N. Anticancer effect of *Dunaliella salina* under stress and normal conditions against skin carcinoma cell line A431 in vitro. *Iran. J. Fish. Sci.* **2012**, *11*, 283–293.
15. Jayappriyan, K.R.; Rajkumar, R.; Venkatakrisnan, V.; Nagaraj, S.; Rengasamy, R. In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomed. Prev. Nutr.* **2013**, *3*, 99–105. [CrossRef]
16. Olmos, J.; Gómez, R.; Rubio, V.P. Apoptosis Comparison Effects Between Synthetic and Natural β -Carotene from *Dunaliella salina* on MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2015**, *7*, 51–56.
17. Chiu, H.-F.; Liao, J.-Y.; Lu, Y.-Y.; Han, Y.-C.; Shen, Y.-C.; Venkatakrisnan, K.; Golovinskaia, O.; Wang, C.-K. Anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic effects of *Dunaliella salina* on human KB oral carcinoma cells. *J. Food Biochem.* **2017**, *41*, e12349. [CrossRef]
18. Worldwide Cancer Data. Available online: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data> (accessed on 3 April 2019).
19. Hon, J.D.C.; Singh, B.; Sahin, A.; Du, G.; Wang, J.; Wang, V.Y.; Deng, F.-M.; Zhang, D.Y.; Monaco, M.E.; Lee, P. Breast cancer molecular subtypes: From TNBC to QNBC. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 1864–1872.
20. Podo, F.; Buydens, L.M.C.; Degani, H.; Hilhorst, R.; Klipp, E.; Gribbestad, I.S.; Van Huffel, S.; WM van Laarhoven, H.; Luts, J.; Monleon, D.; et al. Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives. *Mol. Oncol.* **2010**, *4*, 209–229. [CrossRef]
21. Foulkes, W.D.; Smith, I.E.; Reis-Filho, J.S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1938–1948. [CrossRef]
22. Keung, M.Y.T.; Wu, Y.; Vadgama, J.V. PARP Inhibitors as a Therapeutic Agent for Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancers. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 435. [CrossRef]
23. Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1016–1036. [PubMed]

24. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Candé, C.; Cecconi, F.; Dessen, P.; Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): Key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell. Sci.* **2002**, *115*, 4727–4734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Morales, J.C.; Li, L.; Fattah, F.J.; Dong, Y.; Bey, E.A.; Patel, M.; Gao, J.; Boothman, D.A. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2014**, *24*, 15–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chaitanya, G.V.; Alexander, J.S.; Babu, P.P. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal* **2010**, *8*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Siddiqui, A.; Puvvada, A. Immuno Defense Mechanism against Tumors. *J. Cancer Sci. Ther.* **2011**, *3*. [[CrossRef](#)]
29. Dietrich, P.Y.; Walker, P.R. Échappement et tolérance des tumeurs à l'apoptose. *Tumeur Toler. Immune Escape Apoptosis.* **2000**, *16*, 492. [[CrossRef](#)]
30. Loi, S.; Drubay, D.; Adams, S.; Pruneri, G.; Francis, P.A.; Lacroix-Triki, M.; Joensuu, H.; Dieci, M.V.; Badve, S.; Demaria, S.; et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 559–569. [[CrossRef](#)]
31. Miksch, R.C.; Schoenberg, M.B.; Weniger, M.; Bösch, F.; Ormanns, S.; Mayer, B.; Werner, J.; Bazhin, A.V.; D'Haese, J.G. Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Neutrophils on Survival of Patients with Upfront Resection of Pancreatic Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 39. [[CrossRef](#)]
32. Lee, N.; Zakka, L.R.; Mihm, M.C.; Schatton, T. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology* **2016**, *48*, 177–187. [[CrossRef](#)]
33. Gooden, M.J.M.; de Bock, G.H.; Leffers, N.; Daemen, T.; Nijman, H.W. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: A systematic review with meta-analysis. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 93–103. [[CrossRef](#)]
34. Maimela, N.R.; Liu, S.; Zhang, Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Guillerey, C.; Huntington, N.D.; Smyth, M.J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 1025–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Galaine, J.; Borg, C.; Godet, Y.; Adotévi, O. Interest of Tumor-Specific CD4 T Helper 1 Cells for Therapeutic Anticancer Vaccine. *Vaccines* **2015**, *3*, 490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fridlender, Z.G.; Sun, J.; Kim, S.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Ling, L.; Worthen, G.S.; Albelda, S.M. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 183–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, 087379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Rabinovich, G.A.; Gabrilovich, D.; Sotomayor, E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 267–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ben Amor, F.; Elleuch, F.; Ben Hlima, H.; Garnier, M.; Saint-Jean, B.; Barkallah, M.; Pichon, C.; Abdelkafi, S.; Fendri, I. Proteomic Analysis of the Chlorophyta *Dunaliella* New Strain AL-1 Revealed Global Changes of Metabolism during High Carotenoid Production. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Widowati, I.; Zainuri, M.; Kusumaningrum, H.P.; Susilowati, R.; Yann, H.; Leignel, V.; Bourgougnon, N.; Mouget, J.-L. Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chunii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2017**, *55*, 012067. [[CrossRef](#)]
42. Al-Rashed, S.A.; Ibrahim, M.M.; El-Gaaly, G.A.; Al-Shehri, S.; Mostafa, A. Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. *Saudi J. Biol. Sci.* **2016**, *23*, 706–712. [[CrossRef](#)]
43. Davidi, L.; Shimoni, E.; Khozin-Goldberg, I.; Zamir, A.; Pick, U. Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 2139–2156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shanab, S.M.; Mostafa, S.S.; Shalaby, E.A.; Mahmoud, G.I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, 608–615. [[CrossRef](#)]

45. Somasekharan, S.P.; El-Naggar, A.; Sorensen, P.H.; Wang, Y.; Cheng, H. An Aqueous Extract of Marine Microalgae Exhibits Antimetastatic Activity through Preferential Killing of Suspended Cancer Cells and Anticolony Forming Activity. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/9730654/> (accessed on 5 September 2017).
46. Paolini, M.; Cantelli-Forti, G.; Perocco, P.; Pedulli, G.F.; Abdel-Rahman, S.Z.; Legator, M.S. Co-carcinogenic effect of β -carotene. *Nature* **1999**, *398*, 760–761. [[CrossRef](#)]
47. Paolini, M.; Abdel-Rahman, S.Z.; Sapone, A.; Pedulli, G.F.; Perocco, P.; Cantelli-Forti, G.; Legator, M.S. β -Carotene: A cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2003**, *543*, 195–200. [[CrossRef](#)]
48. Hosseini Tafreshi, A.; Shariati, M. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 14–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kleinsimon, S.; Kauczor, G.; Jaeger, S.; Eggert, A.; Seifert, G.; Delebinski, C. ViscumTT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. *BMC Complement Altern. Med.* **2017**, *17*. [[CrossRef](#)]
50. Grudzien, M.; Rapak, A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*. [[CrossRef](#)]
51. Soumelis, V.; Liu, Y.-J. From plasmacytoid to dendritic cell: Morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 2286–2292. [[CrossRef](#)]
52. Herzer, K.; Hofmann, T.G.; Teufel, A.; Schimanski, C.C.; Moehler, M.; Kanzler, S.; Schulze-Bergkamen, H.; Galle, P.R. IFN- α -Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Involves Promyelocytic Leukemia Protein and TRAIL Independently of p53. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 855–862. [[CrossRef](#)]
53. Mahmoud, S.; Lee, A.; Ellis, I.; Green, A. CD8+ T lymphocytes infiltrating breast cancer. *Oncoimmunology* **2012**, *1*, 364–365. [[CrossRef](#)]
54. Wu, J.; Li, S.; Yang, Y.; Zhu, S.; Zhang, M.; Qiao, Y.; Liu, Y.-J.; Chen, J. TLR-activated plasmacytoid dendritic cells inhibit breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2016**, *8*, 11708–11718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fleming, V.; Hu, X.; Weber, R.; Nagibin, V.; Groth, C.; Altevogt, P.; Utikal, J.; Umansky, V. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Munder, M. Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 638–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Noy, R.; Pollard, J.W. Tumor-associated macrophages: From mechanisms to therapy. *Immunity* **2014**, *41*, 49–61. [[CrossRef](#)]
58. Granados-Principal, S.; Liu, Y.; Guevara, M.L.; Blanco, E.; Choi, D.S.; Qian, W.; Patel, T.; Rodriguez, A.A.; Cusimano, J.; Weiss, H.L.; et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2015**, *17*, 25. [[CrossRef](#)]
59. Liu, B.; Qu, L.; Yan, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* **2015**, *15*, 106. [[CrossRef](#)]
60. Nassar, A.; Radhakrishnan, A.; Cabrero, I.; Cotsonis, G.; Cohen, C. COX-2 Expression in Invasive Breast Cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2007**, *15*, 255–259. [[CrossRef](#)]
61. Basudhar, D.; Glynn, S.A.; Greer, M.; Somasundaram, V.; No, J.H.; Scheiblin, D.A.; Garrido, P.; Heinz, W.F.; Ryan, A.E.; Weiss, J.M.; et al. Coexpression of NOS2 and COX2 accelerates tumor growth and reduces survival in estrogen receptor-negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 13030–13035. [[CrossRef](#)]
62. Wang, S.; Campos, J.; Gallotta, M.; Gong, M.; Crain, C.; Naik, E.; Coffman, R.L.; Guiducci, C. Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E7240–E7249. [[CrossRef](#)]
63. Xu, M.; Liu, M.; Du, X.; Li, S.; Li, H.; Li, X.; Li, Y.; Wang, Y.; Qin, Z.; Fu, Y.-X.; et al. Intratumoral Delivery of IL-21 Overcomes Anti-Her2/Neu Resistance through Shifting Tumor-Associated Macrophages from M2 to M1 Phenotype. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 4997–5006. [[CrossRef](#)]
64. Marabelle, A.; Kohrt, H.; Caux, C.; Levy, R. Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 1747–1756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Elleuch, F.; Hlima, H.B.; Barkallah, M.; Baril, P.; Abdelkafi, S.; Pichon, C.; Fendri, I. Carotenoids Overproduction in *Dunaliella* Sp.: Transcriptional Changes and New Insights through Lycopene β Cyclase Regulation. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 5389. [[CrossRef](#)]
66. Maadane, A.; Merghoub, N.; Ainane, T.; El Arroussi, H.; Benhima, R.; Amzazi, S.; Bakri, Y.; Wahby, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *J. Biotechnol.* **2015**, *215*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Rostock, M.; Huber, R.; Greiner, T.; Fritz, P.; Scheer, R.; Schueler, J.; Fiebig, H.H. Anticancer Activity of a Lectin-rich Mistletoe Extract Injected Intratumorally into Human Pancreatic Cancer Xenografts. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 1969–1975. [[PubMed](#)]
68. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]
69. Lai, Y.; Xu, X.; Zhu, Z.; Hua, Z. Highly efficient siRNA transfection in macrophages using apoptotic body-mimic Ca-PS lipopolyplex. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 6603–6623. [[CrossRef](#)]
70. Rong, Y.; Yuan, C.H.; Qu, Z.; Zhou, H.; Guan, Q.; Yang, N.; Leng, X.H.; Bu, L.; Wu, K.; Wang, F.B. Doxorubicin resistant cancer cells activate myeloid-derived suppressor cells by releasing PGE2. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Université d'Orléans

Université de Sfax

École doctorale (santé, sciences biologiques et chimie du vivant)

École Nationale d'Ingénieurs de Sfax

Ecole Doctorale Sciences et Technologies

Centre de Biophysique Moléculaire - CNRS

N° d'ordre: 2019–11

Fatma ELLEUCH

Etude des réponses du métabolisme de *Dunaliella* sp au stress abiotique pour une exploitation en thérapie: analyses génomiques et protéomiques.

Résumé : Nous nous sommes intéressés à optimiser la production de caroténoïdes par les microalgues *Dunaliella salina* isolées des côtes tunisiennes, via un plan d'expérience du type Box-Behnken en étudiant les effets et les interactions entre la salinité, l'intensité lumineuse et l'approvisionnement en azote. Nous avons trouvé des conditions permettant une augmentation de 5 fois la production intracellulaire de caroténoïdes. Nous avons étudié les caractéristiques des cellules cultivées en condition de stress (DSS) ou non (DSC) et les modifications transcriptionnelles des gènes impliqués dans la réponse au stress et la synthèse de β -carotène. Les gènes de la Lycopène β cyclase (*LCYB*) et de la protéine globulaire associée au carotène (*Cgp*) sont surexprimés. Les structures 3D des deux protéines codées par ces gènes et leurs modifications post-traductionnelles ont été déterminées. L'activité anticancéreuse d'extrait de cette souche cultivée dans des conditions normales (DSC) ou stressées (DSS) a été testée sur des cellules 4T1 de cancer de sein murin. L'extrait aqueux DSS est plus toxique que celui issu DSC. L'étude de la fragmentation de l'ADN génomique des cellules traitées met en évidence une apoptose avec une activation des caspases 3 et 9 et la désactivation de PARP-1. Pour valider ces résultats, une expérimentation *in vivo* a été menée sur des souris Balb/c implantées avec des cellules 4T1 dans la glande mammaire. Les résultats montrent une diminution de la taille de la tumeur des souris traitées et un retard de croissance. Cette activité a été accompagnée d'une activation de l'immunité anticancéreuse chez les souris traitées avec une infiltration de cellules Natural killers, de lymphocytes cytotoxiques et de cellules dendritiques plasmacytoïdes ainsi qu'une diminution de macrophages immunosuppresseurs. L'ensemble de nos résultats révèle la potentialité de l'extrait aqueux de cette micro algue comme anti-cancéreux qui mériterait d'être développé ultérieurement.

Mots clés : *Dunaliella*, étude transcriptionnelle, modélisation moléculaire, cancer, apoptose, réponse immunitaire

Study of *Dunaliella* sp metabolism responses to abiotic stress for exploitation in therapy: genomic and proteomic analyzes.

Summary: In this work, we optimized the culture conditions of *Dunaliella salina* sp, isolated from the Tunisian coast to increase carotenoids production. For that, we performed a Box-Behnken experimental design to study the effects and interactions between salinity, light intensity and nitrogen supply conditions. We succeeded to improve the intracellular production of carotenoids by five-fold. Subsequently, we studied the characteristics of cultured cells under stress (DSS) and control (DSC) conditions as well as the transcriptional modifications of the genes involved in stress response and β -carotene synthesis. Amongst studied genes, Lycopene β cyclase gene (*LCYB*) and Carotene globular protein gene (*Cgp*) were significantly overexpressed. 3D structures of the corresponding proteins and their posttranslational modifications have been determined. The anticancer activity of this strain cultivated under normal (DSC) or stressed (DSS) conditions was explored showing that the aqueous extract of DSS was four times more toxic than DSC one against murine breast cancer 4T1 cells. The extract was also active against A549 human lung adenocarcinoma cells and human Hela cells of cervical cancer. The study of the genomic DNA fragmentation of the treated 4T1 cells indicates that the extract induces an apoptosis cell death. Validation of these results by Western Blot was also performed by proving the activation of caspases 3 and 9 and the deactivation of PARP-1. *In vivo* experiments were performed on Balb/c mice that have been orthotopically implanted with 4T1 cells into the mammary glands. The results show a delay of the tumor growth and a decrease of the tumor size in mice treated with DSS aqueous extract. Interestingly, an activation of the anti-cancer immunity was observed with an increase of Natural Killer cells, activated cytotoxic lymphocytes and plasmacytoid DC as well as repression of immunosuppressive myeloid cells and enzymes (Arg-1, NOS-2 and COX-2). Altogether, our data reveal the potentiality of *D. salina* aqueous extract grown under stressed conditions as anti-cancer agent, which deserves attention for the future.

Keywords: *Dunaliella*, transcriptional study, molecular modeling, cancer, apoptosis, immune response