



HAL
open science

Etude des relations entre division cellulaire et métabolisme des triglycérides chez les plantes et les microalgues

Coline E Meï

► **To cite this version:**

Coline E Meï. Etude des relations entre division cellulaire et métabolisme des triglycérides chez les plantes et les microalgues. Biologie végétale. Grenoble Université, 2013. Français. NNT: . tel-01522951v1

HAL Id: tel-01522951

<https://theses.hal.science/tel-01522951v1>

Submitted on 15 May 2017 (v1), last revised 16 Jan 2018 (v2)

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie végétale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Coline MEÏ

Thèse dirigée par **Fabrice Rebeillé**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et
Végétale**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude des relations entre division cellulaire et métabolisme des triglycérides chez les plantes et les microalgues

Thèse soutenue publiquement le **25 Octobre 2016**,
devant le jury composé de :

Mr Thomas PFANNSCHIDT

Professeur à l'Université de Grenoble, Président

Mr Sébastien BAUD

Directeur de recherche, CNRS Versailles, Rapporteur

Mr Didier MARION

Directeur de recherche, INRA Nantes, Rapporteur

Mme Dominique VAN DER STRAETEN

Professeur à l'Université de Gent – Belgique, Membre

Mr Frédéric DOMERGUE

Chargé de recherche, INRA Bordeaux, Membre

Mr Fabrice REBEILLE

Directeur de thèse, CEA Grenoble



A ma famille,
A mes amis,
Aux belles personnes du laboratoire PCV,

Je remercie également la région **Rhône-Alpes** pour le financement de ma thèse
(ARC Environnement)

Sommaire

Sommaire

Abréviations	1
Nomenclature des lipides	7
INTRODUCTION	8
A. <u>Contexte sociétal & scientifique</u>	8
B. <u>Définition et diversité des lipides végétaux</u>	14
C. <u>Focus sur les glycérolipides</u>	16
OBJECTIF DE LA THESE	17
DONNES BIBLIOGRAPHIQUES	19
I. Modèles végétaux	19
A. <u>Plante : <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	19
B. <u>Diatomée : <i>Phaeodactylum tricornutum</i></u>	19
II. Métabolisme des glycérolipides	20
A. <u>Synthèse des précurseurs</u>	20
1. Synthèse des acides gras	20
a. <u>Traffic des acides gras</u>	22
<i>i. Export du chloroplaste</i>	22
<i>ii. Transport au réticulum endoplasmique</i>	22
<i>iii. Retour au chloroplaste</i>	22
<i>iv. Transport aux peroxysomes</i>	24
<i>v. Transport à la membrane plasmique</i>	24
b. <u>Modifications des acides gras</u>	25
c. <u>Plantes en C16 versus C18</u>	28
2. Synthèse de l'acide phosphatique (AP)	28
a. <u>Voies de synthèses procaryote et eucaryote</u>	29
b. <u>Rôle dans la signalisation</u>	29
3. Synthèse du diacylglycérol et du cytidine diphosphate-diacylglycérol	30
a. <u>Synthèse du diacylglycérol (DAG)</u>	30
<i>i. Rôle du DAG dans la signalisation</i>	31
b. <u>Synthèse du cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG)</u>	32
B. <u>Métabolisme des glycérolipides membranaires</u>	32
1. Synthèses des phospholipides	33
a. <u>Synthèse des phospholipides dérivés du CDP-DAG</u>	33
<i>i. Phosphatidyl-diacylglycérol (PG) et diphosphatidylglycérol (DPG)</i>	33
<i>ii. Phosphatidylinositol (PI)</i>	35
<i>iii. Phosphatidylsérine (PS)</i>	35
b. <u>Synthèse des phospholipides dérivés du DAG</u>	36

III. Stratégie de génétique chimique71
A. <u>Inhibiteurs de croissance</u>	72
1. Synthèse des folates et Métabolisme C1	72
a. Folates	72
b. Métabolisme C1	73
c. Inhibiteurs de la DIHYDROFOLATE REDUCTASE (DHFR) et de la THYMIDYLATE SYNTHASE (TS)	75
<i>i. Méthotrexate et analogues</i>	75
<i>α. Triméthoprimine et pyriméthamine</i>	76
<i>β. Analogue de la pyrimidine : le 5- fluorouracile</i>	77
2. Autres inhibiteurs	78
a. Inhibiteurs du cytosquelette	78
<i>i. Taxol</i>	79
<i>ii. Oryzaline</i>	79
b. Inhibiteur de la voie mTOR : la rapamycine	80
c. Inhibiteurs du métabolisme des stérols	80
<i>i. Inhibiteurs de la HMG-CoA : statines</i>	82
<i>ii. Inhibiteurs de la squalène époxydase : buténafine et terbinafine</i>	82
<i>iii. Analogues structuraux des stérols : estrone et ethinylestradiol</i>	82
MATERIEL ET METHODES	83
I. Matériel végétal	83
A. <u>Construction de lignées de la plante <i>A. thaliana</i></u>	83
1. Sélection des lignées du NASC	83
a. Extraction d'ADN génomique	83
b. PCR de génotypage	83
2. Complémentation	84
a. Clonage du gène (Technique Gateway, partie I)	84
b. Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	85
c. PCR sur colonies	85
d. Clonage du gène (Technique Gateway, partie II)	86
e. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	86
3. Lignées de surexprimeurs (OE)	87
4. Lignées de knock-out (KO) simple et double mutant (Technique CrispR/Cas9)	
a. Technique	87
b. Design des guides	88
c. Clonage dans le vecteur d'entrée	89
d. Clonage dans le vecteur de destination	91
5. Transformation d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	92
a. Sélection des transformants	93
<i>i. Constructions Gateway</i>	93

Sommaire

ii. <i>Constructions CrispR/Cas9</i>	93
6. Résumé des constructions	94
B. <u>Cultures des plantes</u>	95
1. En terre	95
2. <i>In vitro</i>	95
C. <u>Cultures cellulaires de la plante <i>A. thaliana</i> et de la diatomée <i>P. tricornutum</i></u>	95
1. Culture d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	95
a. Culture cellulaire	95
b. Culture de cals	96
i. <i>Extraction d'ADNg de cals</i>	96
c. Suivi de la croissance cellulaire	97
2. Culture de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	97
a. Préparation du milieu de culture ESAW	97
b. Conditions de culture	98
c. Suivi de la croissance cellulaire	98
3. Mesure de la chlorophylle et de la production de TAG	98
II. Expérience d'incubation des cultures cellulaires avec des molécules chimiques et en carence d'azote	99
A. <u>Modèle cellulaire <i>A. thaliana</i></u>	99
1. Expérience d'incubation avec des lipides fluorescents dans les conditions MTX et carence d'azote	100
2. Expériences d'incubation avec des molécules radioactives	101
a. Suivi de la radioactivité dans le milieu de culture et de son incorporation dans les cellules	101
b. Expériences d'incubation avec des molécules radioactives durant le traitement MTX et en carence d'azote	101
B. <u>Modèle de diatomée <i>P. tricornutum</i></u>	103
1. Criblage des molécules	103
a. Conditions de culture	103
b. Composés testés	103
i. <i>Inhibiteurs de la croissance cellulaire</i>	104
ii. <i>Autres inhibiteurs</i>	104
2. Scale-up de la culture pour le composé 5-fluorouracile et pour les carences en nutriments	104
III. Techniques de microscopie	105
A. <u>Microscopie optique</u>	105
B. <u>Microscopie à épifluorescence</u>	105
C. <u>Microscopie confocale</u>	105
1. Suivi de la chlorophylle	105

2. Suivi des lipides de stockage106
3. Coloration des noyaux	106
4. Suivi des lipides fluorescents	106
IV. Analyse des glycérolipides de plante et de diatomée	106
A. <u>Extraction (Méthode Folch)</u>106
B. <u>Quantification des extraits totaux</u>	107
1. Méthanolyse	107
2. Dosage des acides gras en chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)	107
C. <u>Séparation et dosage des glycérolipides</u>	108
1. Chromatographie sur couche mince (TLC)	108
2. Dosage des glycérolipides	109
a. Extraction et analyse des lipides fluorescents (bodipy®)	109
i. Standards fluorescents109
b. Extraction et analyse des lipides radioactifs110
D. <u>Dosage du ratio AdoMet/AdoHcy, de la phosphocholine et des acyl-CoA</u>	110
V. Mesure de l'expression génique chez le modèle <i>A. thaliana</i>110
A. <u>Extraction de l'ARN messenger</u>111
B. <u>Rétrotranscription</u>111
C. <u>PCR quantitative (qPCR)</u>	112
1. Préparation des échantillons et des gammes de dilution	112
2. Réaction de qPCR	112
3. Interprétation des résultats de qPCR	112
VI. Mesure de l'expression protéique chez <i>A. thaliana</i>	113
A. <u>Production des protéines NPC4 et 5</u>	113
1. Clonage dans pMAL-Cx2	113
2. Production des protéines recombinantes NPC4/5-MBP	114
a. Test de production	114
b. Production en grand volume	115
c. Purification de protéines recombinantes avec une étiquette MBP	115
B. <u>Extraction de protéines totales</u>	115
1. Quantification des protéines par la méthode de Bradford	116
C. <u>Western Blot</u>	116
1. Migration des protéines : SDS-PAGE	116
2. Transfert des protéines	117
3. Incubation avec les anticorps : ECL	117
4. Révélation	118
VII. Statistiques	118

RESULTATS **119**

I. Induction de la production de TAG dans des cultures cellulaires issues de la plante modèle <i>A. thaliana</i>	119
A. <u>Corrélation entre vitesse de croissance cellulaire et insaturations des acides gras</u>	119
<i>Article : Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures, Mei et al, Scientific Report, 2015</i>	121
B. <u>Suivi de la croissance de cultures d'<i>A. thaliana</i></u>	130
C. <u>Stratégie de génétique chimique sur les cultures cellulaires d'<i>A. thaliana</i></u>	131
1. Inhibiteurs du cytosquelette	132
2. Inhibiteurs de la voie mTOR et des stérols	133
3. Inhibiteurs de la voie de synthèse des folates	134
4. Discussion	135
D. <u>Effets du traitement méthotrexate et de la carence d'azote sur le métabolisme des TAG</u>	136
1. Données principales	136
<i>Article : C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation trigger triacylglycerol accumulation in Arabidopsis thaliana cell cultures and highlight a role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway, Mei et al, en cours de soumission, 2016</i>	138
2. Données complémentaires	167
a. Variation du profil d'insaturation des acides gras au cours des deux traitements	167
b. Facteurs de transcription régulant la production de TAG au cours des deux traitements	170
c. Homéostasie de la PC au cours du traitement au MTX	171
<i>i. Immunodétection des NON SPECIFIC PHOSPHOLIPASES C (NPC)</i>	174
3. Discussion	175
II. Induction de la production de TAG chez la diatomée modèle <i>P. tricornutum</i>	
A. <u>Suivi de la croissance de cultures de <i>P. tricornutum</i></u>	176
B. <u>L'effet repiquage</u>	178
C. <u>Analyse des glycérolipides de <i>P. tricornutum</i></u>	180
<i>Article : Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in Phaeodactylum tricornutum, Abida et al, Plant Physiology, 2015</i>	181
D. <u>Stratégie de génétique chimique chez <i>P. tricornutum</i></u>	200
1. Inhibiteurs du métabolisme des stérols	200
2. Méthotrexate et analogues	202
a. Criblage des molécules sur <i>P. tricornutum</i>	202
b. Conditions de culture mixotrophiques et exposition au MTX de <i>P. tricornutum</i>	205
c. Scale-up du composé 5-fluorouracile chez <i>P. tricornutum</i>	207

Sommaire

3. Discussion	209
CONCLUSION	210
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	216
<hr/>	
ANNEXE	248
Liste des Publications & Communications	248

Abréviations

Nombres :

2.4-D : Acide 2.4 dichlorophenoxyacétique

5-FU : 5-fluorouracile

5-THF : 5-tétrahydrofolate

A

AAPT : Amino alcohol phosphotransférase

ABI3/4/5 : Abscisic acid insensitive 3, 4, 5

ACCases : Acétyl-coA carboxylases

Acétyl-CoA : Acétyl-coenzyme-A

ACP ou ACBP : Protein acyl carrier

AdoHCy : AdoHomocystéine

AdoMet : AdoMéthionine ou SAM

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaires

AICAR : 5-amino-imidazole carboxamide ribonucleotide transformylase

AP : Acide phosphatidique

APS : Ammoniumperoxodisulfate

ARNi : ARN interférents

ARNm : ARN messagers

ATGL : Adipocyte tryglycerides lipases

B

BADH : Bétaïne aldéhyde désydrégénase

Bis PC : Bis bodipy FL C11-PC

BSA : Bovin serum albumin

C

CCT : Choline citydyltransférase

CGI-58 : Comparative gene identification-58

CK : Choline kinase

CLS : Cardiolipine synthase

CO₂ : Dioxyde de carbone

Col-0 : Colombia 0

COP21 : Conference of the Parties n°21

CPT : CDP-choline : diacylglycérol cholinephosphotransférase

Crispr : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CTAB : Cetyltrimethyl ammonium bromide

CMP : Cytidine monophosphate

D

DAD1 : Defective in anther dehiscence 1

DAG : Diacylglycérol

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DGAT : Diacylglycérol acyltransférase

DGDG : Digalactosyldiacylglycérol

DGTA : Diacylglycerol hydroxymethyl-N,N,N-trimethyl- β -alanine

DGTS : Diacylglycérol-O-N,N,N-trimethyl homoserine

DHA : Acide docosahexaénoïque

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate reductase

DIR : DNase Inactivation Reagent

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTPs : Déoxynucléotides

DO : Densité optique

DPG : Diphosphatidylglycérol

dTMP : Déoxythymidine-monophosphate ou thymidylate

DTT : Dithiothréitol

dUMP : Déoxyuridine-monophosphate

E

ECL : Enhanced chemoluminescence

ECT : Ethanolamine citydyltransférase

EDTA : Aide éthylène diamine tétra-acétique

EK : Ethanolamine kinase

EPA : Acide eicosapentaénoïque

EPT: CDP-éthanolamine : diacylglycérol éthanolaminephosphotransférase

ER : Enoyl-ACP reductase

ESAW : Enrichment solution with artificial water

ESAW 10P10N : Milieu ESAW 10X pour les sources d'azote et de phosphate

F

FAE1 : Fatty acide elongase 1

FAS II : Fatty acid synthase II

FAX1 : Fatty acid export 1

FUS3 : FUSCA3

G

G3P : Glycérol-3-phosphate

GC-FID : Gas chromatography flame ionization detector

GGGT : Galactolipid : galactolipid galactosyltransférase

GPAT : sn-glycerol-3-phosphate acyltransférase

GPC : Glycérophosphocholine

GPCAT : Acyl-CoA : glycérophosphocholine acyltransférase

gRNA : ARN guide

GUS : Enzyme β -glucuronidase

H

HAD : Hydroxyacyl-ACP déshydratase

HAP3 : Heme-activated protein3

Hcy : Homocystéine

HMG-CoA : Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A

HSD1 : Hydroxystéroïde déshydrogénase

I

IEM : Inner envelope membrane

IPP : Isopentenyl pyrophosphate

IPTG : Isopropyl-B-D-1 thiogalactoside

K

KAR : KetoAcyl-ACP reductase

KASIII : Ketoacyl-ACP synthase III (KASIII)

KO : Knock-out

L

L1L : Leafy cotyledon1-like

LACS : Long chain acyl-CoA synthetase

Milieu LB : Milieu de culture bactérien « Luria-Bertani »

LC-MS/MS : Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

LDAP1/2 : Lipid droplet associated proteins

LDSP : Lipid droplet surface protein

LEC1/2 : Leafy cotyledon 1/2

LPAAT : Lysophosphatidic acid acyltransferase

LPCAT : Lysophosphatidylcholine acyltransférase

LPCT : Lysophosphatidylcholine transacylase

Lyso-AP : Acide lyso-phosphatidique

M

MAG : Monoacylglycérol
MAGL : Monoacylglycérol lipase
MAPK : Mitogen activated protein kinases
MBP : Maltose binding protein
MCMT : Malonyl-CoA : ACP malonyltransférase
MLDP : Major lipid droplet protein
MGAT : Acyl-CoA : monoacylglycérol acyltransférase
MGD1/2/3 : Monogalactosyldiacylglycérol synthases
MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol
MS : Milieu Muroshige et Skoog
mTOR : Mammalian target of rapamycin
MTX : Méthotrexate

N

-N : Milieu sans azote
NASC : European arabidopsis stock center
NEC : No enzyme control
NPC : Non specific phospholipases C
NTC : No template control

O

OE : Over-expressor
OEM : Outer envelope membrane
OLEO1: Oléosine 1
Ory : Oryzaline

P

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis based
PAH1/2 : Phosphatidic acid hydrolases 1/2
PAM sequence : Protospacer adjacent motif
PAP : Phosphatidic acid phosphatase
PC : Phosphatidylcholine
PCR : Polymerase chain reaction
PDAT : Phospholipid : diacylglycérol acyltransférase
PDCT : Phosphatidylcholine : diacylglycérol cholinephosphotransférase
PDME : Phosphatidyl diméthyléthanolamine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PEAMT : Phosphoéthanolamine méthyltransférase
PECP : Phosphoéthanolamine/phosphocholine phosphatase
PG : Phosphatidylglycérol

pgm-1 : Phosphoglucomutase plastidiale
PGP : Phosphatidylglycérol phosphate
PGP1/2 : Phosphatidylglycérol synthases
PI : Phosphatidylinositol
PI-3P : Phosphatidylinositol 3 phosphate
PI-4P : Phosphatidylinositol 4 phosphate
PIP₂ : Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
PI-PLC : Phosphoinositides phospholipases C
PIS : PI synthase
PIS1/2 : Phosphatidylinositol synthase ½
PKC : Protéines de type kinase C
PLA : Phospholipases A
PLC : Phospholipases C
PLD : Phospholipases D
PLMT : Phospholipide N-méthyltransférase
PME : Phosphatidylméthyléthanolamine
PMEAMT : Phosphoéthanolamine N-méthyltransférases
PS : Phosphatidylsérine
PSS1 : Phosphatidylsérine synthase 1
PUFA : Polyunsaturated fatty acids
p/v : Poids/volume
Pyri : Pyriméthamine
PXA1 : Peroxisomal ABC transporter 1

Q

qPCR : PCR quantitative

R

Rapa : Rapamycine
ROS : Reactive oxygen species
RFU : Relative fluorescent unit

S

SAM : S-adénosyl methionine ou AdoMet
SDP1 : Sugar-dependant protein 1
SDS : Sodium dodesyl sulfate
SDS-PAGE : Sodium dodesyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFR2 : Sensitive to freezing 2
SMM : S-méthylméthionine
SQ : UDP-sulfoquinovose
SQD1 : UDP-SQ synthase 1

SQDG : Sulfoquinovosyldiacylglycérol
SREBPs : Sterol regulatory element binding proteins

T

TAE : Tampon tris-acétate-EDTA
TAG : Triacylglycérol ou Triacylglycérides
Tax : Taxol
TBE : Tampon tris-Borate-EDTA
TBS : Tris-HCL 50mM pH 7.5, NaCl 50mM
TCA : Acide trichloroacétique
TeGDG : Tétragalactosyldiacylglycérol
TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis (diméthylamino)-ethan
THF : Tétrahydrofolate
TGD : Trigalactosyldiacylglycérol
TGDG : Tri-galactosyldiacylglycérol
TLC : Thin layer chromatographie
Tm : Melting temperature
Tri : Triméthoprim
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
TS : Thymidylate synthase
TSS : Total suspended solids

U

UDP-Gal : Uridine diphospho-galactose
UDP-glucose : Uridine diphosphate glucose
UGP3 : UDP-glucose pyrophosphorylase
uORF : Upstream open reading frame
UTP : Uridine triphosphate
UTR : Untranslated region

V

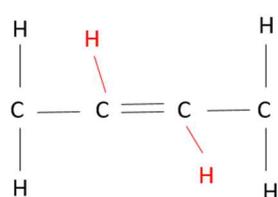
VAL1/2/3 : VP1/Abscisic acid insensitive3-like 1, 2, 3
VLCFA : Very long chain fatty acid
v/v : Volume/volume

W

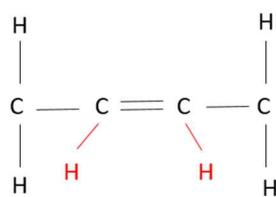
WRI1/3/4 : Wrinkled 1/3/4

Nomenclature des glycérolipides

- **Nomenclature 'sn' (stereospecific numbering)** : Les carbones *sn-1*, *sn-2* et *sn-3* correspondent aux positions du squelette glycérol sur lesquelles sont estérifiées des acides gras ou greffée une tête polaire. Les glycérolipides membranaires et leurs précurseurs (acide phosphatidique et diacylglycérol) sont acylés en position *sn-1* et *sn-2* et comportent une tête polaire en *sn-3* (ou un groupement alcool pour le DAG). Les triacylglycérols sont acylés sur les trois positions, *sn-1* à *sn-3*.
- **Insaturations** : Les doubles liaisons carbone-carbone sont introduites par un processus enzymatique catalysé par des désaturases. Les acides gras saturés ne comportent pas de doubles liaisons. Les acides gras mono-insaturés comportent une double liaison. Et les acides gras polyinsaturés (PUFAs) comportent plusieurs doubles liaisons.
- **Insaturations *trans* vs *cis*** : Lorsque les carbones sont asymétriques, une double liaison carbone-carbone peut adopter deux organisations différentes dans l'espace ; on parle alors de molécules diastéréoisomères. Quand les groupements prioritaires se trouvent de part et d'autre de l'insaturation, la molécule est dite « *trans* » et quand ces groupements sont du même côté, on parle de molécule « *cis* » (**Figure 0**).
La nature de l'insaturation influe sur les propriétés de l'acide gras et donc du glycérolipide qui le porte. Ainsi, les insaturations de type « *trans* » permettent de conserver la linéarité des acides gras, la chaîne est moins souple et le point de fusion plus élevé que la forme « *cis* ».
- **Longueurs des chaînes** : nombres de carbones composant un acide gras.
 - C16 : acide gras à 16 carbones.
 - C18:3 : acide gras comportant 18 carbones et 3 insaturations.
 - C16:0/C18:3 : glycérolipide comportant deux acides gras en *sn-1* et *sn-2* de 16 carbones et 0 insaturation en première position et 18 carbones et 3 insaturations en *sn-2*.
- **Position des insaturations** : Les numérotations delta (Δ) et oméga (ω) précisent la position d'insaturation à partir du carbone α et ω , respectivement. Par exemple Δ^7 marque une insaturation portée par le carbone n°7 de la chaîne carbonée d'un acide gras en considérant que le carbone n°1 porte la fonction carboxyle.



Trans



Cis

Figure 0: Représentation d'une insaturation *trans* et *cis* au sein d'une chaîne carbone-carbone qui compose les acides gras.

Introduction

A. Contexte sociétal & scientifique

Les secteurs de l'énergie et du transport sont les principales sources anthropiques d'émissions de gaz à effet de serre en Europe, représentant respectivement 20 et 60% des émissions (*European Environmental Agency 2004*). Le développement de nouvelles économies comme la Chine et l'Inde devrait augmenter la consommation globale d'énergie et accentuer les effets sur le climat (*International Energy Agency 2007*). Les impacts de la pollution atmosphérique sur l'économie, la santé et l'environnement ont d'ailleurs été au cœur du débat de la conférence pour le climat COP21 à Paris à la fin de l'année 2015. Dans cette optique, de nombreux pays ayant adoptés le protocole de Kyoto en 1997, ont établis des quotas de CO₂ à respecter afin de faire baisser les émissions de ce gaz à effet de serre. Pour accompagner ces mesures, l'un des challenges important de la lutte contre le réchauffement climatique est la recherche et mise en place de sources d'énergies propres et renouvelables. Un des points important est de faire baisser la production des émissions dues aux transports. Pour ce faire, un remplacement des carburants fossiles par des biocarburants est une solution à court terme envisageable.

Le terme générique de "biocarburant" inclut le biodiésel et le bioéthanol, qui sont incorporés ou remplacent respectivement le diésel et l'essence. Ces carburants de nouvelle génération présentent de nombreux avantages :

- ils peuvent être utilisés dans les moteurs actuels sans ou avec peu de modifications,
- ils sont mis en place avec des technologies existantes et peuvent être distribués avec les systèmes déjà présents pour les carburants fossiles,
- ils sont produits à partir de biomasse ou de sources d'énergies renouvelables.

Pour ces raisons, les biocarburants semblent être une alternative immédiate réaliste, contrairement à d'autres solutions comme la pile à hydrogène qui nécessite des transformations plus importantes. Un nombre croissant de pays se tournent vers ce nouveau pétrole. Ainsi en 2008, 35 milliard de litres ont ainsi été produits dans le monde, un effort encouragé par des mesures politiques et économiques en faveur de l'environnement (*Bozbas 2008*). En 2015, la production mondiale a atteint entre 68 et 70 Mtep (million de tonnes équivalent pétrole) soit l'équivalent de 6 jours de production de pétrole. Cette production est principalement portée par le continent américain avec 74% de la production puis par l'Europe, 17% de la production dont 3.3% pour la France et 4% pour l'Allemagne (*Cour des comptes 2016*). La production mondiale est caractérisée par une forte domination du bioéthanol sur le biodiésel, de l'ordre de 75 et 25% respectivement. En France, c'est le biodiésel qui prédomine avec 1.85 million de tonnes contre 0.98 pour le bioéthanol. Cette production est stable depuis 5 ans et mobilise 6% de la surface agricole.

On distingue quatre types de biocarburants : les biocarburants de première, seconde et troisième générations issus du domaine végétal et des biocarburants issus du recyclage des graisses animales et des huiles alimentaires usagées dont la production est actuellement de l'ordre de 100 à 150 000 tonnes.

Introduction

Les biocarburants de première génération sont exclusivement produits à partir de cultures végétales. Il s'agit soit de biodiésel, résultant de l'estérification d'huiles végétales principalement de colza, de tournesol ou de palme (**Figures 1 et 2**). Soit de bioéthanol, issu de la fermentation des sucres provenant du blé, du maïs, de la betterave ou de la canne à sucre (**Figure 2**). Les coproduits issus de la transformation des matières premières végétales dont les drèches de blé et de maïs, la pulpe de betterave, les tourteaux de colza et de tournesol, sont valorisés notamment dans l'industrie des aliments pour animaux, où ils constituent un substitut aux protéines végétales fabriquées à partir de soja. Les biocarburants de première génération sont les seuls à avoir été appliqués à grande échelle et sont pour l'instant la principale source de production de biocarburant. Néanmoins, le gros désavantage de cette première génération est la concurrence qu'elle exerce en termes de surface en terres arables avec les cultures vivrières. Dans un contexte d'augmentation de la population mondiale et de la désertification des terres cultivables, la recherche se tourne vers d'autres stratégies.

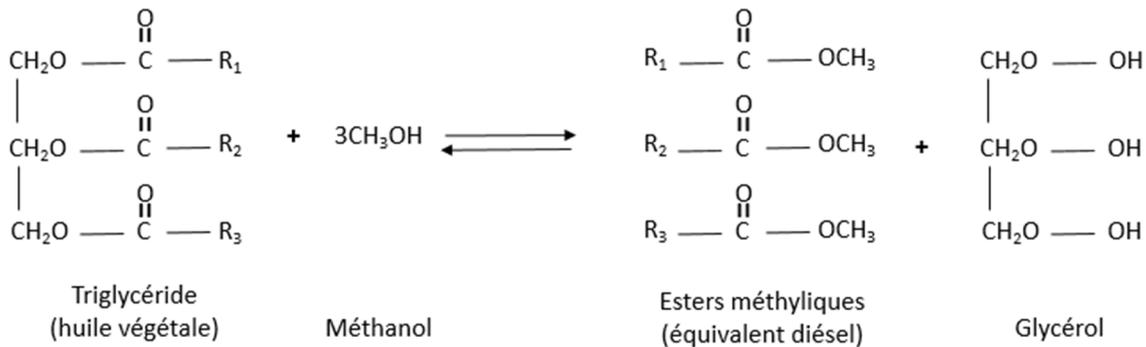
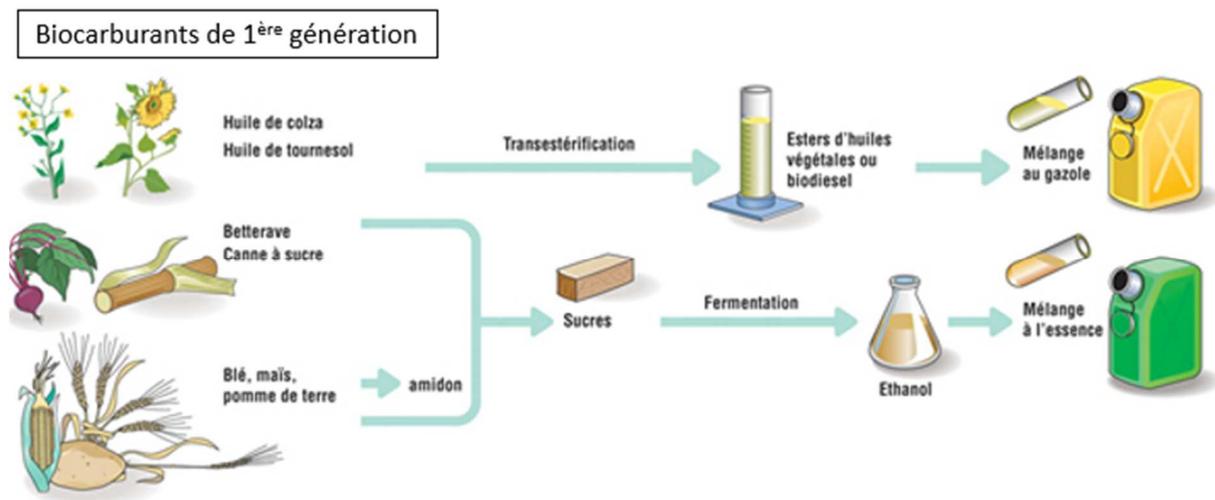


Figure 1 : Réaction de transestérification. Mélange à froid d'une huile et d'un alcool (méthanol ou éthanol) en présence d'un catalyseur (hydroxyde de potassium). Les produits de la réaction sont des esters méthyliques ou éthyliques ayant des propriétés physiques très proches de celle du diesel et du glycérol.



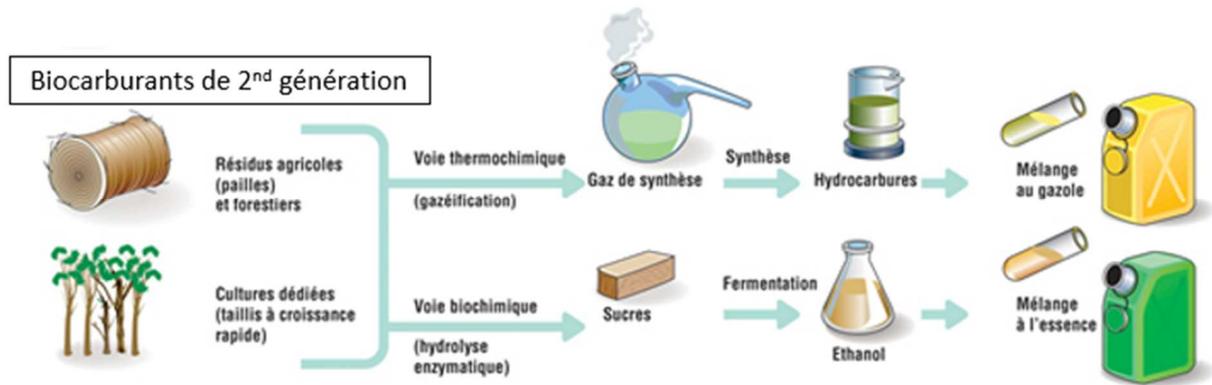


Figure 2 : La fabrication des biocarburants de première et seconde générations. Adapté de l'IFP Energies nouvelles.

Les biocarburants de seconde génération utilisent les déchets végétaux d'industries déjà en place. Ainsi, les résidus de l'industrie papetière et forestière (chutes de bois), agricole (paille) ou agro-alimentaire (mélasse, ...) sont transformés en hydrocarbures ou bioéthanol (**Figure 2**). Cette stratégie permet à la fois de ne pas monopoliser de terres arables pour la culture dédiée au biocarburant et également de valoriser la totalité des végétaux utilisés dans d'autres filières. De plus, cette ressource "lignocellulosique" représente un gisement renouvelable beaucoup plus important que les ressources de la première génération. Actuellement, ces biocarburants sont en phase finale de développement et proche de l'industrialisation (*Porot, IFP Energies Nouvelles, Juin 2015*).

Un autre axe de recherche consiste à planter des cultures dédiées aux biocarburants. Les espèces végétales sont alors sélectionnées pour leur rapidité de croissance, leur rendement accru en huile, ... Dans cette optique, de nombreuses approches génétiques sont développées, notamment afin d'améliorer la production d'huile par les plantes, huile qui sera ensuite transformée en biodiesel. Chez les plantes, les organes qui accumulent naturellement des huiles sont les graines. Cette énergie stockée sous forme carbonée permet ensuite à la plantule de germer. La présence d'huile dans les graines est exploitée chez les plantes oléagineuses (colza, tournesol,...). Certains axes de recherche visent à augmenter la productivité de ces graines. D'autres, ciblent génétiquement de nouvelles espèces de plantes, comme des espèces invasives (*Picou et Boldor 2012, Sut et al 2016*). Une autre stratégie consiste à faire produire des huiles dans les tissus végétatifs des plantes (feuilles principalement). Parce que les feuilles ont une surface plus importante que les graines, une production dans ses tissus pourrait être beaucoup plus rentable (*Vanhercke et al 2013 et 2014*). Mais ce type de culture rejoint les biocarburants de première génération car elle ne s'affranchit pas de la compétition pour les terres arables.

Les biocarburants de 3^{ème} génération sont produits à partir de microalgues (**Figure 3**). Les microalgues sont des organismes unicellulaires photosynthétiques capables de produire de forte quantité d'huile. Ces lipides de réserve leur permettent de stocker de l'énergie, ce qui s'avère utile dans un milieu comme l'océan où les fluctuations en nutriments sont

Introduction

importantes. Les microalgues présentent de nombreux avantages pour la production d'huile. D'un point de vue pratique, elles sont faciles à cultiver, peuvent croître dans des eaux impropres à la consommation humaine et se contenter de peu de nutriments, de par leurs capacités photosynthétiques qui leur permettent de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique et carbonée (*Mata et al 2010, Zhou et al 2014*). Compte tenu de leur diversité, il est aussi possible de sélectionner des espèces qui peuvent s'adapter à un environnement particulier, ce qui n'est pas toujours le cas pour les variétés de plante agricoles. Elles possèdent également un taux de croissance et de productivité supérieur à celui des plantes terrestres et requièrent aussi beaucoup moins d'espace pour leurs cultures : une culture de microalgue requière 49 à 132 fois moins de surface qu'une culture de colza ou de soja et peut produire jusqu'à 30% de sa masse en huile (*Christi 2007*). De plus, les performances des biodiésels issus des microalgues sont équivalentes à un diésel issu du pétrole (*Delucchi, Institute of transportation, USA, 2003*). La production des microalgues n'est cependant pas restreinte au biodiésel puisque suivant la souche sélectionnée, elles peuvent produire du méthane, de l'hydrogène et de l'éthanol pour ne citer que ces composés. Aussi, la culture de microalgues pour la production de biocarburants peut être couplée à d'autres buts :

- Les microalgues peuvent être cultivées dans des effluents industriels et utiliser des polluants (CO₂, nitrates et ammonium) comme sources de nutriments, ce qui favorise un assainissement des eaux (*Wang et al 2008, Directive 2003/30/EC*)
- Les composés précurseurs des biocarburants peuvent être extraits, ainsi que d'autres composés d'intérêt comme des colorants naturels, des pigments, des antioxydants,...
- Après extraction des composés d'intérêt, la biomasse peut servir de complément alimentaire au bétail (riche en azote et phosphate).

Les applications liées aux microalgues ne s'arrêtent donc pas à la production de biocarburant : elles peuvent être utiles aux secteurs de la pharmacie, de la cosmétique, de la nutrition, de l'aquaculture et de l'environnement.

Actuellement, l'utilisation de microalgues pour produire des biocarburants est encore dans une phase de recherche et développement. Cependant dès 2011, des usines-test comme le laboratoire à grande échelle d'Alicante en Espagne ont été mises en place. Plus récemment en 2013, la ville espagnole Chiclana de la Frontera, en collaboration avec la compagnie Aqualia, a mis en place des bioréacteurs alimentés par des eaux usées pour produire du biodiésel qui est utilisé pour approvisionner les véhicules appartenant à la localité. L'usine pilote, également financée par des aides de l'union européenne, fait 200m² et à terme, la production visée est de 3 tonnes d'algues sur 10 hectares pour une production annuelle de 100 000 euros de biocarburant (<http://www.actualités-news-environnement>).

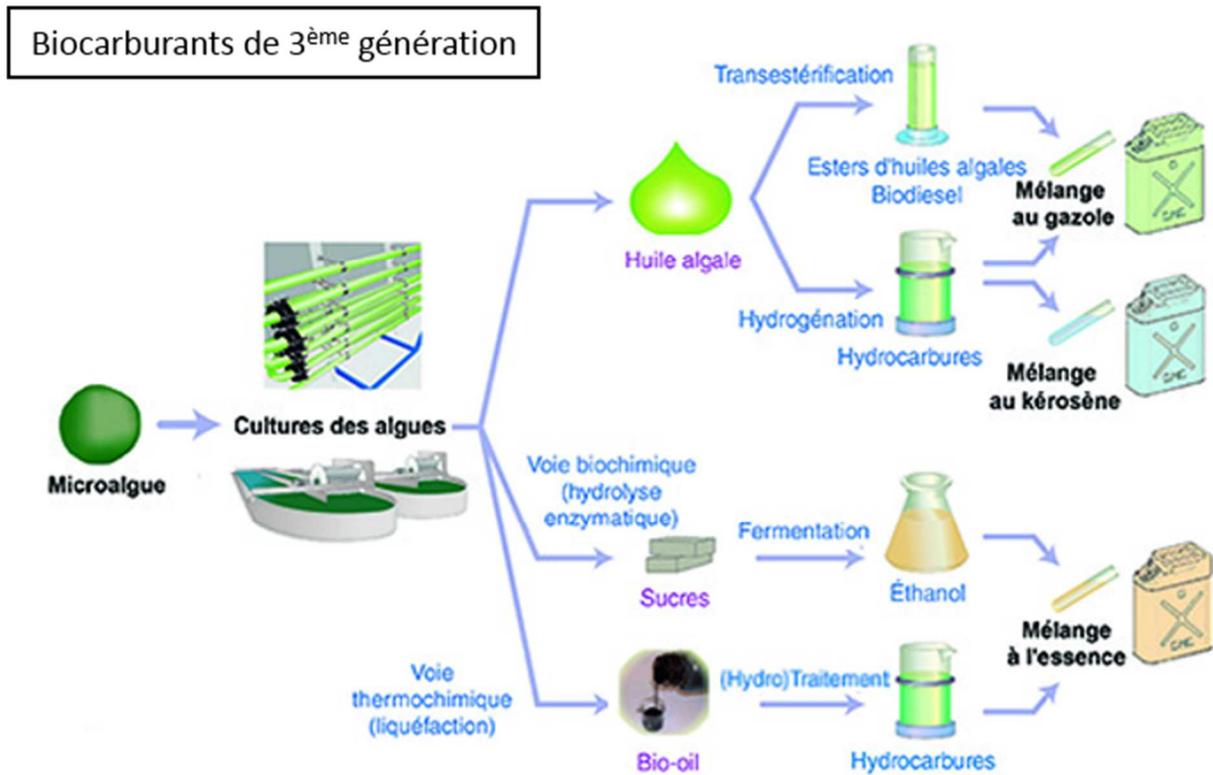


Figure 3 : Fabrication des biocarburants de 3^{ème} génération. Adapté de l'IFP Energies nouvelles.

Les biocarburants semblent donc une solution de transition envisageable pour remplacer les carburants fossiles. Or, les trois générations ont en commun un coût de production encore trop élevé. Ainsi, le coût final du biodiesel de première génération varie suivant la valeur des récoltes dont il est issu, ce qui peut représenter 60 à 75% de son coût total (Canakci et Sanli 2008). Afin de devenir une alternative viable et de se positionner comme un réel concurrent du pétrole, les biocarburants doivent devenir économiquement compétitifs. Pour cela, toutes les étapes de la production des biocarburants doivent être optimisées.

Afin de produire du biodiesel à partir de microalgues, différentes étapes sont nécessaires (Figure 4). Après la sélection de la souche et des conditions les plus favorables à sa croissance, les microalgues sont récoltées et la biomasse transformée. Ces étapes sont particulièrement consommatrices d'énergie : les cellules sont pompées et filtrées hors du bassin de culture, des flocculants sont ajoutés pour aider à l'agglomération et les algues sont ensuite centrifugées et essorées. Suivant les espèces, ces étapes peuvent être répétées plusieurs fois, afin d'obtenir une pâte contenant entre 15 et 25% de microalgues. Cette pâte est ensuite séchée (four à 100°C) pour éliminer l'eau et faciliter l'extraction chimique de l'huile. Cette huile peut être purifiée avant de subir la réaction de transestérification (Figure 1) qui mène à la production de biodiesel (Mata et al 2010).

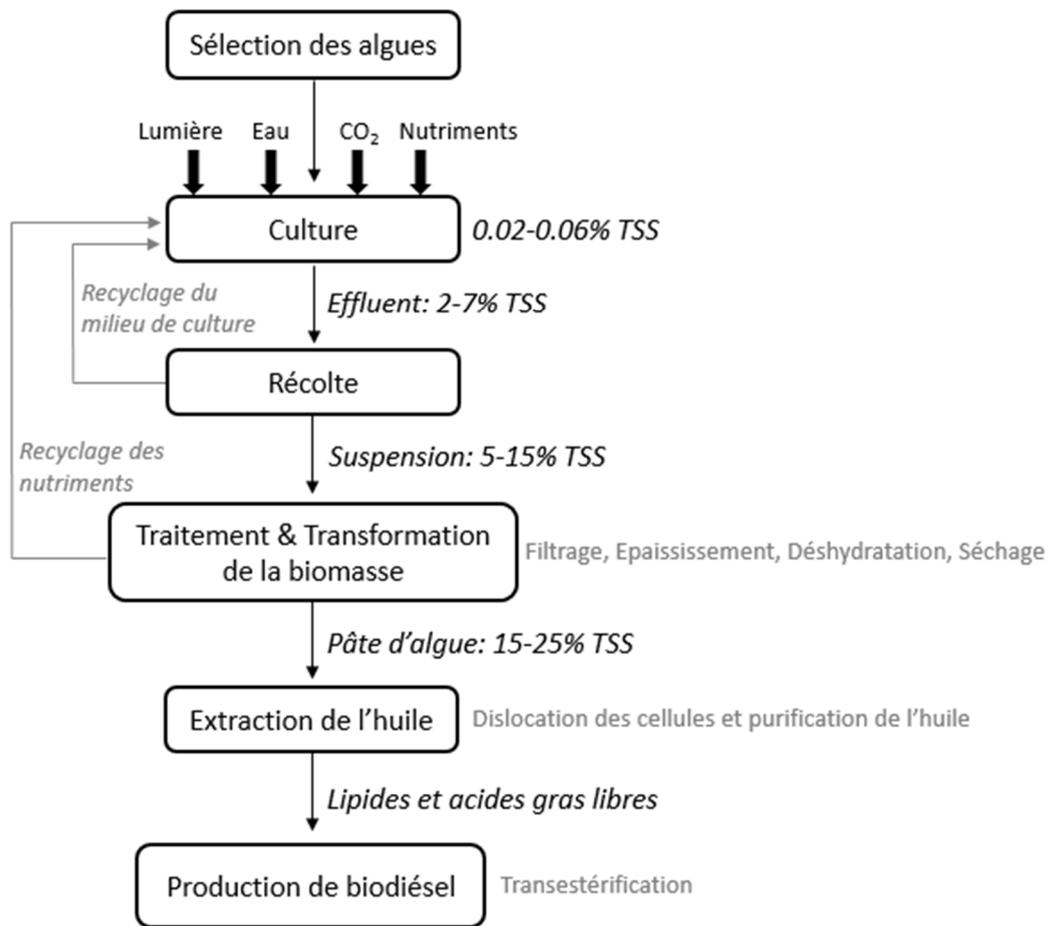


Figure 4 : Etapes de la production de biodiésel à partir de culture de microalgues. TSS : "Total Suspended Solids", poids sec des particules capturées par un filtre : unité utilisée pour quantifier la concentration en algue dans le milieu. Adapté de *Mata et al, 2010*.

L'amélioration des rendements et la baisse des coûts de chaque étape sont à l'étude. Dans ce contexte, obtenir des souches capables de produire de grande quantité d'huile est primordial. Pour ce faire, les conditions de cultures peuvent être optimisées : culture en continu ou en batch, en bioréacteur ou en bassin. Les paramètres physico-chimiques comme l'intensité lumineuse et l'apport en nutriments et en CO₂ peuvent également être affinés. Ainsi, chez de nombreuses espèces de microalgues, il a été décrit que la croissance cellulaire et la production d'huile est favorisée en condition mixotrophe (*Osundeko et Pittman 2013, Cerón-García et al 2013, Ji et al 2016*). Une stratégie d'amélioration génétique des souches peut également être mise en place en parallèle. Comme les microalgues sont cultivées en conditions confinées et que les produits extraits ne sont pas utilisés à des fins agro-alimentaires, elles ne devraient pas être soumises à une régulation européenne trop stricte sur les organismes génétiquement modifiés, ce qui est un autre avantage du modèle comparé au biocarburant de première génération.

Pour pouvoir améliorer la production de lipide de stockage par les microalgues, il faut connaître la machinerie cellulaire qui est en jeu. L'étude du métabolisme des lipides

végétaux et en particulier l'étude de l'accumulation d'huile a longtemps été focalisée sur la graine, organe accumulant naturellement des lipides de réserves. Les plantes oléagineuses notamment, sont encore un modèle d'étude et d'amélioration pour la production de biocarburant ou de composés d'intérêt agroalimentaire. Par exemple, la caméline ou sésame d'Allemagne (*Camelina sativa*) a été modifiée pour produire des omega-3 -acides gras essentiels à l'alimentation humaine- pour pallier le manque de ressources marines (*Napier et al 2015, Bansal et Durrett 2016, Tejera et al 2016*). S'appuyant sur les connaissances acquises par les travaux réalisés sur les plantes supérieures, l'étude des voies de production des lipides chez les microalgues est actuellement un axe de recherche en plein développement. Néanmoins, notre compréhension du métabolisme des lipides chez les plantes ou les microalgues est loin d'être complète. C'est le cas en particulier des relations métaboliques qui existent entre les lipides membranaires et les lipides de stockage. Afin de valoriser industriellement de tels modèles, il est encore nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes biologiques concernés.

B. Définition et diversité des lipides végétaux

Les lipides sont des constituants essentiels de toutes les cellules végétales. Les cellules végétatives des plantes contiennent environ 5 à 10% de lipide par poids sec, provenant principalement des membranes cellulaires (*Ohlrogge et Browse, 1995*). Les lipides sont aussi la forme majeure de stockage de carbone dans les graines de nombreuses espèces végétales, pouvant constituer jusqu'à 60% de leur poids sec.

Contrairement aux autres constituants majeurs des cellules de plantes (protéines, sucres et acides nucléiques), les lipides sont définis par leurs propriétés physiques plutôt que par une structure chimique commune. Ainsi les lipides sont décrits de manière générique comme des composés insolubles dans l'eau mais qui peuvent être extraits des cellules par des solvants organiques non polaires (tel le chloroforme).

Il existe différentes classes de lipides, provenant de deux précurseurs principaux, les acides gras et les isoprénoïdes. La classe des isoprénoïdes englobe des composés qui sont souvent caractérisés comme métabolites secondaires car n'étant pas essentiels à la croissance des cellules. Néanmoins les stérols, des phytohormones comme les gibbérellines, l'acide abscissique et la chaîne phytol de la chlorophylle sont des composés primordiaux. La voie de biosynthèse des acides gras fait partie du métabolisme primaire car ils sont essentiels à la croissance de la plante. Les acides gras sont les précurseurs des principaux lipides membranaires : les glycérolipides mais également des sphingolipides. Chez les plantes supérieures, la cutine (parties aériennes), subérine (racines) et sporopollenine (pollen) sont des polymères d'acides gras (*Kunst et Samules 2003*). Ces cires sont déposées à la surface des parois cellulaires pour contrôler les flux d'eau et pour lutter contre les stress biotiques et abiotiques (*Li et al, 2016*). Les acides gras sont aussi les précurseurs de phytohormones comme l'acide jasmonique, qui régule le développement de la plante et joue un rôle dans la protection aux pathogènes (*Blée 2002*). Enfin, les acides gras sont les briques essentielles à la synthèse des lipides de stockage (Triacylglycérol, TAG).

Introduction

La diversité de ces composés se traduit par des implications dans des processus différents. Les TAG sont des molécules de stockage d'énergie. Les biopolymères jouent un rôle dans la protection de la plante contre les stress. Les lipides membranaires ont un rôle structural, étant responsables de la compartimentation de la cellule. Des composés hydrophobes sont aussi impliqués dans la signalisation cellulaire comme les phytohormones ou le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, qui, hydrolysé par des phospholipases C, libère le second messenger inositol triphosphate et du diacylglycérol, rapidement phosphorylé pour former de l'acide phosphatidique (AP) (Meijer et Munnik 2003). Enfin, certains lipides comme l'AP sont présents dans les membranes et jouent également un rôle dans la signalisation (Wang 2004).

C. Focus sur les glycérolipides

Les cellules végétales renferment, comme toutes les cellules eucaryotes, différents compartiments intracellulaires, avec d'une part le système endomembranaire comprenant le réticulum endoplasmique, l'enveloppe nucléaire, l'appareil de Golgi, le réseau trans-golgien, la vacuole et la membrane plasmique et d'autre part, des organites semi-autonomes issus de l'endosymbiose de bactéries ou d'archées au cours de l'évolution: la mitochondrie et le chloroplaste (Zimorski et al 2014). Ces organites sont délimités par une enveloppe composée d'une membrane interne (IEM, Inner Envelope Membrane) qui correspond à la membrane de l'organisme endocyté et d'une membrane externe (OEM, Outer Envelope Membrane), qui provient de la cellule hôte.

Chaque membrane de la cellule est composée d'une bicouche lipidique principalement formée par des glycérolipides, excepté pour les gouttelettes lipidiques qui sont uniquement délimitées par une monocouche de glycérolipides (Penno et al 2013). La composition en glycérolipides des membranes est spécifique du compartiment auquel elle appartient. Ainsi, les membranes du système endomembranaire et celles des mitochondries sont riches en phospholipides (Joyard et al, 1998) alors que celles du chloroplaste sont riches en glycolipides comprenant les galactolipides et les sulfolipides (Joyard et al 1998, Petroustos et al 2014). La monocouche des gouttelettes lipidique est quant à elle composée uniquement de phospholipides (Penno et al 2013).

Les glycérolipides sont constitués d'un squelette glycérol sur lequel sont liés deux acides gras par une liaison ester, formant ainsi la molécule de diacylglycérol (DAG). La position des acyls estérifiés sur le glycérol est appelée "stereospécific number" (*sn*), les acides gras étant liés au niveau *sn*-1 et/ou *sn*-2. Les lipides polaires, constituants majeurs des membranes, possèdent en plus un groupement polaire sur la position *sn*-3 (**Figure 5. A**). En fonction de leurs têtes polaires, les glycérolipides membranaires peuvent être classés en deux catégories distinctes : les phospholipides, dont le représentant majeur est la phosphatidylcholine (PC) et les glycolipides dont la tête polaire est constituée de sucre, comme les galactolipides qui contiennent du galactose (**Figure 5. C**). Les acides gras constituent la partie apolaire ou hydrophobe de la membrane et se retrouvent au centre de la bicouche lipidique,

Introduction

tandis que les têtes polaires des glycérolipides se situent à l'extérieur de la bicouche (**Figure 5. D**).

Lorsqu'un troisième acide gras est estérifié en position *sn*-3, un triacylglycérol (TAG) est formé (**Figure 5. B**). Les TAG sont les lipides de stockage de la cellule, ils sont accumulés au niveau des gouttelettes lipidiques et ne sont pas impliqués dans la formation des membranes contrairement aux autres glycérolipides.

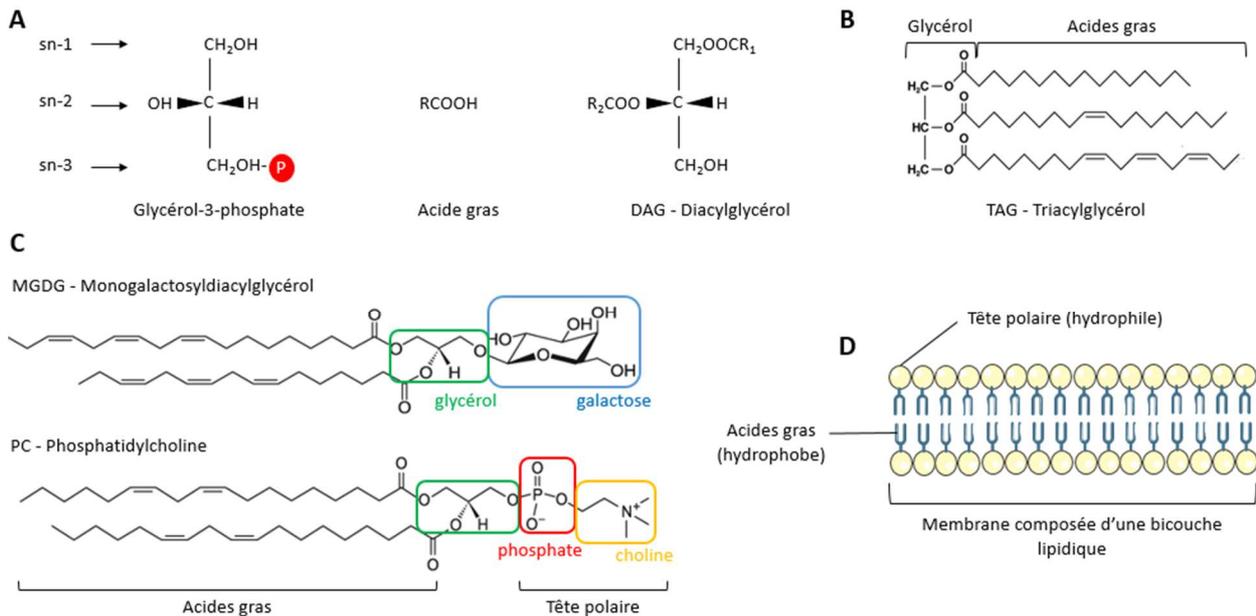


Figure 5 : Structure générale des glycérolipides. A) Le glycérol 3-phosphate et le diacylglycérol sont les précurseurs de tous les glycérolipides. Les acides gras en position *sn*-1 et *sn*-2 sont composés d'une chaîne carbonée de longueur variable, qui peut comporter des doubles liaisons, aussi appelées insaturations. B) Structure des triacylglycérides (TAG). Le squelette glycérol 3-phosphate est acylé en position *sn*-1, 2 et 3. C) Structures d'un galactolipide, le Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et d'un phospholipide, la Phosphatidylcholine (PC). D) Représentation simplifiée d'une bicouche lipidique.

Objectif de la thèse

Objectif de la thèse

La composition en lipides membranaires et de réserve d'une cellule varie considérablement d'un organisme à l'autre. Chez les plantes supérieures, elle dépend également du tissu considéré : racines, feuilles ou graines. Dans des conditions de croissance optimale, les plantes et les microalgues maintiennent une composition en lipides stable, les flux de synthèse et de dégradation des lipides étant alors finement régulés. Cette homéostasie cellulaire implique des mécanismes de contrôle qui interviennent pour orienter la production de glycérolipides vers les lipides membranaires ou les TAG, moduler les réactions de recyclage et d'interconversion des différentes classes de glycérolipides, permettre le trafic lipidique au sein des membranes et des organites et contribuer à la dégradation des lipides. En condition physiologique, ces mécanismes de régulation privilégient la synthèse des glycérolipides membranaires. Au contraire, lorsque les conditions environnantes ne sont plus optimales, comme en situation de stress, la composition en lipides des cellules est affectée.

Ainsi, chez les plantes supérieures et les microalgues, des conditions de carences en azote et en phosphate induisent une forte accumulation de lipides de réserve concomitante avec un ralentissement de la croissance cellulaire (*Gaude et al 2007, Simionato et al 2013, Abida et al 2015, Pant et al 2015, Shimojima et al 2015*). Dans leur environnement, les végétaux sont souvent soumis à des carences en nutriment : l'accumulation de TAG est une réponse physiologique qui permet aux organismes de constituer une réserve énergétique qui facilite ensuite la reprise de la croissance quand les conditions redeviennent favorables. Durant une carence en phosphate, l'accumulation de lipides de réserve est accompagnée par un remodelage des lipides membranaires. Les phospholipides sont activement dégradés pour rendre disponible le phosphate contenu dans leurs têtes polaires. En parallèle, la production de galactolipides est stimulée et certains comme le DGDG (Digalactosyldiacylglycérol) sont exportés du chloroplaste aux membranes extra plastidiales pour contrebalancer la perte des phospholipides (*Andersson et al 2003, Benning et al 2006, Jouhet et al 2004 et 2007*).

Ces observations dévoilent la remarquable souplesse du métabolisme des lipides et interrogent sur les relations entre glycérolipides membranaires et glycérolipides de stockage. La synthèse des lipides membranaires, prioritaire durant la croissance cellulaire et celle des lipides de stockage, prioritaire en cas de stress, sont-elles en compétition ? Est-ce que l'arrêt de la croissance cellulaire est une condition qui conduit systématiquement à la production de TAG ? Les mécanismes de régulation qui orientent les flux de synthèse soit vers les lipides membranaires soit vers les lipides de réserve sont encore très mal connus. Dans le contexte actuel, où les huiles végétales sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés nutritives et leur potentiel de biocarburant, la connaissance de ces mécanismes est essentielle si l'on veut pouvoir agir sur ces flux et favoriser l'accumulation de TAG.

Dans cette optique, l'objectif de ce projet de thèse est de caractériser les voies de biosynthèse des TAG. Ce travail a été réalisé chez la plante supérieure *Arabidopsis thaliana*, organisme modèle en biologie mais également sur la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* candidat potentiel à un scale-up industriel pour la production de biocarburants. Nous avons cherché à

Objectif de la thèse

comprendre les mécanismes à l'origine de la balance entre synthèse des lipides membranaires et synthèse des lipides de stockage. Pour cela, des cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* et de microalgues ont été placées dans différentes situations de croissance : croissance optimale (condition où l'expansion membranaire est maximale et la synthèse des lipides de réserve minimale), apports nutritionnels limitants (carence en azote, condition connue pour provoquer une accumulation des lipides de réserve) ou par l'addition de petites molécules identifiées au laboratoire par une approche de criblage à haut débit, pour leur capacité à augmenter la teneur en TAG. Cette dernière condition est aussi appelée stratégie de génétique chimique. En particulier, nous avons étudié le mode d'action des molécules qui inhibent la croissance cellulaire ou qui affectent de manière spécifique les voies métaboliques associées à la production des lipides. L'analyse de la composition en lipide de ces différentes situations et l'identification des gènes impactés nous ont permis d'identifier certaines étapes de production des lipides qui sont activées / inactivées en fonction des conditions de culture, étapes potentiellement clés dans l'orientation du métabolisme vers les lipides de réserve et qui pourront éventuellement servir de levier dans une approche d'ingénierie ciblant la production de TAG.

Données Bibliographiques

I. Modèles végétaux

A. Plante : *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est une petite plante à fleur découverte au XVI^{ème} siècle par Johannes Thal dans les montagnes Harz, en Allemagne. C'est une angiosperme de la famille des *Brassicaceae*, qui inclue également des plantes cultivées comme le radis et le chou. Son petit génome, composé au total de 125 mégabases, réparties sur cinq chromosomes et a été complètement séquencé en 2000 (Tair : <https://www.arabidopsis.org/>). Son cycle de vie est considéré comme rapide pour une plante et il est composé d'environ 6 semaines entre la germination de la graine et la production de nouvelles graines par la plante mature. *A. thaliana* est facilement cultivable en laboratoire et l'obtention de mutants est réalisable par transformation avec la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Ne possédant aucun intérêt agronomique, les données obtenues sur la plante sont partagées au sein de la communauté scientifique. De ce fait, l'utilisation de la plante *Arabidopsis* permet de s'appuyer sur un modèle de recherche végétal aux données génomiques complètes et disponibles, permettant de réaliser des études génétiques et moléculaires.

De plus, au laboratoire nous disposons de cultures cellulaires de méristème foliaire d'*Arabidopsis*, modèle qui permet de mettre en place dans des conditions expérimentales simples, la stratégie de génétique chimique sur laquelle s'appuie une partie de cette thèse. En effet, le milieu de culture liquide des cellules facilite l'exposition de ces dernières aux différents traitements que nous avons réalisés.

Au niveau du métabolisme des lipides, *A. thaliana* est une plante de type C16:3. Elle est caractérisée par la présence de deux voies de biosynthèse des galactolipides : la voie eucaryote et procaryote qui sont détaillées page 28.

B. Diatomée: *Phaeodactylum tricornutum*

La dénomination "microalgues" regroupe des organismes unicellulaires et photosynthétiques procaryotes (cyanobactéries : *Cyanophyceae*) et eucaryotes (algues vertes : *Chlorophyta*, diatomées : *Bacillariophyceae*,...) (Da Costa et al 2016). *Phaeodactylum tricornutum* est une algue unicellulaire, retrouvées au sein du phytoplancton des mers et océans et faisant partie du phylum Hétérokonte ou Straménopile. *Phaeodactylum* fait partie de la classe des *Bacillariophyceae* (diatomées) et a été décrite pour la première fois par K. Bohlin en 1898 (<http://www.algaebase.org>). Pour le genre *Phaeodactylum*, différentes espèces existent. Au sein du laboratoire, nous travaillons sur l'espèce *tricornutum* et plus particulièrement sur la souche de *Phaeodactylum tricornutum* : Pt1 (souche 8.6 CCMP2561) issue de la collection du NCMA aux Etats-Unis ("Culture Collection of Marine Phytoplankton, National Center for Marine Algae and Microbiota").

II. Métabolisme des glycérolipides

Les glycérolipides sont une classe majeure de lipides dans toutes cellules. Ils englobent les lipides membranaires : phosphoglycérolipides, glyco glycérolipides, bétaine glycérolipides ainsi que les lipides neutres triacylglycérides.

A. Synthèse des précurseurs

Les glycérolipides résultent de l'assemblage d'acides gras avec un squelette glycérol. Dans le cas des lipides membranaires, deux acides gras et un groupement polaire sont associés au glycérol. Tandis que pour les lipides neutres (TAG), trois acides gras sont acylés sur le squelette glycérol. Dans les deux cas, différentes étapes sont nécessaires à cet assemblage, à commencer par la synthèse des acides gras, du diacylglycérol (DAG) et de l'acide phosphatidique (AP), les précurseurs des glycérolipides.

1. Synthèse des acides gras

La synthèse des acides gras s'effectue dans le stroma des chloroplastes des tissus photosynthétiques ou dans les leucoplastes pour les tissus non photosynthétiques (*Chapman et Ohlrogge 2012*). Elle est dépendante de l'approvisionnement du chloroplaste en substrats carbonés provenant de la glycolyse : le pyruvate, qui est transformé en acétyl-coenzyme-A (*Chapman et Ohlrogge 2012, Li-Beisson et al 2010*). Comme présenté sur la **Figure 6**, sous l'action d'ACETYL-COA CARBOXYLASES (ACCases), l'acétyl-CoA subit une carboxylation irréversible pour former du malonyl-CoA. Le groupement malonyl est transféré par la MCMT, MALONYL-COA : ACP MALONYLTRANSFERASE, à une protéine ACYL CARRIER (ACP ou ACBP) ce qui donne du malonyl ACP (*Joyard et al 2010*). Le malonyl ACP est le principal substrat du complexe multienzymatique de l'acide gras synthase de type II : fatty acid synthase, FASII (*Durrett et al 2008*). Le complexe FASII catalyse la condensation répétée de groupements malonyl-ACP sur l'acyl-ACP, permettant au final le transfert de 2 carbones à chaque cycle. Chaque cycle est composé de quatre réactions. La première étape est catalysée par la première enzyme du complexe FASII, la KETOACYL-ACP SYNTHASE III (KASIII) qui condense un acétyl-CoA avec un malonyl-ACP pour former, suite à une décarboxylation, une molécule de 3-ketoacyl-ACP à 4 carbones. Ce produit est réduit en alcool par la KETOACYL-ACP REDUCTASE (KAR), NADPH-dépendante. La synthèse d'un groupement acyl saturé est ensuite réalisée par l'action successive de la HYDROXYACYL-ACP DESHYDRATASE (HAD) et de l'ENOYL-ACP REDUCTASE (ER). Ce groupement acyl est transféré sur un ACP libre par l'ACP ACYLTRANSFERASE. Puis une deuxième molécule de malonyl-ACP est condensée à l'acyl-ACP précédemment formé (cette fois-ci par KAS I) et le cycle recommence. De cette manière, à chaque cycle deux carbones sont ajoutés. KASI catalyse les réactions des molécules de C4 en C16 puis c'est KASII qui synthétise le 18:0-ACP à partir du 16:0-ACP (*Tai et Jaworski 1993, Joyard et al 2010*). Sept cycles sont nécessaires pour la synthèse du palmitate (C16:0) et huit pour l'acide stéarique (C18:0). Une STEAROYL-ACP Δ^9

DESATURASE intervient ensuite pour catalyser la désaturation du C18:0-ACP en C18:1-ACP. Au terme des réactions de synthèse catalysées par le complexe FASII, du C16:0-ACP, C18:0-ACP et C18:1-ACP sont donc produits dans le stroma des chloroplastes (Cagliari et al 2011). Il a été montré que les étapes catalysées par les ACCases sont déterminantes pour le contrôle de la biosynthèse des acides gras. L'activité de ces enzymes est régulée par de nombreux mécanismes comme la lumière et le cycle jour/nuit (Shintani et Ohlrogge 1995, Post-Beittenmiller et al 1991 et 1992), des mécanismes de phosphorylation et d'oxydoréduction, la protéine PII et par le rétrocontrôle ou "feed-back" du malonyl-CoA (Baud et Lepiniec 2010).

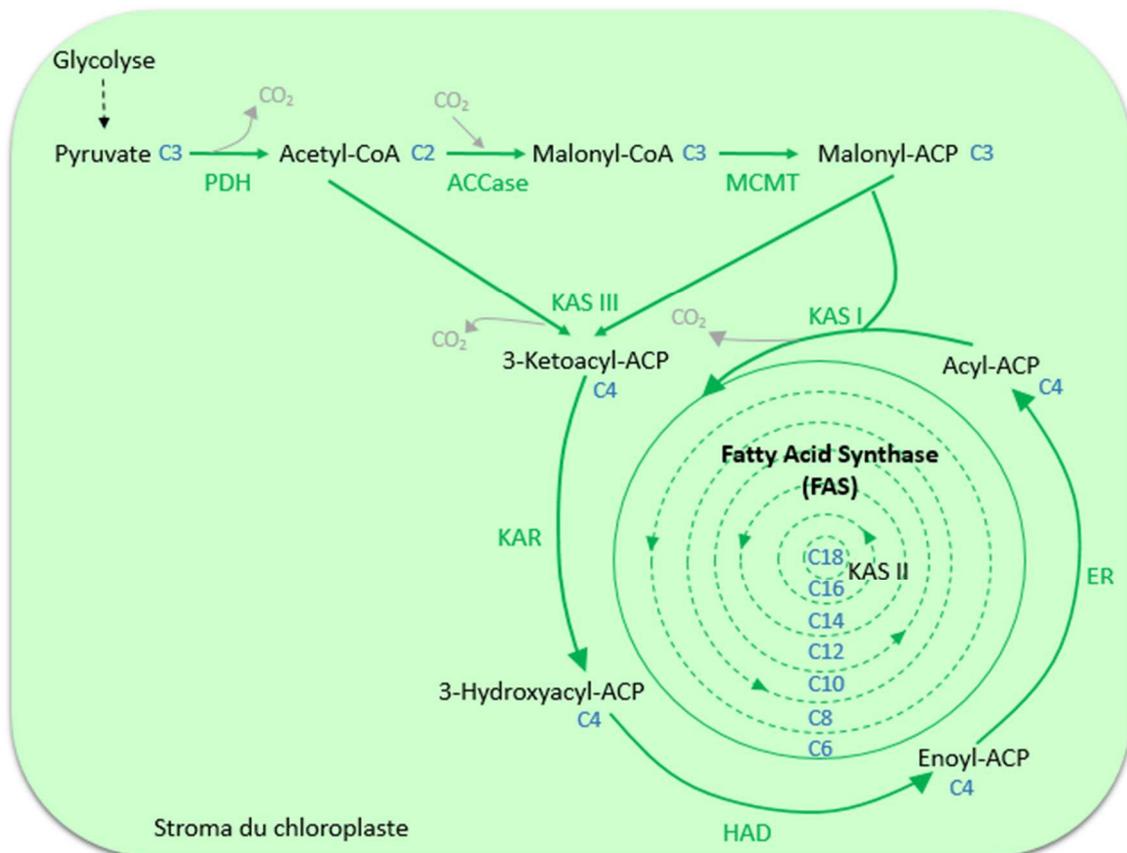


Figure 6 : Synthèse et élongation des acides gras dans le stroma du chloroplaste. La synthèse des acides gras est alimentée par les produits de la glycolyse. Sous l'action du complexe multienzymatique FASII, la condensation successive des molécules de malonyl-ACP et d'acyl-ACP permet de synthétiser les principales molécules d'acides gras: C16:0-ACP, C18:0-ACP et C18:1-ACP. L'insaturation sur la molécule de C18:1-ACP est catalysée par la STEAROYL-ACP Δ^9 DESATURASE. PDH: PYRUVATE DESHYDROGENASE, ACCase: ACETYL-CoA CARBOXYLASE, MCMT : MALONYL-CoA : ACP MALONYLTRANSFERASE, KASIII : KETOACYL-ACP SYNTHASE III, KAR : KETOACYL-ACP REDUCTASE, HAD : HYDROXYACYL-ACP DESHYDRATASE, ER : ENOYL-ACP REDUCTASE, KASII : KETOACYL-ACP SYNTHASE II, KAS I : KETOACYL-ACP SYNTHASE I. Le nombre d'atomes de carbone de chaque molécule est représenté en bleu. Schéma adapté de http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/fatty_acid_synthesis

a. Traffic des acides gras

i. *Export du chloroplaste*

Les FATTY ACID THIOESTERASES (acyl-ACP hydrolases) FATA et FATB catalysent l'hydrolyse des acides gras-ACP en acides gras libres (**Figure 7. A**). Chez les plantes, FATA semble avoir une préférence pour hydrolyser l'oléate (18:1), alors que FATB ne semble pas spécifique (*Salas et Ohlrogge 2002*). Chez *Arabidopsis*, l'acide oléique (18:1) est le plus exporté, suivi de l'acide palmitique (16:0) et de l'acide stéarique (18:0) (*Browse et al 1986*). Les interactions entre le complexe FASII, la désaturase delta 9 et ces thioestérasas sont déterminantes pour réguler la production des acides gras et leur export hors du plaste (*Voelker et Kinney 2001*). Longtemps, il a été suggéré que ces acides gras libres diffusaient passivement dans l'enveloppe du chloroplaste (*Koo et al 2004, Kunz et al 2009*). Cependant, les acides gras libres sont toxiques pour la cellule et leur temps de demi-vie est court, ce qui en fait un pool d'acides gras marginal dans le chloroplaste. Des études récentes tendent à favoriser un transport actif des acides gras du stroma du chloroplaste vers l'espace inter-membranaire par le transporteur FAX1 (*Li et al 2015 et 2016*). La famille FAX (FATTY ACID EXPORT) est composée de 7 protéines : FAX2, 3 et 4 sont également prédites pour être chloroplastiques. Les acides gras sont ensuite pris en charge par la LACS9, une "LONG CHAIN FATTY ACYL-COA SYNTHETASE", qui estérifie les acides gras libres en acyl-CoA. Bien que LACS9 catalyse 90% de l'activité du chloroplaste pour la synthèse d'acyl-CoA, l'absence de phénotype lié à son inactivation suggère la présence d'autres LACS plastidiales (*Schnurr et al 2002*).

ii. *Transport au réticulum endoplasmique*

Les acyl-CoA, libérés dans le cytosol par les LACS9, peuvent être adressés aux LACS1/2/4/8 présentes sur la membrane du réticulum endoplasmique (**Figure 7. A**). Ils peuvent aussi être pris en charge par des ACP (ACYL CARRIER PROTEINS), impliquées dans le transport des acides gras vers le réticulum endoplasmique. La famille d'ACP ACBP4-6 est localisée dans le cytosol et possède une meilleure affinité pour le C18:1 que pour le C16:0. De manière intéressante, ces protéines sont aussi capables de lier le lipide membranaire phosphatidylcholine (PC) et sont impliquées dans le remodelage lipidique, par exemple dans les mécanismes de tolérance au gel pour ACBP6 (*Chen et al 2008, Liao et al 2014*). La protéine membranaire ABC9A fait partie de la famille des transporteurs ABC, sous famille A et est décrite comme étant impliquée dans l'import des acides gras dans le réticulum endoplasmique (*Kim et al 2013*). Localisée à la membrane du réticulum endoplasmique, elle est exprimée durant le développement des graines. La mutation de cette protéine entraîne une division par deux de la quantité de lipide de réserve de la plante.

iii. *Retour au chloroplaste*

Dans le réticulum endoplasmique, les acides gras participent à la synthèse des glycérolipides et subissent des modifications, comme l'ajout de doubles liaisons (voir page 25). Chez *Arabidopsis*, l'assemblage des galactolipides dans le plaste utilise le précurseur DAG, provenant aussi bien de la voie procaryote (synthétisé dans le plaste) ou eucaryote

(provenant du réticulum endoplasmique). Bien que l'utilisation d'acide gras provenant de la voie eucaryote pour synthétiser les glycérolipides plastidiaux soit connue depuis longtemps, les mécanismes impliquant le transport des acides gras du réticulum endoplasmique vers le chloroplaste ne sont pas encore élucidés. Récemment, il a été montré que le transporteur TGD (COMPLEXE TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL) pourrait jouer un rôle dans l'import de l'acide phosphatidique (AP) (Wang et al 2012, Hurlock et al 2014) (**Figure 7. B**). Le complexe TGD fait partie de la famille des transporteurs ABC. La sous unité TGD4, présente dans la membrane externe du plaste, lie l'AP (Wang et al 2012 et 2013). L'AP est pris en charge dans l'espace inter-membranaire par TGD2, puis par la sous-unité TGD1, perméase de la membrane interne du chloroplaste. TGD3 est une ATPase présente dans le stroma du chloroplaste qui fournit à l'ensemble du système l'énergie nécessaire pour le transport de l'AP. Et TGD5 pourrait faciliter le transfert entre la membrane externe et la membrane interne du chloroplaste en rapprochant TGD4 et TGD1-3 via des interactions protéines-protéines. Il semble aussi que ce mécanisme de transport soit unidirectionnel, allant uniquement du réticulum endoplasmique vers le plaste (Xu et al 2010). L'AP importé sert de précurseur aux molécules de DAG et à la synthèse des galactolipides (MGDG, DGDG). D'autres modèles pour le ré-import des acides gras vers le chloroplaste évoquent des zones de contacts entre membranes (Wang et Benning 2012). Cela pourrait permettre des échanges de lipide effectués par des enzymes de type flippase (Botella et al 2016) ou bien par un changement de structure du DAG qui, en adoptant une structure de type hexagonal II, pourrait déstabiliser les membranes et permettre des échanges de lipides (Burger 2000, Boudière et al 2012).

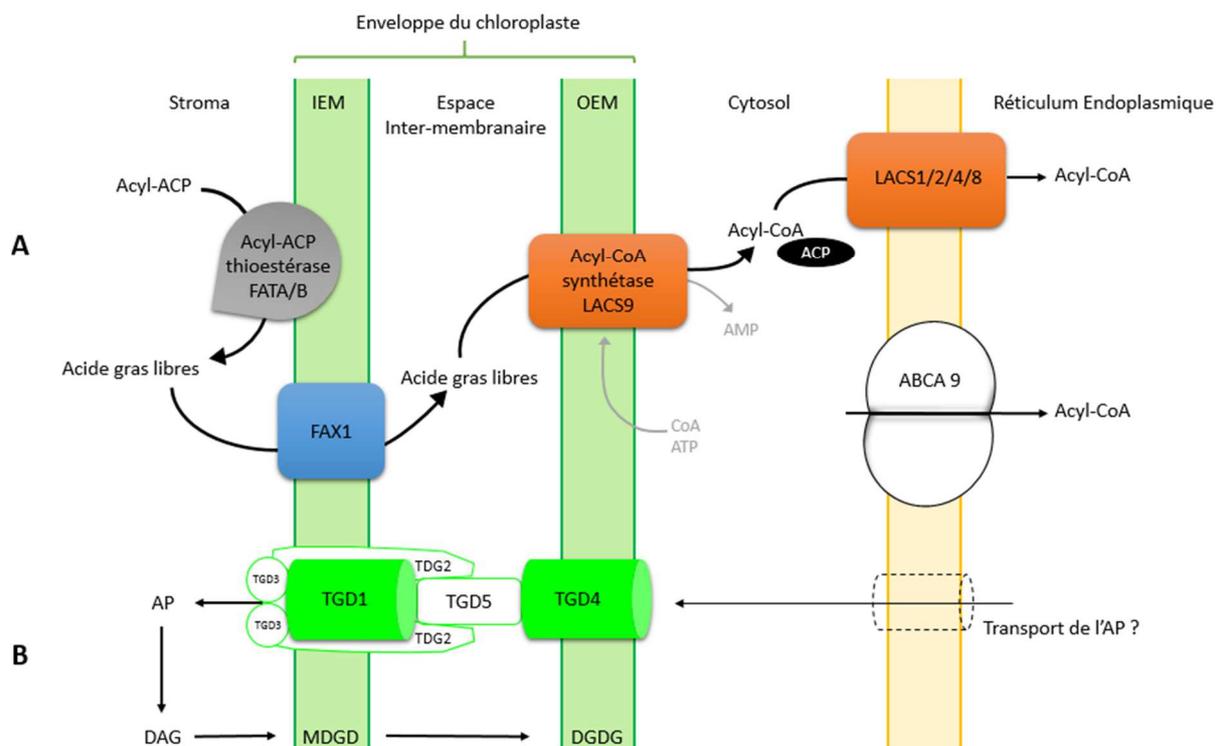


Figure 7 : Trafic des acides gras entre le chloroplaste et le réticulum endoplasmique. A) Export des acides gras produits dans le chloroplaste vers le cytosol et le RE. FATA et FATB

Données bibliographiques

clivent la liaison entre acides gras et ACP. Les acides gras libres sont pris en charge par FAX1 au niveau de l'IEM, puis par l'acyl-CoA synthétase LACS9 au niveau de l'OEM du chloroplaste. LACS9 estérifie les acides gras libres en acyl-CoA. Ceux-ci sont complexés à des ACP dans le cytoplasme et peuvent être internalisés dans le RE par d'autres LACS. Des transporteurs ABC comme ABCA9 sont aussi impliqués dans l'import d'acyl-CoA dans le RE. B) Import des acides gras de la voie eucaryote dans le chloroplaste. Le complexe TGD semble être responsable de l'import de l'acide phosphatidique provenant du RE dans le chloroplaste. L'AP est le précurseur du DAG et des galactolipides MGDG et DGDG. ACP: ACYL CARRIER PROTEINS, FATA/B: FATTY ACID THIOESTERASE, FAX1: FATTY ACID EXPORT, LACS1/2/4/8: LONG CHAIN FATTY ACYL-COA SYNTHETASE, ABCA 9: Transporteur ABC, TGD1/2/3/4/5: COMPLEXE TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL, IEM: inner envelope membrane, OEM: outer envelope membrane, AP : acide phosphatidique, DAG : diacylglycérol, MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, CoA : co-enzyme A, ATP : adénosine triphosphate, AMP : adénosine monophosphate.

iv. Transport aux peroxysomes

Chez les plantes, la β -Oxydation des acides gras est exclusivement localisée dans les peroxysomes et représente la voie majeure de dégradation des acides gras en acetyl-CoA (**Figure 8**). Elle est essentielle lors de la germination des graines car elle permet à la plante d'exploiter l'énergie stockée dans les lipides de réserve pour sa croissance. L'import des acides gras à la membrane des peroxysomes est assurée par un transporteur de type ABCD (*Theodoulou et al 2006*). La protéine est connue sous plusieurs noms : ABCD1, PAX1 (PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER 1), CTS (COMATOSE) ou PED3 (PEROXISOMAL DEFECTIVE 3). PAX1 peut aussi lier d'autres métabolites comme les précurseurs des hormones lipophiliques et les précurseurs du métabolisme de l'acétate (*Hooks et al 2007*). Des interactions entre PAX1 et LACS6/7 ont été démontrés à la surface du peroxysome.

v. Transport à la membrane plasmique

Chez les plantes, trois types de biopolymères hydrophobiques ou "lipides de surface" sont présents sur la paroi cellulaire pour contrôler le flux d'eau et protéger les plantes des stress biotiques et abiotiques : les cires et les cutines au niveau de la couche cuticulaire de l'épiderme des cellules, la subérine dans le périderme, l'endoderme des racines et le manteau des graines et la sporopollenine / tryphine présente dans les parois des pollens. La synthèse de ces composés est effectuée dans le réticulum endoplasmique à partir d'acides gras et leur transport s'effectue principalement via des contacts entre membrane plasmique et réticulum endoplasmique mais également avec le concours de protéines ACP comme les ACBP1 et 2 (ACYL-COA BINDING PROTEIN 1 and 2) qui possèdent un domaine transmembranaire qui permet leur liaison au réticulum endoplasmique et à la membrane plasmique (*Xiao et Chye, 2011*) (**Figure 8**).

Données bibliographiques

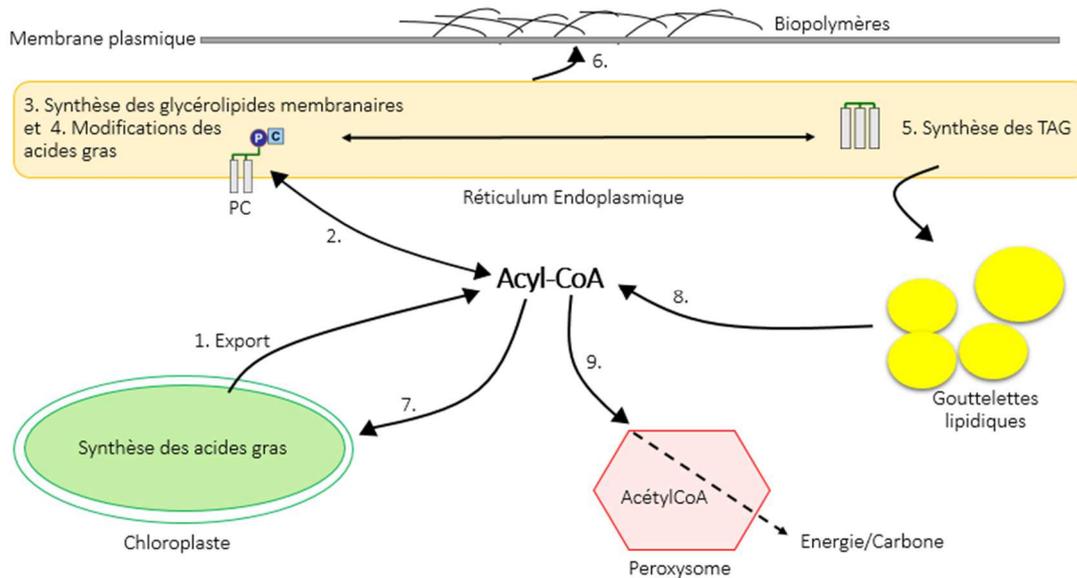


Figure 8 : Flux des acides gras dans une cellule végétale. Les acides gras sont synthétisés dans le stroma des chloroplastes et exportés vers le cytosol (1) où ils sont complexés à une molécule de coenzyme A et rejoignent le pool d'acyl-CoA. Ils peuvent être internalisés par le réticulum endoplasmique (2) et participer à la synthèse des glycérolipides membranaires de la voie eucaryote (3). Ils sont aussi utilisés pour la synthèse des glycérolipides de réserves (5) et des biopolymères comme les cires (6). C'est également dans le réticulum endoplasmique qu'ils subissent des modifications (maturations), comme l'ajout de doubles liaisons (4). Une fois modifiés, ils peuvent rejoindre le pool cytosolique d'acyl-CoA (2) et participer à la synthèse des glycérolipides membranaires du chloroplaste (7). La dégradation des molécules de TAG libère des acides gras (8). Les acyl-CoA peuvent être dégradés par le peroxysoxe qui libère de l'acétyl-CoA, disponible pour d'autres synthèses et alimenter la respiration (9). PC : phosphatidylcholine, TAG : triacylglycérol.

b. Modifications des acides gras

La modification la plus courante des acides gras est la désaturation, qui consiste à créer des doubles liaisons au sein de leur chaîne carbonée. Dans les tissus végétaux, les glycérolipides sont d'abord synthétisés majoritairement en utilisant des acides gras 16:0 et 18:1. La désaturation des acides gras est ensuite réalisée sur les glycérolipides par des désaturases au sein des chloroplastes ou du réticulum endoplasmique (Heinz 1993). Excepté la STEAROYL-ACP Δ^9 DESATURASE qui intervient directement après la synthèse des acides gras pour transformer le 18:0 en 18:1, toutes les désaturases sont liées aux membranes. Sept classes de FATTY ACID DESATURASE (FAD) existent : FAD4 à 8 sont présentes dans le chloroplaste et FAD2 et 3 dans le réticulum endoplasmique (Figure 9). Seules les enzymes FAD4 et 5 semblent avoir une spécificité pour leur substrat. Le gène *FAD4* code pour une Δ^3 désaturase qui insère une double liaison *trans* sur l'acide gras 16:0 positionné en *sn-2* du glycérolipide phosphatidylglycérol (PG) (Dembitsky et Srebnik 2002). Tandis que FAD5 permet de rajouter une double liaison en position Δ^7 sur les acides gras de type 16:0 du MGDG et possiblement

du DGDG (Ohlrogge et Browse 1995, Dormann et Benning 2002). Les trois autres désaturases plastidiales : FAD6, 7 et 8 catalysent l'addition de doubles liaisons en cis (**Figure 10**), a priori sans spécificité apparente pour la longueur de l'acide gras (C16 ou C18), sa position sur le squelette glycérol (*sn*-1 ou *sn*-2) ou la nature du glycérolipide chloroplastique (Wallis et Browse 2002). Dans le chloroplaste, FAD6 est responsable de la désaturation des espèces 16:1/18:1 (Browse et al 1989), alors que FAD7 et 8 désaturent le 16:2 et le 18:2 (Miquel et Browse 1992, Browse et al 1993). Dans le réticulum endoplasmique, FAD2 catalyse la réaction de 18:1 en 18:2 et FAD3 de 18:2 en 18:3. Ces FAD agissent sur les acides gras de la PC mais pourraient agir sur d'autres phospholipides comme la phosphatidyléthanolamine (PE). Des études montrent que FAD2 et FAD3 pourraient former un hétérodimère et permettre un passage direct (channeling) du niveau d'insaturation 18:1 à 18:3, sans libérer la forme intermédiaire 18:2 dans le milieu extérieur (Lou et al 2014).

La formation de doubles liaisons par les FAD s'effectue par un mécanisme aérobie qui demande du pouvoir réducteur. Les électrons sont apportés par les molécules de NADH ou de NADPH qui réduisent le cytochrome b5, cofacteur des FAD. En présence d'oxygène, deux molécules d'eau sont libérées et la double liaison est créée (Harwood 1996).

Le niveau global de désaturation des glycérolipides peut aussi être impacté par des mutations sur certaines enzymes catalysant la synthèse des acides gras. Par exemple les mutants d'*A. thaliana fab1* et *fab2* (fatty acid biosynthesis) présentent une augmentation des niveaux d'acides gras 16:0 et 18:0 pour tous les glycérolipides, dans les graines et les feuilles respectivement (James et Dooner 1990, Wu et al 1994). Le mutant *fab1* est caractérisé par une réduction de l'activité de l'enzyme KAS II et chez le mutant *fab2*, ce sont les 18:0-ACP désaturases qui sont en cause.

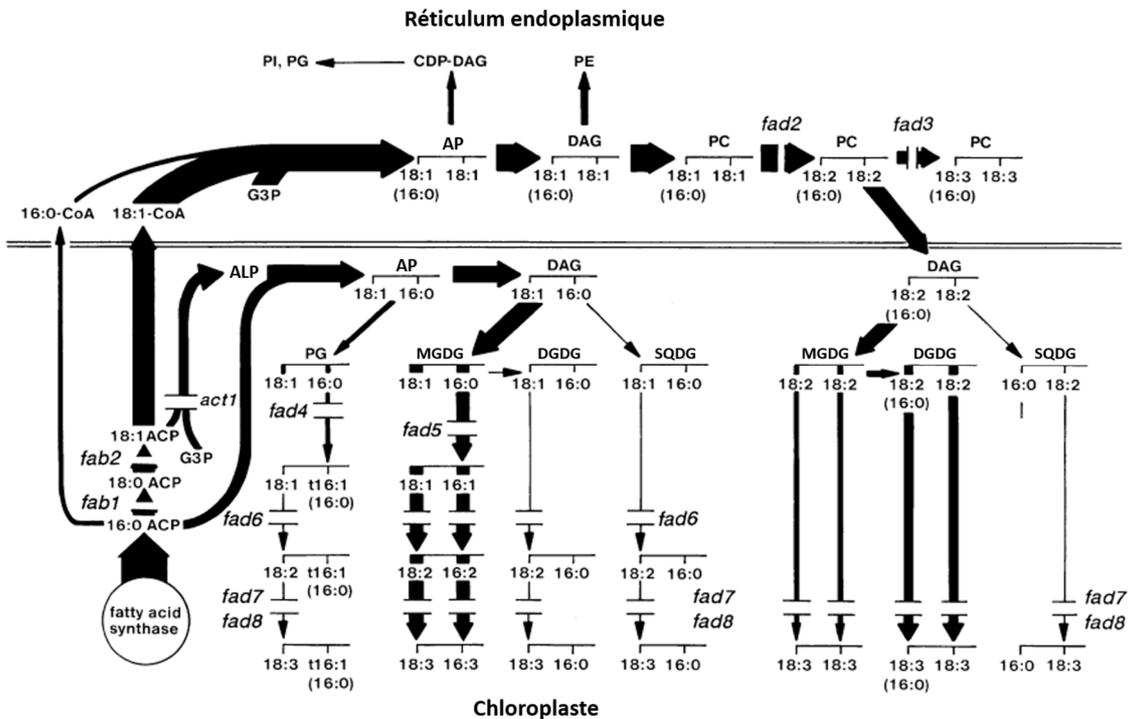


Figure 9 : Schéma de désaturation des glycérolipides membranaires dans le réticulum endoplasmique (haut) et le chloroplaste (bas). Les acides gras sont désaturés sur les

Données bibliographiques

glycérolipides par des FAD d'origines eucaryotes (FAD2/3) ou procaryotes (FAD5 à 8). Dans le réticulum endoplasmique, la PC (phosphatidylcholine) est le site majeur de la mise en place des doubles liaisons carbone-carbone des acides gras, tandis que dans le chloroplaste, le PG (phosphatidylglycérol) et les glycérolipides MGDG, DGDG et SQDG (monogalactosyldiacylglycérol, digalactosyldiacylglycérol, sulfoquinovosyldiacylglycérol) sont le siège de ces insaturations. G3P : glycéril 3 phosphate, ALP : acide lysophosphatidique, AP : acide phosphatidique, DAG : diacylglycérol et CDP-DAG : cytidine di-phosphate diacylglycérol sont les précurseurs des glycérolipides. PE : phosphatidyléthanolamine et PI : phosphatidylinositol sont des phospholipides membranaires. L'épaisseur des flèches représente les flux relatifs des différentes réactions. FAD: FATTY ACID DESATURASE, fab1/2: fatty acid biosynthesis. Source: *Wallis et Browse, 2002*

Au niveau des propriétés structurelles des membranes, l'addition de doubles liaisons augmente la fluidité membranaire, ce qui contribue à l'adaptation de la plante à certains stress environnementaux tels que le froid ou la sécheresse (**Figure 10**), (*Nishida and Murata 1996, Los et al 2013*). Par ailleurs, le niveau d'insaturation des acides gras aurait également une influence plus spécifique, par des interactions lipides-protéines, sur certains processus physiologiques tels que la photosynthèse. En effet, les glycérolipides présentant des groupements acyls insaturés stabilisent certaines sous-unités de la machinerie photosynthétique (en particulier au niveau du photosystème II), dans les membranes thylacoïdiennes (*Moon et al 1995*).

Chez *Arabidopsis*, la principale modification des acides gras consiste en leur désaturation mais chez certaines espèces végétales comme le ricin commun (*Ricinus communis*), les acides gras peuvent subir d'autres modifications comme l'ajout d'un groupement hydroxyl (*Kroon et al 2006, Cagliari et al 2011*).

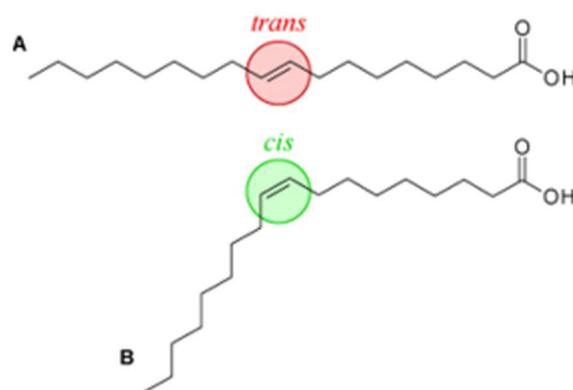


Figure 10 : Impact du positionnement d'une insaturation en trans (A) ou en cis (B) sur la morphologie d'un acide oléique (18:1).

c. Plantes en C16 versus C18

Considérant le métabolisme des acides gras, les plantes peuvent être classées en deux catégories : les plantes en C18 et les plantes en C16. Dans de nombreuses plantes comme le pois et le riz, le PG est le seul produit 100% procaryote, alors que les autres galactolipides sont synthétisés par la voie eucaryote. Ces plantes sont appelées en C18 car les différents galactolipides contiennent principalement du linoléate (18:3), provenant d'un DAG eucaryote obligatoirement réimporté dans le plaste. Chez les plantes en C16, comme *A. thaliana*, la majorité des acides gras produits dans les plastes sont exportés vers le réticulum endoplasmique (62%) pour leur maturation et la participation à la synthèse des glycérolipides et en particulier des phospholipides (la voie eucaryote) (**Figure 9**) (*Li et al 2016*). En parallèle, le reste des acides gras (38%) est incorporé et modifié dans les glycérolipides plastidiaux, la voie procaryote. Dans les chloroplastes, la *sn*-2 acyltransférase, enzyme qui transfère un acide gras sur un squelette glycérol en position *sn*-2 est spécifique des acides gras en C16 (*Browse et al, 1986*). Les acides gras dit eucaryotes sont réimportés dans le chloroplaste pour participer à la synthèse de MGDG et DGDG (*Browse et al 1986, Browse et Somerville 1991*). Chez les plantes en C16:3 (*Arabidopsis*, épinard ou colza), les deux voies eucaryotes et procaryotes participent à la synthèse des galactolipides. Ces derniers portent ainsi une signature d'acides gras eucaryote (18:3) et procaryote (16:3).

2. Synthèse de l'acide phosphatidique (AP)

L'acide phosphatidique (AP) est le précurseur de tous les glycérolipides car il est néosynthétisé à partir d'acides gras et de glycérol 3-phosphate (**Figure 11**). Et il est aussi un phospholipide membranaire impliqué dans la signalisation moléculaire et la réponse aux stress. Il représente 1 à 5% du total des glycérolipides dans les feuilles et sa concentration est drastiquement augmentée en cas de stress (*Dubots et al 2013, Wang et al 2006*).

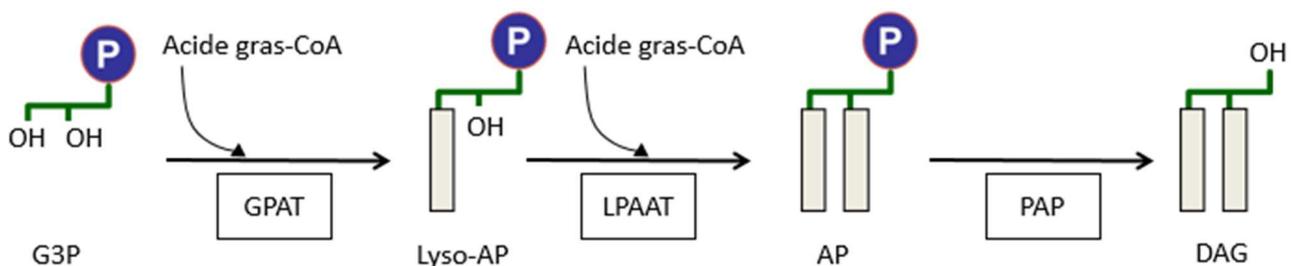


Figure 11 : Néosynthèse de l'acide phosphatidique (AP) et du diacylglycérol (DAG). Le glycérol 3-phosphate (G3P) subit deux acylations successives en *sn*-1 puis *sn*-2 sous l'action des GPAT (*sn*-GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE) et des LPAAT (LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE) pour former l'acide lysophosphatidique puis l'acide phosphatidique (AP). Des phosphatases de types PAP (PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASES) retirent la tête polaire de l'AP pour former du DAG (diacylglycérol).

a. Voies de synthèses procaryote et eucaryote

Les deux étapes qui conduisent à la synthèse du PA, catalysées par les enzymes GPAT et LPAAT, sont essentielles. En effet, quand l'une ou l'autre des protéines n'est plus fonctionnelle, un phénotype létal est observé (Kim et al 2005, Shockey et al 2016).

Le glycérol 3-phosphate subit une première acylation sous l'action d'une GPAT (sn-GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE) qui transfère un acide gras en position *sn*-1 pour former de l'acide lysophosphatidique (**Figure 11**) (Liu et al 2013). Selon leur localisation, les GPAT peuvent être classées en trois catégories, les GPAT plastidiales, endoplasmiques et mitochondriales. L'acide phosphatidique peut ainsi être synthétisé dans le chloroplaste (voie procaryote), dans le réticulum endoplasmique (voie eucaryote) mais également dans les mitochondries. Il existe de nombreuses isoformes de GPAT qui peuvent être impliquées dans différentes voies métaboliques. Ainsi, la GPAT9 localisée au niveau du réticulum endoplasmique est engagée dans la production de lipide de réserve chez la graine (Shockey et al 2016) mais également des TAG et des lipides polaires dans les feuilles (Singer et al 2016), contrairement aux isoformes 4 à 8 qui permettent la synthèse de la subérine et de la cutine (Yang et al 2012). Dans les plastes, la GPAT ou ATS1 est associée à l'enveloppe (Joyard et Douce 1977) et a une plus forte affinité pour les acides gras 18:1-ACP, alors que les GPAT du réticulum endoplasmique utilisent indifféremment les espèces 16:0-CoA et 18:1-CoA (Frentzen et al 1983). L'acide lysophosphatidique est ensuite pris en charge par une LPAAT (LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE) qui acyle la position *sn*-2. Parmi les différentes isoformes exprimées dans le réticulum endoplasmique chez Arabidopsis, la LPAAT2 est vitale pour la plante (Kim et al 2005). Les LPAAT plastidiales ou ATS2 utilisent préférentiellement les 16:0-ACP, tandis que dans le réticulum il existe une spécificité pour le 18:1 (Frentzen 1990). L'AP a donc une signature en *sn*-2 : C16 quand il est d'origine procaryote et C18 quand il est d'origine eucaryote.

b. Rôle dans la signalisation

L'acide phosphatidique est une molécule signal chez les animaux et les plantes. Chez les végétaux, il agit comme un second messager lors de stress d'origine biotique et abiotique (Testerink et Munnik 2005). La particularité des molécules signaux est que leurs concentrations doivent être finement régulées, avec un turn-over élevé pour être produits rapidement et de manière transitoire en fonction des besoins. L'AP peut être synthétisé *de novo* comme décrit ci-dessus mais dans le cas de la signalisation, il est principalement synthétisé à partir de lipides membranaires préexistants. Ainsi les PHOSPHOLIPASES D (PLD) peuvent rapidement hydrolyser la tête polaire des phospholipides pour générer de l'acide phosphatidique. Une autre voie de synthèse est celle qui résulte de l'action séquentielle des PHOSPHOLIPASES C (PLC) sur le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (Pip₂) et des DIACYLGLYCEROL KINASES (DGK) comme présenté **Figure 12**. Le coproduit du PA, l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) diffuse dans le cytosol et provoque une libération de calcium intracellulaire. Le signal provenant de l'AP peut aussi être atténué par la présence de PAP (PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHORYLASES) qui déphosphorylent la molécule. Chez

Arabidopsis, douze PLD sont prédites ainsi que neuf PLC et sept DGK (Quin et Wang 2002, Hunt et al 2004, Gomez-Merino et al 2004). Un panel de différents stress peut déclencher la production d'AP via l'activation des PLD et PLC (Testerink et Munnik 2005). Les stress osmotiques comme l'augmentation de la salinité et la sécheresse, l'attaque de pathogènes, les stress oxydatifs, le froid et le gel et des blessures stimulent des premiers messagers qui activent à leur tour la production d'AP (Figure 12). L'acide phosphatidique provoque ensuite principalement une activation des ROS (Reactive Oxygen Species) ou des MAPK (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES).

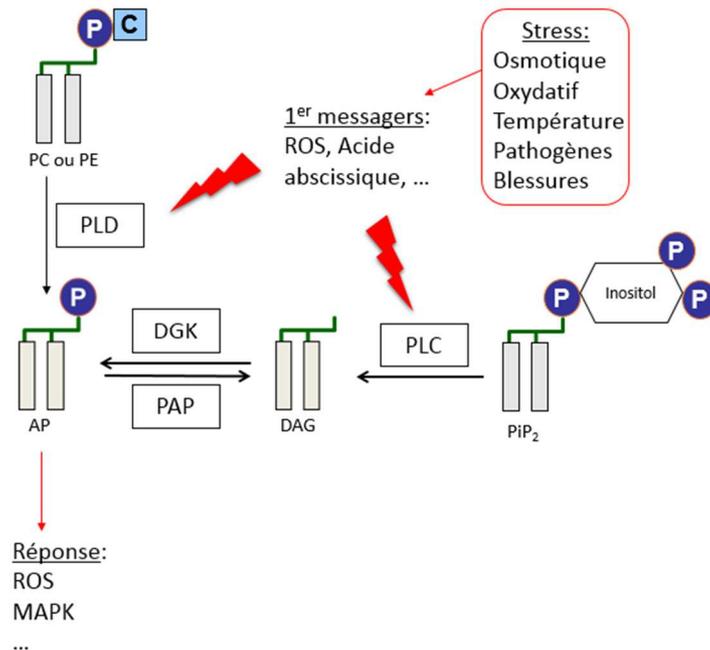


Figure 12 : Synthèse de l'acide phosphatidique (AP) à partir des lipides membranaires. Stimulées par différents stress, les PHOSPHOLIPASES D (PLD) coupent les têtes polaires des phospholipides phosphatidylcholine (PC) ou phosphatidyléthanolamine (PE) en laissant le groupement phosphate. Les PHOSPHOLIPASES C (PLC) enlèvent entièrement la tête polaire des lipides de type PiP₂ (phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate). Le DAG formé est dans un second temps phosphorylé par les kinases DGK (DIACYLGLYCEROL KINASES). PAP : PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASES. Adapté de Testerink et Munnik 2005.

3. Synthèse du diacylglycérol et du cytidine diphosphate-diacylglycérol

Deux voies de biosynthèse coexistent pour produire les glycérolipides, la voie Kennedy utilisant le diacylglycérol (DAG) comme précurseur et la voie CDP-DAG (cytidine diphosphate-diacylglycérol).

a. Synthèse du diacylglycérol (DAG)

Le DAG est synthétisé à partir d'acide phosphatidique par l'action de phosphatases de type PAP qui permettent la coupure du groupement phosphate en *sn*-3. Chez Arabidopsis, 11 gènes codant pour ces phosphatases ont été prédits par homologie de séquence (Li-Beisson

et al 2013) et deux de ces gènes sont des homologues des ACIDE PHOSPHATIDIQUE HYDROLASES (PAH1 et PHA2) chez les levures (Han et al 2006). Les enzymes PAH1 et PAH2 sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique et permettent la synthèse de DAG d'origine eucaryote (Eastmond et al 2010). Elles ont été caractérisées pour leur rôle dans la régulation de l'homéostasie lipidique et la synthèse de PC (Wang et al 2014, Craddock et al 2015). Le DAG produit par PAH1 et PHA2 est aussi le précurseur de la PE, des TAG et des glycolipides du chloroplaste par réimportation du DAG dans l'organite, démontrant l'importance de ces enzymes (Ohlrogge et Browse 1995). Cependant, un double mutant *pah1 pah2* ne présente qu'une faible réduction du niveau de TAG, suggérant que d'autres activités encore non caractérisées doivent prendre le relais pour permettre la formation de DAG dans ce mutant (Eastmond et al 2010). Dans le chloroplaste, l'activité phosphatase a été uniquement détectée pour les plantes en C16. L'enzyme PAP1 est à l'origine du DAG de structure procaryote (Marcel et al 2000). Il existe donc un pool de DAG procaryote issu du chloroplaste et un pool de DAG eucaryote issu du réticulum endoplasmique. Les phosphatases endoplasmiques ou plastidiales sont magnésium (Mg^{2+}) dépendantes, suggérant des mécanismes de régulation via ce co-facteur (Joyard et Douce 1977, Eastmond et al 2010).

La synthèse de DAG peut aussi être réalisée de manière minoritaire à partir de la molécule de MAG (monoacylglycérol) qui est composée d'un squelette glycérol acylé en *sn*-1. L'enzyme LYSO-AP PHOSPHATASE est capable de former du MAG en coupant la tête polaire de la molécule de lyso-AP. La MGAT (ACYL-COA : MONOACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE) intervient ensuite sur la molécule de MAG pour former du DAG par l'acylation de la position *sn*-2. Tandis que chez les animaux, cette voie de synthèse est bien caractérisée -l'action de la MGAT jouant notamment un rôle dans l'absorption des graisses dans l'intestin- elle n'a été mise en évidence qu'à partir des années 2000 chez les plantes (Shekar et al 2002, Parthibane et al 2012).

i. Rôle du DAG dans la signalisation

Chez les animaux, le DAG participe à la signalisation cellulaire, notamment en liant le domaine C1 de protéines de type kinase C (PKC). Cette fonction a longtemps été considérée comme non conservée chez les plantes mais des études récentes tendent à nuancer cette idée (Dong et al 2012). Le DAG a tendance à s'accumuler fortement au bout des tubes polliniques en élongation et l'inhibition des PLC (PHOSPHOLIPASES C) par un traitement spécifique entraîne un arrêt de la croissance (Helling et al 2006). Dans le modèle de plante *A. thaliana*, un stress salin ou une carence en phosphate active les NON SPECIFIC PHOSPHOLIPASES C, NPC4 et NPC5, promouvant une production de DAG (Kocourková et al 2011, Nakamura et al 2005, Gaude et al 2008). Comme vu précédemment, le DAG peut être rapidement converti en AP, qui est lui-même un second messager. Des expériences suggèrent que la signalisation est également induite par le DAG, notamment quand l'application exogène de DAG a un effet plus important que celui produit par l'AP (Pejchar et al 2010).

b. Synthèse du cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG)

Le cytidine diphosphate-diacylglycérol est synthétisé dans les plastes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique grâce à l'action d'une CTP PHOSPHATIDATE CYTIDYLTRANSFERASE qui catalyse la réaction entre une molécule d'AP et de CTP pour former du CDP-DAG et du pyrophosphate. Dans les plastes, le CDP-DAG est le précurseur du phosphatidylglycérol (PG), seul phospholipide synthétisé à partir de la voie procaryote dans les chloroplastes (Andrews et Mudd 1985). Dans le réticulum endoplasmique, le CDP-DAG permet la synthèse des phospholipides phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et du PG d'origine eucaryote (Dubots et al 2013). La mitochondrie est aussi capable de synthétiser de manière indépendante ces lipides membranaires, notamment du PG et du DPG (diphosphatidylglycérol ou cardiolipine) (Frentzen et Griebau 1994, Dubots et al 2013).

B. Métabolisme des glycérolipides membranaires

Les deux classes principales de glycérolipides qui composent les membranes des cellules de plante résultent de l'ajout d'une tête polaire en *sn*-3 du DAG ou du CDP-DAG. Ces glycérolipides membranaires sont les phospholipides et les glycolipides (galactolipides et sulfolipide).

Ils peuvent être également classés en fonction des caractéristiques de leurs têtes polaires, à savoir neutre ou anionique (Figure 13).

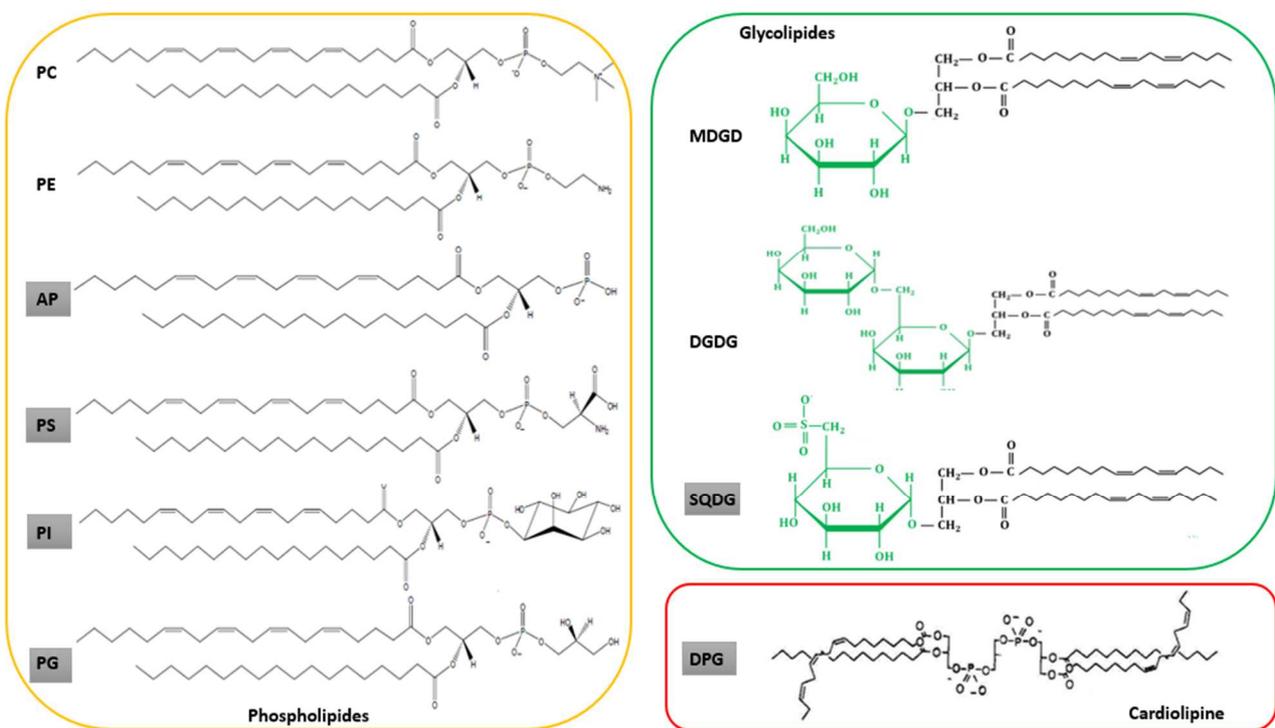


Figure 13 : Structures des principaux glycérolipides des plantes. Tous sont composés d'un squelette glycérol portant deux acides gras en positions *sn*-1 et *sn*-2 et une tête polaire en *sn*-3. Les phospholipides sont représentés en jaune, les galactolipides produits par le chloroplaste, en vert et le DPG ou cardiolipine produit dans la mitochondrie en rouge. En

gris, les glycérolipides anioniques à pH physiologique (autour de 7.5). La PC, PE et le MGDG et DGDG sont neutres. A noter qu'en fonction des compartiments cellulaires et des changements de pH, la charge des têtes polaires peut varier. PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, AP : acide phosphatidique, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidilinositol, PG : phosphatidylglycérol, MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol, DPG : diphosphatidylglycérol

1. Synthèses des phospholipides

Trois voies de synthèse des phospholipides sont possibles : les deux premières permettent une synthèse *de novo* des lipides membranaires et impliquent la voie dérivée du CDP-DAG ou la voie utilisant le DAG comme précurseur (voie Kennedy). La troisième voie provient de l'échange de têtes polaires entre phospholipides et ne conduit pas à une synthèse nette de lipides membranaires. Chez la levure *S. cerevisiae*, les deux voies "CDP-DAG" et "DAG" sont capables de synthétiser de la PC et de la PE, la voie CDP-DAG étant active en phase de croissance et la voie Kennedy prenant le relais lors d'une carence en nutriments par exemple (Carman et al 2007). Chez les plantes, le scénario est légèrement différent. La voie Kennedy est utilisée préférentiellement pour la synthèse de PC et PE, alors que la voie CDP-DAG synthétise les phospholipides : PI (phosphatidylinositol), PS (phosphatidylsérine), PG et DPG (phosphatidylglycérol et diphosphatidylglycérol) (Ohlrogge et Browse 1995).

a. Synthèse des phospholipides dérivés du CDP-DAG

Les phospholipides issus du précurseur CDP-DAG sont le PG et DPG, la PI et la PS.

i. Phosphatidyldiacylglycérol (PG) et diphosphatidylglycérol (DPG)

Chez les plantes, le PG est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, les plastes et les mitochondries (Ohlrogge et Browse 1995). Le CDP-DAG d'origine procaryote ou eucaryote est pris en charge par une PHOSPHATIDYLDIACYLGLYCEROL-PHOSPHATE SYNTHASE qui permet, en présence de glycérol, la création de PG phosphate (ou PGP) et de CMP (cytidine monophosphate). Le PGP est ensuite déphosphorylé par une PGP PHOSPHATASE (Wada et Murata 2007). Chez les plantes en C18, le PG est le seul glycérolipide à être synthétisé à partir de l'acide phosphatidique procaryotique. Sa structure procaryote primaire est donc composée de 18:1 ou 16:0 en *sn*-1 et exclusivement de 16:0 en *sn*-2 (**Figure 14**). Les acides gras portés par le PG seront ensuite désaturés dans le chloroplaste donnant lieu à des espèces contenant du 16:1 en *sn*-2, typique d'une signature chloroplastique (Nishida et Murata 1996).

Dans le modèle *A. thaliana*, deux gènes codant pour des PGP SYNTHASES ont été identifiés : PGP1 et PGP2 (Frentzen 2004). D'après Xu et al 2002 et Babiychuk et al 2003, PGP1 est plastidiale tandis que PGP2 est située dans le réticulum et les deux enzymes seraient également retrouvées au niveau de la mitochondrie. Un mutant d'*Arabidopsis* *pgp1* entraîne une baisse de 30% de la teneur de PG et une réduction de l'activité PGP synthase de 80%.

Ainsi, PGP1 est essentielle à la synthèse de PG dans le chloroplaste, alors qu'elle semble facultative pour la mitochondrie.

Le PG est majoritairement trouvé au niveau des thylakoïdes du chloroplaste et c'est le seul phospholipide possédant cette localisation, les thylakoïdes étant majoritairement composés de glycolipides (Block et al 1983). Sa charge anionique le rend indispensable au bon fonctionnement de la photosynthèse. En effet, sa distribution est asymétrique au niveau des thylakoïdes : PG est sensiblement plus présent au niveau du feuillet externe, ce qui contribue à maintenir un potentiel électrique au niveau de ces membranes et favorise le transfert d'électrons (Unitt et Harwood 1985). Des études de cristallographie ont ainsi révélées la présence de PG au sein des photosystèmes I et II (Jordan et al 2001, Loll et al 2005). Lors d'une carence de phosphate, la tête polaire du PG est recyclée par la cellule et il est remplacé par le sulfolipide SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycérol), également chargé négativement (Yu et al 2002).

Chez les organismes non photosynthétiques comme *S. cerevisiae*, le PG est exclusivement synthétisé dans la mitochondrie où il est impliqué dans la formation du DPG (diphosphatidylglycérol ou cardiolipine). Le DPG est localisé dans la membrane interne de l'organite et il est impliqué dans la stabilisation de complexes protéiques comme ceux de la chaîne de transfert d'électrons (Schlame et al 2000). C'est un phospholipide unique par sa structure car il est composé de quatre acides gras et de deux groupements phosphatidyl reliés par un squelette glycérol (Figure 13) (Horvath et Daum 2013). Sa synthèse fait intervenir une DPG SYNTHASE qui montre une préférence pour les espèces CDP-DAG et PG C18/C18 (Frentzen et Griebau 1994). Chez Arabidopsis, le gène codant pour l'enzyme CLS (CARDIOLIPINE SYNTHASE), responsable de cette activité a été identifié dans la mitochondrie par Katayama et al 2004.

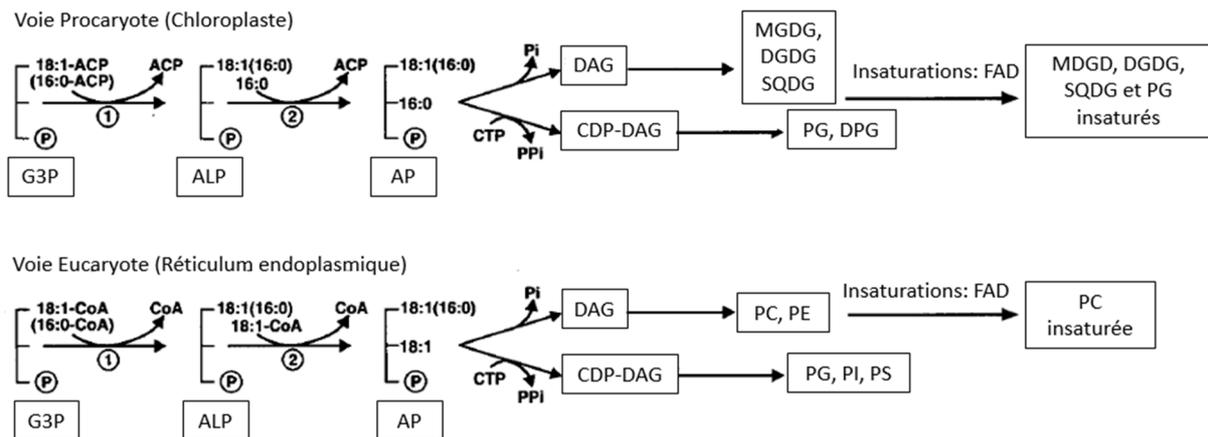


Figure 14 : Profils en acides gras et voies de synthèses des glycérolipides. Les deux voies de synthèse eucaryote et procaryote, ajoutent successivement deux acides gras sur le G3P (glycérol 3-phosphate) pour former de l'ALP (acide lysophosphatidique) puis de l'AP (acide phosphatidique). L'acylation en sn-1 (①) est réalisée à partir d'acyl-ACP dans le chloroplaste ou d'acyl-CoA dans le réticulum endoplasmique, utilisant indifféremment des espèces 16:0 ou 18:1. La deuxième acylation (②) est différente entre les deux voies : la voie

procaryotique utilise du 16:0 alors que la voie eucaryotique utilise du 18:1. Cette différence est appelée "signature procaryotique ou eucaryotique" et permet de connaître l'origine des glycérolipides. Le CDP-DAG (citidyne diphosphate diacylglycérol) et le DAG (diacylglycérol) sont produits à partir de l'AP et forment les glycérolipides membranaires par ajout d'une tête polaire en *sn*-3. Dans le réticulum, la PC est le support principal aux modifications des acides gras comme l'ajout de doubles liaisons, alors que dans le chloroplaste, le MGDG, DGDG, SQDG et le PG peuvent être désaturés. PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, AP : acide phosphatidique, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, PG : phosphatidylglycérol, MDGD : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol. Adapté de *Ohlrogge et Browse 1995*.

ii. Phosphatidylinositol (PI)

La famille des phosphoinositides regroupe plusieurs molécules, tel que le glycérolipide membranaire PI (phosphatidylinositol) mais également les lipides impliqués dans le trafic vésiculaire et la signalisation cellulaire : le PI-3P, le PI-4P (phosphatidylinositol 3 et 4 phosphate) et le PIP₂ (phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate). Selon *Kinney 1993*, le PI représente 93% des phosphoinositides.

Le PI est synthétisé à partir d'un groupement inositol libre et du CDP-DAG par une PI SYNTHASE (PIS). Chez *Arabidopsis*, PIS1 a été identifiée par complémentation chez la levure, puis son activité confirmée *in planta* (*Xue et al 2000, Löffke et al 2008*). Une autre isoforme, PIS2 a également montré une activité PI synthase *in vitro*. Les deux isoformes sont localisées dans le réticulum endoplasmique et exprimées dans les feuilles d'*A. thaliana*. Contrairement à PIS1, PIS2 semble préférer les molécules CDP-DAG non saturées (*Löffke et al 2008*).

iii. Phosphatidylsérine (PS)

La PS (phosphatidylsérine) est peu abondante dans les cellules de plante, ce qui est peut être une des raisons au manque de données la concernant. Un gène codant pour la PS SYNTHASE (PSS1) a cependant été identifié chez *Arabidopsis*: dans le KO *pss1*, les plantes ne contiennent pas de PS, résultat validant le fait que PSS1 est essentielle à la synthèse de PS (*Yamaoka et al 2011*). De manière intéressante, ce mutant n'est pas embryo-létal mais les plantes sont stériles et développent un nanisme. Ce phénotype provient du fait que la PS est plus abondante au niveau des tissus floraux, sa diminution induisant une inhibition de la maturation des grains de pollen. Dans ce même mutant, la division et l'élongation cellulaire sont perturbées, notamment au niveau des méristèmes de l'inflorescence. La répartition de la phytohormone auxine est également modifiée dans les rosettes, montrant que la PS joue un rôle important dans le développement des organes chez *Arabidopsis* (*Liu et al 2013*). Chez le riz, le gène codant pour la PS synthase, OsPSS-1 est de manière prédominante exprimé dans les cellules en élongation au sein des organelles associés aux mécanismes d'exocytose. Le phénotype des mutants pour ce gène suggère un rôle pour OsPSS-1 et son produit dans la régulation de la sécrétion des composés de la paroi cellulaire (*Ma et al 2016*).

b. Synthèse des phospholipides dérivés du DAG

Les phospholipides synthétisés à partir du DAG sont la PE (phosphatidyléthanoline) et la PC (phosphatidylcholine).

i. Phosphatidyléthanoline (PE)

Chez les plantes, deux voies de synthèse permettent l'assemblage de la PE (phosphatidyléthanoline) : une voie minoritaire qui implique la décarboxylation de la tête polaire de la PS et une voie principale faisant intervenir l'acide aminé sérine (**Figure 15**). La sérine est décarboxylée par la SERINE DEACARBOXYLASE pour donner de l'éthanolamine qui est à son tour phosphorylée par une ETHANOLAMINE KINASE (EK) pour former de la phosphoéthanoline. L'enzyme ETHANOLAMINE CETYLDYLTRANSFERASE (ECT) prend en charge ce dernier produit pour former de la CDP-Ethanolamine. Cette dernière est finalement transférée au DAG pour former la PE, en libérant une molécule de CMP (cytidine monophosphate). L'AMINOALCOHOLPHOSPHOTRANSFERASE (AAPT) responsable de cette dernière étape, transfère également la molécule de CDP-choline pour former de la PC et ne semble pas avoir de préférence pour l'une ou l'autre des espèces moléculaires (*Hocquet et al 2005*). En effet, la PE et la PC sont très proches structurellement ; la tête polaire de la PC est composée du groupement amine de la phosphoéthanoline, méthylié trois fois. Ainsi, la synthèse de la PC fait aussi intervenir comme précurseur la phosphoéthanoline. Les EK et CK semblent spécifiques de leur substrat, respectivement la PE et la PC (*Dykes et al 1976*) mais de par la proximité structurelle des deux phospholipides, certaines enzymes impliquées dans leurs synthèses (comme les AAPT) ou dans leurs dégradations (comme les phospholipases), ne sont pas toujours spécifiques de l'une ou de l'autre.

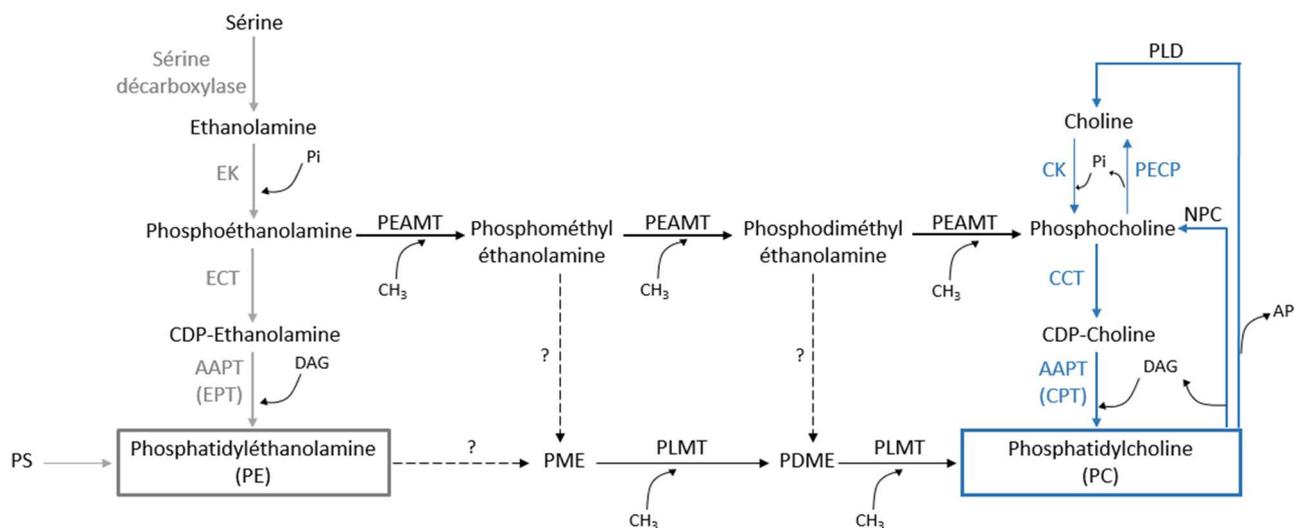


Figure 15 : Voies de biosynthèse des têtes polaires de la PE (phosphatidyléthanoline) et de la PC (phosphatidylcholine) chez *Arabidopsis thaliana*. La phosphoéthanoline, précurseur de la tête polaire de la PC est synthétisée à partir de la décarboxylation de la sérine. La PE peut aussi être directement produite à partir de la décarboxylation de la PS. La phosphocholine est synthétisée à partir de choline par une choline kinase ou à partir de la

phosphoéthanolamine, qui subit trois méthylations successives. Ces réactions sont catalysées par les PEAMT et chez les plantes c'est la voie principale de synthèse de la phosphocholine. Ce précurseur de la tête polaire de la PC est pris en charge par l'enzyme CCT pour former la CDP-Choline qui est assemblée avec une molécule de DAG par une enzyme CPT (famille AAPT) pour former le produit final, la PC. Une troisième voie de synthèse de la PC existe. Cette voie est minoritaire et implique la triple méthylation de la tête polaire de la PE. Chez *Arabidopsis*, aucune activité ou enzyme n'est associée à la première étape de cette voie de synthèse alternative. Certaines études suggèrent l'utilisation des intermédiaires de la deuxième voie (phosphométhyl- et phosphodiméthyléthanolamine) pour former les molécules de PME et PDME qui sont alors pris en charge par les PLMT pour ajouter les groupements méthyles manquant et produire de la PC. A partir de PC ou de PE, l'action de phospholipases D permet de libérer une molécule d'acide phosphatidique et un groupement choline et l'action des phospholipases C, une molécule de DAG et un groupement phosphocholine. La phosphatase PECP est capable de libérer une molécule de choline ou d'éthanolamine à partir d'une molécule de phosphocholine ou phosphoéthanolamine. En gris : synthèse de la PE, en bleu : synthèse de la PC, en noir : échanges entre les deux voies, flèches pointillées : enzymes non connues. EK : ETHANOLAMINE KINASE, ECT : ETHANOLAMINE CITYDYLTRANSFERASE, AAPT : AMINOALCOHOLPHOSPHOTRANSFERASE, CDP : CDP-CHOLINE : DIACYLGLYCEROL CHOLINEPHOSPHOTRANSFERASE, PEAMT : PHOSPHOETHANOLAMINE METHYLTRANSFERASE, CK : CHOLINE KINASE, CCT : CHOLINE CITYDYLTRANSFERASE, PLMT : PHOSPHOLIPIDE N-METHYLTRANSFERASE, PME : phosphatidylmonométhyléthanolamine, PDME : phosphatidyl diméthyléthanolamine, NPC : NON SPECIFIC PHOSPHOLIPASES C, PLD : PHOSPHOLIPASES D, PECP : PHOSPHOETHANOLAMINE/PHOSPHOCHOLINE PHOSPHATASE, DAG : diacylglycérol, Pi : groupement phosphate, CH₃ : groupement méthyl.

ii. Phosphatidylcholine (PC)

La phosphatidylcholine (PC) est un phospholipide important pour la structure des membranes des cellules végétales. En effet, c'est le phospholipide majeur chez de nombreuses espèces, dont *A. thaliana*, représentant 40 à 60% des lipides membranaires, hors plastes (Moore 1993). Mais la PC joue également d'autres rôles : dans le réticulum endoplasmique, elle sert de support aux réactions de maturation des acides gras effectuées par les désaturases FAD2 et FAD3. Ces acides gras peuvent alors être libérés dans le pool des acyl-CoA et participer à la synthèse d'autres lipides membranaires ou des lipides de réserve. Ce cycle de maturation et de libération dans le pool des acyl-CoA est appelé "acyl editing" et est développé page 53. La PC peut aussi être le précurseur des lipides de réserves triacylglycérol (TAG) par des mécanismes d'échanges et de coupure de sa tête polaire, fournissant ainsi un squelette DAG "maturé". Des études montrent également l'importance de la PC lors de réponses au stress abiotiques chez les plantes. Par exemple, la tolérance au gel passe par une augmentation de son degré de polyinsaturation (Kinney et al 1987).

α. Néosynthèse

Chez les plantes, la PC peut être néosynthétisée à partir de différentes voies (*pour revue, Rhodes et Hanson 1993*). Chez *A. thaliana*, au moins trois voies distinctes existent. Les deux premières, sont entièrement connues, tandis que la dernière n'est pas totalement caractérisée. La première voie passe par la molécule de choline qui est phosphorylée par une des quatre isoformes de CHOLINE KINASES (CK) pour former la phosphocholine (**Figure 15**). Ces enzymes ont d'abord été identifiées pour leur rôle dans la réponse au stress salin et aux blessures (*Titarenko et al 1997, Tasseva et al 2004*). Le manque d'études sur les modèles végétaux ne permet pas de conclure sur leur rôle en condition physiologique. La phosphocholine est ensuite prise en charge par une CHOLINE CITYDYLTRANSFERASE (CTT1 et CCT2) pour former de la CDP-choline. Cette tête polaire est finalement transférée sur une molécule de DAG pour obtenir la PC, par une enzyme de la famille des AAPT (AMINOALCOHOLPHOSPHOTRANSFERASE). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent pour deux isoformes enzymatiques: AAPT1 et AAPT2 qui présentent toutes les deux des activités CPT (CDP-CHOLINE : DIACYLGLYCEROL CHOLINEPHOSPHOTRANSFERASE) et EPT (CDP-ETHANOLAMINE : DIACYLGLYCEROL ETHANOLAMINEPHOSPHOTRANSFERASE). Les doubles mutants *aapt1 aapt2* sont embryo-létaux. Des lignées KO conditionnelles (silencing des gènes via une stratégie d'ARN interférence), présentent une forte réduction des taux total de galactolipides et de phospholipides. De manière intéressante, le niveau de PC dans les feuilles est inchangée, alors que la PE est affectée (*Liu et al 2015*). Ces résultats montrent que des mécanismes additionnels doivent exister pour pouvoir maintenir l'homéostasie de la PC.

La deuxième voie est la voie principale de synthèse de PC chez les plantes. Elle est spécifique des végétaux et passe par un intermédiaire de la voie de biosynthèse de la PE, la phosphoéthanolamine (*Eastmond et al 2010*). Cette molécule subit trois méthylations successives sous l'action des enzymes PEAMT (PHOSPHOETHANOLAMINE METHYLTRANSFERASES) pour donner de la phosphocholine. Les étapes suivantes sont identiques à celle de la première voie de synthèse.

La troisième voie de synthèse est aussi présente chez les mammifères et les levures et fait intervenir des PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASES (PLMT) qui méthylient directement la PE en PC. Chez *Arabidopsis*, contrairement aux levures, aucune activité enzymatique de méthylation directe sur la PE n'a été détectée (*Bolognese et McGraw 2000*). Par contre, si la PE est présente sous forme de phosphatidylmonométhyléthanolamine (PME), des activités de méthylation permettent d'ajouter les 2^{ème} et 3^{ème} groupements méthyls (*Keogh et al 2009, BeGora et al 2010*). Ce qui suggère que les produits intermédiaires des réactions catalysées par les PEAMT: la phosphométhyléthanolamine et la phosphodiméthyléthanolamine, pourraient aussi être utilisés par cette troisième voie de synthèse de la PC (*Tasseva et al 2004*).

Voie de synthèse n°1 : synthèse et rôle de la choline

La choline est le précurseur de la première voie de synthèse. Chez les mammifères, c'est un nutriment essentiel, une carence en choline entraînant une baisse des taux de méthylation et une augmentation des TAG dans le foie (*Pomfret 1990*). Chez les femmes enceintes ou les personnes subissant une chimiothérapie (utilisation du méthotrexate), une cure de choline a le même effet que la vitamine B12 (folate), elle permet de conserver le taux de molécules C1 disponible dans les cellules (*Drews 2015, Freeman-Narrood 1997*). Cet effet peut être expliqué par sa structure contenant trois groupements méthyles ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$).

Chez les végétaux, les voies de biosynthèse de la choline varient d'une espèce à une autre et pour la plupart, les enzymes impliquées ne sont pas toutes identifiées (*Rhodes et Hanson 1993, Tasseva et al, 2004*). A ce jour, pour le modèle Arabidopsis, la synthèse de choline semble passer uniquement par la déphosphorylation de la phosphocholine ou le recyclage de la tête polaire de la PC, contrairement aux levures où l'éthanolamine peut aussi servir de substrat à la formation de choline. Les données actuelles pointent l'action de la PECP1 (PHOSPHOETHANOLAMINE/PHOSPHOCHOLINE PHOSPHATASE), qui permet d'obtenir de l'éthanolamine ou de la choline à partir de leurs équivalents phosphorylés (*May et al 2012*). Les phospholipases D permettent de recycler la choline présente sur la tête polaire de la PC et l'action conjuguée de phospholipases C et de la PECP1 mènent aussi au recyclage de la choline (**Figure 15**). Dans tous les cas, la synthèse de choline ou de phosphocholine est dépendante de celle de la phosphoéthanolamine et de l'action des PEAMT.

La choline est également le précurseur de la glycine bêtaïne, molécule osmoprotectrice. Les osmoprotecteurs permettent de conserver la pression osmotique du cytoplasme et de stabiliser les protéines et les membranes lors de stress salins et hydriques. Ce mécanisme d'adaptation est largement répandu chez les plantes à fleur et les microalgues mais d'autres espèces comme le soja, le riz et Arabidopsis, n'accumulent pas de glycine bêtaïne (*McNeil et al 1999, Fan et al 2012*). Les plantes qui produisent cet osmoprotecteur réalisent la synthèse de la molécule via deux étapes d'oxydation de la choline, faisant intervenir une CMO (CHOLINE MONOOXYGENASE) et une BADH (BETAINE ALDEHYDE DESHYDROGENASE) (*McNeil et al 1999*). Bien qu'*A. thaliana* n'accumule pas de glycine bêtaïne, elle possède une CMO, à priori non-fonctionnelle (*Hibino et al 2002*) et deux BADH putatives, qui réagissent au froid et à la sécheresse (*McNeil et al 1999*). La présence d'activité BADH sur les aminoaldéhydes et leur localisation péroximale indiquent qu'elles jouent sûrement un rôle dans la détoxification de ces substrats, produits en cas de stress (*Missihoun et al 2011*). Induire une accumulation de molécules osmoprotectrices favorise la résistance de la plante aux stress (*Missihoun et al 2015*). Des lignées transgéniques de tabac exprimant les gènes pour la voie de biosynthèse de la glycine bêtaïne ne présentent aucun changement de taux de PC, alors que les deux molécules sont en concurrence pour leur précurseur. Ce résultat suggère que la PC est finement régulée au sein d'une cellule végétale (*McNeill et al 2001*).

Voie de synthèse n°2 : focus sur les PHOSPHOETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASES (PEAMT)

La principale voie de synthèse de la tête polaire de la PC chez les plantes, fait intervenir les PEAMT (PHOSPHOETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASES) (**Figure 15**) (*Cruz-Ramirez et al 2004*). Arabidopsis comporte trois isoformes de PEAMT (*Bolognese et McGraw 2000, BeGora et al 2010*). PEAMT1 est capable de catalyser les trois réactions de méthylation qui conduisent à la phosphocholine et PEAMT2 et 3 catalyseraient uniquement les deux dernières méthylations (**Figure 16**). Cependant, de récentes études tendent à montrer que les trois enzymes seraient capables d'effectuer les trois méthylations (*Y. Nakamura, Communication orale, 22^{ème} International Symposium on Plant Lipid, Juillet 2016, Göttingen-Allemagne*). Les PEAMT utilisent la SAM (S-Adénosyl méthionine ou AdoMet) pour méthyler leur substrat. Leur activité est donc régulée par la disponibilité de ces molécules et en particulier par le ratio AdoMet/AdoHcy (S-AdénosylMéthionine / S-AdénosylHomocystéine). La molécule d'AdoHcy a un fort pouvoir rétro-inhibiteur sur ces enzymes, comme la molécule de phosphocholine, leur produit direct (*Eastmond et al 2010*). Dans les feuilles d'*Atriplex nummularia L.*, les enzymes impliquées dans la synthèse d'AdoMet (les SAM synthétases) et les PEAMT sont colocalisées, ce qui permet de synthétiser rapidement de la choline, précurseur de la glycine bêtaïne, un osmoprotecteur indispensable à la plante pour survivre à son environnement désertique (*Tabushi et al 2005*). *Josh et al 2009* ont montré que chez le blé, PEAMT2 présente une activité spécifique plus grande que PEAMT1 et qu'*in vitro*, elle est moins sensible à l'inhibition par l'AdoHcy mais plus sensible à celle de la phosphocholine. Dans ce modèle, PEAMT1 est plus sensible que PEAMT2 à l'inhibition par l'acide phosphatidique.

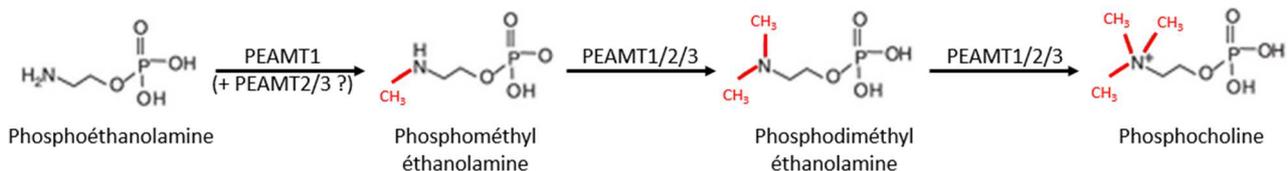


Figure 16 : Méthylation de la phosphoéthanolamine en phosphocholine par les PEAMT. Les PEAMT catalysent la triple méthylation de la phosphoéthanolamine pour former la phosphocholine, précurseur de la tête polaire de la PC. Chez Arabidopsis, trois isoformes existent. PEAMT1 catalyse les trois méthylations, tandis que PEAMT2 et 3 ne seraient capables que d'ajouter les deuxième et troisième groupements méthyls. PEAMT : PHOSPHOETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASES, PC : phosphatidylcholine.

Les enzymes PEAMT sont indispensables à la synthèse de la PC chez les plantes : en exemple, le silencing des gènes PEAMT chez Arabidopsis conduit à une réduction d'un facteur 64 de la teneur en choline (*Mou et al 2002*). Cependant, le rôle exact des PEAMT dans la régulation de la synthèse de la PC n'est pas complètement clair. Quand une phosphoéthanolamine méthyltransférase est surexprimée dans le tabac, le taux de phosphocholine et de choline augmente, respectivement de 5 et 50 fois mais pas celui de la PC (*McNeil et al 2001*). Des

expériences de marquages radioactifs ont montré que chez le tabac, la synthèse de choline passe prioritairement par un turn-over de la PC, plutôt que par une déphosphorylation de la phosphocholine. Dans ce cas, les PEAMT pourraient exercer un contrôle sur le flux choline, sans pour autant que la quantité de PC augmente (McNeil *et al*, 2000). La quantité de PC dans les membranes est aussi très régulée dans des conditions de stress. Le suivi d'un marquage au C¹⁴ a permis de révéler que la synthèse de PC est accélérée durant un stress au froid, accompagnée par une régulation positive de l'expression des gènes CCT, en particulier de l'isoforme CCT2 (Tasseva *et al* 2004, Inatsugi *et al* 2002). Lors d'un stress salin, les gènes codant pour les enzymes CK sont surexprimés mais le pool de choline marqué reste constant. Ce résultat peut s'expliquer par la présence d'un turn-over rapide de la PC dû à une forte activité des phospholipases D. L'activation des CK seraient alors requise pour recycler la phosphocholine en CDP-choline, mécanisme également retrouvé chez les mammifères (Ishidate 1997). Durant un traitement au sel, la transcription des PEAMT est régulée négativement et le taux de PC augmente, montrant que dans ce cas, l'activité PEAMT n'est pas corrélée avec le taux de synthèse de PC (Tasseva *et al* 2004). Dans les deux conditions : stress salin et froid, il semble que les enzymes de la voie de biosynthèse de la tête polaire de la PC favorisent le maintien d'un taux de PC suffisant pour permettre le turn-over de la molécule. Le fait que la teneur en PC dans les membranes n'augmente pas, suggère que l'homéostasie de ce phospholipide est subtilement régulée.

D'autres gènes, impliqués dans la voie de synthèse de l'AP interviennent dans le contrôle de la synthèse de PC. En effet, Carman *et Henry* 2007 ont montré que les enzymes de type PAP responsables de la formation de DAG à partir de l'AP sont des répresseurs de la synthèse des phospholipides chez la levure. Ainsi, un mutant *pah1pΔ* entraîne une augmentation de la quantité d'acide phosphatidique et une surexpression des gènes de la synthèse des phospholipides, ce qui conduit à une expansion membranaire massive du réticulum endoplasmique (Han *et al* 2007). Le même phénotype est retrouvé pour le double mutant *pah1 pah2* chez Arabidopsis : la plante présente une forte production d'AP, de PE et de PC et une augmentation de la surface du réticulum endoplasmique dans les feuilles et les racines (Eastmond *et al* 2010, Craddock *et al* 2015). Chez ce mutant, les gènes codant pour les enzymes de la synthèse de PC : PEAMT, CK et CCT, sont surexprimés. Les gènes PEAMT et CCT semblent être sous contrôle des PAH et de l'AP pour réguler respectivement le flux de phosphocholine et de CDP-choline à la PC.

Le rôle prépondérant des CCT a déjà été mis en avant pour la production de PC et le développement de la plante (Mizoi *et al* 2006). Il est considéré que la biosynthèse de PC est plus limitée par le pool de CDP-Choline obtenu par l'action des CCT, que par la disponibilité du DAG, porteur du squelette glycérol. Ainsi, il est admis que les CCT catalysent l'étape limitante de la synthèse de PC (Kinney *et al* 1987, Tasseva *et al* 2004). L'utilisation du double mutant *pah1 pah2* a permis de mettre en évidence que les CCT végétales sont également des senseurs métaboliques capables de contrôler la composition membranaire en ajustant le taux de PC, comme c'est le cas chez les mammifères (Cornell *et Northwoos* 2000). En absence de PAH active, le taux d'acide phosphatidique augmente. Craddock *et al* 2015 ont

montré que CCT1 comporte un domaine de liaison aux lipides, qui lui permet de fixer l'AP. Cette fixation, permet son activation et favorise la production de CDP-Choline et de PC. Les mutants portant une CCT1 constitutivement active, présentent le même phénotype d'accumulation de PC que le mutant *pah1 pah2*, démontrant l'importance de ces enzymes. La phosphocholine exerce un rétrocontrôle négatif sur les PEAMT. Les ARN messagers codant pour la PEAMT1 comportent en 5' une région non traduite (UTR : untranslated region) qui contient un uORF (upstream open reading frame) permettant la répression de la traduction de l'enzyme par son produit, la phosphocholine et ce, sans influencer sur la transcription du gène (Tabuchi et al 2006, Alatorre-Cobos et al 2012). Dans le mutant *pah1 pah2*, l'activation de CCT1 par l'AP entraîne une consommation de la phosphocholine intracellulaire et une levée de l'inhibition de la traduction des PEAMT. Les gènes codant pour les PEAMT sont aussi régulés au niveau transcriptionnel par l'AP : dans les mutants *pah1 pah2* l'AP augmente, ce qui stimule le taux d'expression des gènes codant pour les PEAMT (Eastmond et al 2010, Craddock et al 2015).

Les enzymes CCT et PEAMT sont essentielles à la synthèse de PC car la répression de l'une ou l'autre supprime partiellement l'augmentation de PC dans les racines du mutant *pah1 pah2*. Mais leurs rôles dans le flux et la régulation du turn-over de la PC sont toujours peu connus. Chez les mammifères, une CCT constitutivement active augmente le taux de synthèse de PC mais n'augmente pas la teneur nette de PC car le turn-over de la molécule est accru (Wang et Kent 1995). Chez Arabidopsis, l'activation de CCT1 induit une augmentation de la teneur en PC, montrant que le turn-over de la molécule ne compense pas tout, même si ce dernier est accéléré (Wang et al 2014, Eastwood 2010).

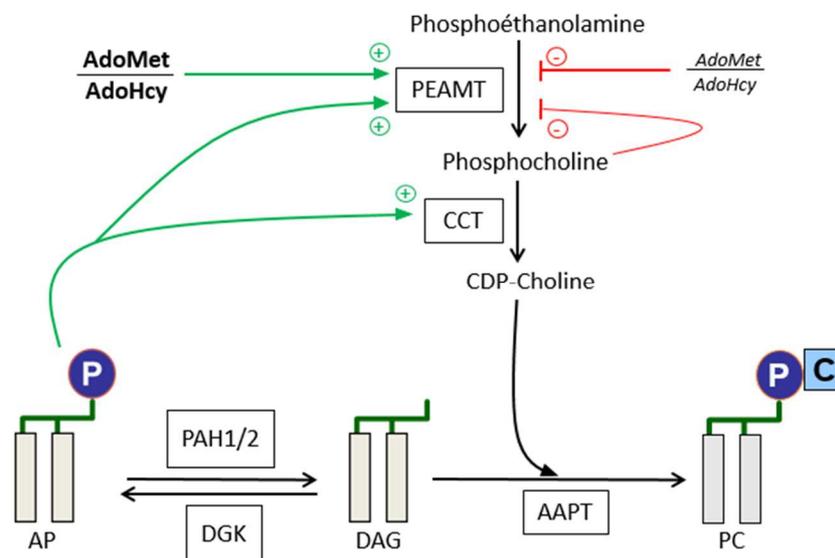


Figure 17 : Régulation de la synthèse de PC. Les PEAMT étant des méthyl transférase, leur activité est sensible à la disponibilité de méthionine dans le milieu. Ainsi, un ratio AdoMet/AdoHcy important stimule la production de phosphocholine, tandis qu'un ratio plus faible inhibe l'activité des PEAMT. La phosphocholine est capable d'exercer un rétrocontrôle et d'inhiber la transcription et l'activité des enzymes PEAMT. L'AP stimule la transcription

des gènes codant pour les PEAMT et quand les PAH sont réprimées, il s'accumule et active les CCT, qui produisent de la CDP-choline et augmente ainsi la production de PC. Le pool de phosphocholine est alors consommé, ce qui entraîne une levée d'inhibition de l'activité des PEAMT et de la transcription de leurs gènes. PC : pPhosphatidylcholine, PAH ; phosphatidic acid phosphorylase, AP : acide phosphatidique, PEAMT : PHOSPHOETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASES, CCT : CHOLINE CITYDYLTRANSFERASE, DAG : diacylglycérol, DGK : DAG KINASES, AAPT : AMINOALCOHOLPHOSPHOTRANSFERASE.

2. Catabolisme des phospholipides

Les phospholipides présentent une même structure, seule la nature de leur tête polaire les différenciant les uns des autres. Comme nous l'avons vu, les phospholipides peuvent être néosynthétisés par des voies de synthèse spécifiques. Ils peuvent également être produits par l'action de phospholipases qui sont responsables de la coupure des différentes parties qui constituent le phospholipide et permettent des échanges entre phospholipides (**Figure 18**). Contrairement à la néosynthèse, la coupure et le remplacement des têtes polaires ne résultent pas en une augmentation nette de la teneur en molécules (**Figure 18**). Ces enzymes agissent sur l'ensemble des phospholipides mais la PC étant l'espèce majoritaire dans les membranes végétales, elle est une cible privilégiée des phospholipases. Ainsi, le contrôle de l'homéostasie de la PC passe également par des interconversions avec les autres lipides membranaires.

Les phospholipases D attaquent la liaison oxygène-R, libérant de l'AP et le groupement R (R définissant la tête polaire du phospholipide) (**Figure 18**). Les phospholipases C coupent la liaison entre le squelette glycérol et l'atome d'oxygène du groupement phosphate pour libérer du DAG et une tête polaire phosphorylée. Enfin, les phospholipases A₁ et A₂, ciblent la liaison entre le squelette glycérol et un atome d'oxygène du groupement carboxylique des acides gras, respectivement en positions *sn*-1 et *sn*-2. Quand un acide gras est enlevé, il y a formation d'un lyso-phospholipide. Dans le cas des phospholipases C et D, les mécanismes qui permettent les échanges des têtes polaires font toujours intervenir les intermédiaires DAG et PA, les précurseurs des glycérolipides.

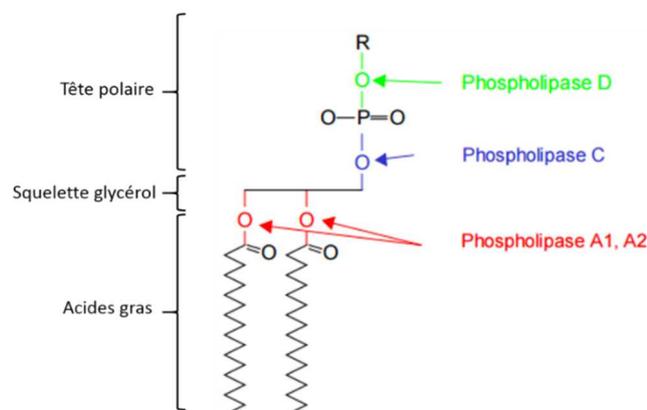


Figure 18 : Sites de coupure des phospholipases sur un phospholipide. "R" représente le groupement polaire. Les phospholipases D libèrent la tête polaire et de l'AP, les

phospholipases C, une tête polaire phosphorylée et du DAG. Les phospholipases A coupent un acide gras. Adapté de "Thèse de Juliette Jouhet. Etude des remaniements lipidiques des cellules végétales en carence de phosphate. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005."

a. Les phospholipases A

Les PHOSPHOLIPASES A (PLA) hydrolysent les deux acides gras portés par les glycérolipides membranaires. Elles sont classées en trois superfamilles, les PLA₁ qui coupent l'acide gras en position *sn*-1, les PLA₂ qui sont spécifiques de la position *sn*-2 et les "patatin-like" capables d'hydrolyser les deux positions indifféremment. Chez Arabidopsis, la superfamille PLA₁ comporte une enzyme qui hydrolyse l'AP (Higgs et al 1998) et 12 isoformes qui ciblent la PC. Ces dernières sont classées en trois classes (I-III) selon leur localisation dans la cellule, respectivement au chloroplaste, dans le cytosol et à la mitochondrie (Ishiguro et al 2001). Par exemple, la phospholipase DAD1 (DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE 1) est une phospholipase PLA₁ de classe I, impliquée dans la synthèse de l'acide jasmonique (Ishiguro et al 2001). Les enzymes de la classe II semblent impliquées dans les processus de dégradation des lipides durant la sénescence (Thompson et al 2000) et la fonction des enzymes de classe III n'a pas encore été rapportée. Quatre isoformes de PLA₂ sécrétées (sPLA₂) et dix de patatin-like ont également été identifiées chez *A. thaliana*.

Les phospholipases A sont impliquées dans la signalisation cellulaire. Souvent en réponse à un stress, les PLA libèrent des acides gras libres et des lyso-phospholipides qui médient des réponses comme l'activation de voies de signalisation suite à une blessure ou un pathogène, la croissance cellulaire, la sénescence et la régulation osmotique (pour revue : Ryu 2004). Les phospholipases A sont aussi impliquées dans le turn-over des acides gras de la PC et en particulier les PLA₂, qui interviennent dans les mécanismes d'édition des acides gras (p 44). D'autres phospholipases A, appelées lipases sont également impliquées dans le catabolisme des TAG (p 67).

b. Les phospholipases D

Les PHOSPHOLIPASES D (PLD) sont des enzymes ubiquitaires chez les plantes qui hydrolysent les phospholipides au niveau de la liaison phosphodiester terminale, générant une tête polaire libre et de l'acide phosphatidique (Meijer HJG et Munnik T 2003). En comparaison avec les mammifères qui possèdent deux PLD ou les levures (une seule enzyme), les plantes possèdent une variété de PLD. *A. thaliana* comporte douze enzymes, divisées en six classes basées sur leurs homologies. Comme présenté **Figure 19**, les PLD_ζ possèdent un domaine PX/PH (phox homology / pleckstrin homology domains), nécessaire à l'adressage des protéines aux membranes et impliqués dans la voie de signalisation passant par les phosphoinositides (Van Leeuwen et al 2004). Les autres familles de PLD possèdent un domaine C2, spécifique des protéines solubles mais qui permettent de lier la protéine à la membrane de manière calcium-dépendante (Kopka et al 1998).

Famille	Domaine	Co-facteurs	Substrats
PLD α	C2	Ca ²⁺	PC, PE, PG
PLD β	C2	Ca ²⁺ , PIP ₂	PC, PE, PS
PLD γ	C2	Ca ²⁺ , PIP ₂	PC, PE, PS
PLD δ	C2	Ca ²⁺	PE > PC
PLD ϵ	C2	-	-
PLD ζ	PX, PH	PIP ₂	PC

Figure 19 : Classes des phospholipases D retrouvées chez *A. thaliana*. Suivant leur domaine spécifique C2 ou PX/PH, les enzymes utilisent des cofacteurs différents. Chacune des PLD possède une gamme de spécificité particulière pour les phospholipides; la PLD δ préfère ainsi la PE par rapport à la PC. PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, PG : phosphatidylglycérol, PS : phosphatidylsérine

Comme l'acide phosphatidique est un second messager impliqué dans la signalisation cellulaire, ces enzymes sont importantes pour permettre la libération rapide de ce phospholipide. Les PLD jouent également un rôle dans la régulation du trafic vésiculaire, comme cela a été montré dans les tubes polliniques et l'élongation des poils racinaires (Potocky et al 2003, Ohashi et al 2003). Elles sont aussi impliquées dans la réponse cellulaire aux stress, comme les blessures, les infections par des pathogènes et la réponse à l'acide abscissique qui est activé par le manque d'eau, le froid et les stress salins (pour revue : Bargmann et Munnik 2006). Lors d'une carence en phosphate, les PLD interviennent dans le catabolisme des phospholipides pour conduire à la libération des groupements phosphate nécessaire à la plante. Les deux isoformes de la classe PLD ζ semblent être impliquées dans ce processus et selon Cruz-Ramirez et al 2006, l'AP libéré serait ensuite pris en charge par une AP phosphatase afin de produire du DAG, utilisé ensuite pour la synthèse des galactolipides en remplacement des phospholipides.

c. Les phospholipases C

Les PHOSPHOLIPASES C (PLC) hydrolysent les phospholipides en DAG et libèrent une tête polaire phosphorylée. Chez les plantes, deux familles ont été identifiées : les PLC spécifiques des phosphoinositides (PI-PLC) et les "NON-SPECIFIC PHOSPHOLIPASES C" (NPC) (Nakamura 2014). Les PI-PLC sont les enzymes qui ont été le plus étudiées, de par leurs homologies avec celles des mammifères mais également pour leur implication dans les cascades de transduction de signal (voir p 29).

i. Focus sur les NON-SPECIFIC PHOSPHOLIPASES C (NPC)

Les NPC sont communes aux bactéries et aux plantes. Dans ces dernières, l'activité des NPC a d'abord été mise en évidence dans des fractions plastidiales incubées en présence de PC (Kates 1955). Cette activité enzymatique a ensuite été détectée dans le riz, les tomates, les fleurs de pétunia et les cultures cellulaires de tabac (Scherer et al 2002). Ce n'est que plus

récemment que *Nakamura et al 2005*, ont identifié par homologie avec les gènes bactériens, les six gènes de la famille des NPC chez *A. thaliana*. Les NPC sont dites "non spécifiques" car elles ne sont pas strictement spécifiques à un phospholipide. L'isoforme NPC4 a été la plus étudiée. Cette enzyme est capable d'hydrolyser la PC mais également la PE, avec moins d'affinité (*Nakamura et al 2005*). A priori elle pourrait également utiliser le PS et le PG comme substrat mais l'activité spécifique de l'enzyme est alors très faible (*Peters et al 2010*). *In vitro*, il a été montré que NPC4 n'est pas capable d'hydrolyser les phosphoinositides et que contrairement à la plupart des PLD, elle n'est pas calcium dépendante. Le gène *NPC5* est le plus proche homologue de *NPC4*, les deux gènes sont d'ailleurs localisés "en tandem" avec *NPC3*, sur le chromosome n°3 d'*A. thaliana*. Les séquences des gènes *NPC4* et *NPC5* présentent 84.7% d'homologies. NPC5 peut cliver indifféremment la PC et la PE, bien que son activité soit environs 40 fois plus faible que celle de NPC4 (*Gaude et al 2008*). La dernière enzyme à avoir été étudiée *in vitro* pour son activité est l'isoforme NPC3 qui, étrangement, présente une activité lyso-AP phosphatase. NPC3 peut également déphosphoryler l'AP, avec une activité moindre (*Reddy et al 2010*). Les NPC1 à 6 sont considérées comme des protéines associées aux membranes ou cytosoliques car elles ne contiennent pas de séquence transmembranaire (*Nakamura et al 2005*). Selon les données disponibles, il semble que la localisation cellulaire de ces enzymes soit dépendante de l'isoforme. NPC4 est ainsi localisée à la membrane plasmique, tandis que NPC5 est associée aux fractions subcellulaires des chloroplastes, du réticulum endoplasmique et du cytosol, ce qui laisse à penser que l'enzyme est cytosolique et pourrait être recrutée aux membranes nécessitant son activité (*Nakamura et al 2005*, *Gaude et al 2008*). La localisation intracellulaire des autres isoformes n'est à ce jour pas identifiée mais NPC1 et NPC2 sont prédites comme localisées au réticulum endoplasmique et NPC6 présente un transit peptide putatif pour l'adressage aux chloroplastes et aux mitochondries (*Pokotylo et al 2013*). L'analyse par qRT-PCR des motifs d'expression des gènes des NPC a permis d'avoir une idée de la localisation tissulaire de ces enzymes chez *Arabidopsis*. NPC1 et NPC6 sont exprimées de manière ubiquitaire dans la plante. NPC3 est fortement exprimée dans les racines, comme NPC2, qui est également exprimée au niveau des organes reproducteurs (fleurs et siliques). NPC4 est exprimée dans les feuilles matures et les organes non photosynthétiques comme les fleurs et les racines et NPC5 semble uniquement exprimée dans les fleurs (*Peters et al 2010*, *Wimalasekera et al 2010*). Des fusions avec le rapporteur GUS (enzyme β -glucuronidase), viennent nuancer ces résultats. Par exemple, il semble que les localisations de NPC3 et NPC4 peuvent se chevaucher (*Wimalasekera et al 2010*).

Le rôle de ces phospholipases a été mis en évidence dans la réponse à différents stress abiotiques et en réponse à l'action de certaines phytohormones. NPC1 semble jouer un rôle dans la résistance aux chocs thermiques : chez une plante surexprimant la protéine, la production de DAG augmente vis-à-vis du témoin et le taux de survie est amélioré de 68%. Les mécanismes liant NPC1 à la thermo-tolérance ne sont cependant pas encore déterminés (*Krckova et al 2015*). L'expression des gènes codant pour les enzymes NPC4 et NPC5

Données bibliographiques

augmente dans les racines en condition de stress salin (Kocourkova et al 2011, Peters et al 2014). Dans cette condition, l'hydrolyse de la PC augmente d'un facteur 4. La phosphocholine libérée peut servir de précurseur à la synthèse de la molécule osmoprotectrice glycine bêtaïne chez les plantes possédant ce mécanisme de résistance au stress salin. NPC4 est aussi impliquée dans la signalisation à l'acide abscissique, aux brassinostéroïdes et à l'auxine. La salinité et le stress hydrique stimulent la voie de signalisation de l'acide abscissique. Les mutants *npc4* sont beaucoup plus sensibles à ces stress (racines plus petites, photosynthèse réduite,...). Quand les plantes sont supplémentées avec du DAG ou de l'AP, le phénotype sauvage au niveau des racines est restauré. En présence de DAG et d'un inhibiteur de kinases, le phénotype n'est pas restauré, ce qui montre que le DAG produit par NPC4 est utilisé pour former de l'AP (Peters et al 2010). Les mutants *npc3* et *npc4*, présentent une augmentation de la densité des racines latérales quand les plantes sont traitées aux brassinostéroïdes, suggérant une sensibilité réduite à ces phytohormones. Les mêmes mutants présentent des racines plus courtes et en condition sauvage, NPC4 est induite après 1h de traitement à l'auxine. NPC3 et NPC4 étant localisées dans les mêmes tissus de la plante, cela suggère un rôle redondant de ces enzymes envers les phytohormones (Wimalasekera et al 2010).

Durant une carence en phosphate, les phospholipides sont dégradés, permettant le recyclage des têtes polaires phosphorylées et la libération de DAG qui sert de précurseur à la synthèse accrue de galactolipides. Le DAG peut provenir de l'AP par l'action d'une PAH, de l'action couplée d'une PLD et d'une phosphatase sur un phospholipide ou de l'action d'une NPC sur la PE ou la PC. Dans des cultures cellulaires des plantes *A. thaliana* et *A. pseudoplatanus*, il a été observé que le taux de PC augmente de façon transitoire au début d'une carence en phosphate. Dans cette étude, la PC et le DAG avaient le même profil en acide gras, suggérant que la PC pourraient être un précurseur du DAG qui servirait ensuite à la synthèse du DGDG (Jouhet et al 2003). Chez la plante, des expériences de Northern Blot ont révélées que l'expression de *NPC4* est stimulée durant une carence en phosphate. Quand le gène est muté, les extraits cellulaires présentent une forte baisse de l'activité phospholipase C -NPC4 étant la NPC la plus active (Nakamura et al 2005)- et les feuilles accumulent moins de DAG. Cependant, l'absence de la protéine ne semble pas avoir d'impact sur les niveaux de DGDG (Gaude et al, 2008). L'expression de *NPC5* est aussi plus forte durant la carence. Le mutant *npc5* ne présente qu'une faible diminution de l'activité NPC car c'est une enzyme peu active en comparaison de NPC4 (activité spécifique de 2.6 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ versus 114 pmol.min⁻¹.mg⁻¹) mais l'augmentation de DGDG est réduite de moitié vis-à-vis d'une plante sauvage. De plus, le mutant *npc5* présente une accumulation de DGDG 16:0, montrant que NPC5 cible en priorité les phospholipides issus de la voie eucaryote lors d'une carence en phosphate (Gaude et al 2008).

Le DAG est un carrefour métabolique important dans le métabolisme des lipides. Libéré par l'action des NPC, il peut alors permettre la production d'AP (signalisation) ou de TAG

(stockage). Les NPC s'avèrent donc être une cible intéressante pour des stratégies d'ingénieries génétiques menant à une surproduction de TAG.

3. Synthèse des glycolipides

Les glycolipides et le PG sont les seuls lipides constitutifs des membranes du plaste (thylakoïdes, membranes de l'enveloppe interne et externe), la PC étant uniquement présente sur le feuillet externe de la membrane externe de l'enveloppe. Les glycolipides sont caractérisés par une tête polaire composée de galactose ou de quinovose et sont synthétisés exclusivement dans l'enveloppe des plastes. Ils comprennent les deux galactolipides MGDG (monogalactosyldiacylglycérol) et DGDG (digalactosyldiacylglycérol) et le sulfolipide SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycérol).

Leurs synthèses s'effectuent à partir du squelette carboné du DAG, d'origine procaryote ou eucaryote chez les plantes en C16 et du DAG d'origine eucaryote chez les plantes en C18. Le DAG d'origine eucaryote doit donc être importé à l'enveloppe du chloroplaste. Bien que les mécanismes d'import ne soient pas encore complètement élucidés, il semblerait que ce soit l'AP qui serve d'intermédiaire au transport du squelette DAG vers la membrane interne, siège de la synthèse du MGDG (voir **Figure 7**) (Xu et al 2005).

Après synthèse, les glycolipides et le PG servent de support à la désaturation des acides gras par l'action des FAD chloroplastiques (**Figure 9**).

a. Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG)

La synthèse de MGDG (monogalactosyldiacylglycérol) est catalysée par les MGDG SYNTHASES (MGD) localisées dans l'enveloppe du chloroplaste. Elles effectuent l'ajout d'un galactose provenant de l'uridine diphospho-galactose (UDP-Gal) sur une molécule de DAG (Douce 1974) (**Figure 20**).

Chez *A. thaliana*, une famille multigénique a été identifiée, composée de deux groupes, le groupe A avec la MGD1 et le groupe B avec les MGD2 et MGD3 (Awai et al 2001). Les deux groupes diffèrent sur plusieurs points : la MGD1 contient une extrémité N-terminale présentant des propriétés de peptide de transit chloroplastique, alors que les MGDG synthases du groupe B ont une partie N-terminale beaucoup plus courte. La localisation de MGD1 a été déterminée à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (IEM), alors que MGD2 et MGD3 sont sensibles à un traitement à la thermolysine, ce qui les place au niveau de la membrane externe (OEM).

MGD1 est un homodimère qui utilise aussi bien du DAG procaryote ou eucaryote (Nishiyama et al 2003). Des travaux ont montré que cette MGDG synthase est localisée dans tous les tissus de la plante et que c'est la plus active des trois isoformes enzymatiques. En effet, des mutants d'insertion présentant des taux d'ARN messagers réduits de 75%, entraînent une baisse de 42% du MGDG dans les feuilles, accompagné d'une baisse d'activité de la MGD1 de 75% (Jarvis et al 2000). Les mutants KO pour la protéine MGD1 présentent un phénotype albinos, une disruption des thylakoïdes et un dysfonctionnement de la photosynthèse,

mettant en avant l'importance de la synthèse des galactolipides pour l'appareil chloroplastique (*Kobayashi et al 2007*).

Contrairement à MGD1, les MGDG synthèses du groupe B sont principalement localisées dans les tissus non photosynthétiques comme les racines ou les tissus floraux et semblent présenter une meilleure affinité pour le DAG d'origine eucaryote (*Awai et al 2001*). Les mutants pour ces enzymes ne présentent pas de phénotype dans des conditions standards de croissance, ce qui confirme le rôle majeur de la MGD1. Cependant, lors d'une carence en phosphate, les gènes codant pour MGD2 et MGD3 sont précocement et fortement induits. Durant une carence en phosphate, les phospholipides sont dégradés, leurs têtes polaires permettant l'approvisionnement en phosphate de la cellule. Dans cette condition, le DGDG remplace les phospholipides dans les membranes extra-plastidiales de la cellule. Parce que le MGDG est le précurseur du DGDG, les MGD2 et MGD3 sont mobilisées pour produire au niveau de la membrane externe le pool de MGDG nécessaire à la synthèse du DGDG qui sera ensuite exporté vers d'autres territoires cellulaires (*Kobayashi et al 2009*).

b. Digalactosyldiacylglycérol (DGDG)

Chez *Arabidopsis*, deux DGDG SYNTHASES : DGD1 et DGD2 sont responsables de la formation du DGDG (digalactosyldiacylglycérol). Les deux enzymes catalysent l'addition d'un galactose sur le MGDG à partir d'une molécule d'UDP-Gal via une liaison glycosidique (**Figure 20**). Elles possèdent toutes deux un domaine C-terminal de type glycosyltransférase et DGD1 se distingue par la présence d'un domaine de fonction inconnue en N-terminal (*Kelly et Dörmann 2002*). Ces enzymes sont localisées dans la membrane externe du chloroplaste (OEM), (*Froehlich et al 2001*). Les deux enzymes ont des spécificités différentes pour le MGDG. DGD1 utilise préférentiellement du MGDG C18/C18 alors que la DGD2 est plus affine pour le MGDG C16/C18 (*Kelly et al 2003*). En carence de phosphate, le MGDG produit au niveau de la membrane externe de l'enveloppe est essentiellement d'origine eucaryote et c'est donc aussi le cas du DGDG dont la composition en acides gras ressemble à celle de la PC dans cette condition. L'analyse du mutant *dgd1* indique que l'enzyme joue un rôle primordial pour la photosynthèse, tandis que le mutant *dgd2* ne présente aucun phénotype en condition standard de culture. Le double mutant *dgd1 dgd2* présente de manière intéressante un phénotype plus marqué (*Kelly et al 2003*).

c. Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG)

La première étape de la synthèse du SQDG (sulfoquinovosyldiacylglycérol) consiste en la formation d'UDP-glucose (uridine diphosphate glucose) à partir de glucose 1-phosphate et d'UTP (uridine triphosphate), réaction catalysée par une UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE (UGP3) (**Figure 20**) (*Okazaki et al 2009*). L'UDP-glucose est ensuite condensé avec une molécule de sulfite par l'UDP-SQ SYNTHASE 1 (SQD1), qui produit de l'UDP-sulfoquinovose (UDP-SQ). La dernière étape de la synthèse du SQDG fait intervenir la SQD2 présente dans la membrane interne de l'enveloppe, qui transfère la partie SQ de l'UDP-SQ sur le diacylglycérol. Dans les simples mutants *ugp3*, *sqd1* et *sqd2*, l'absence de

SQDG est totale, démontrant l'importance de ces gènes dans la biosynthèse de SQDG (Kobayashi 2016). Avec le PG, le sulfolipide SQDG est responsable de la présence de charges négatives aux niveaux des membranes des thylakoïdes. Mais contrairement au PG indispensable à la photosynthèse, le besoin en SQDG est différent suivant les organismes. Ainsi, chez la microalgue *Chlamydomonas*, le SQDG est nécessaire au bon fonctionnement du photosystème II, alors que chez *Arabidopsis* il est facultatif en conditions de croissance physiologique (Minoda et al 2003, Yu et al 2002). Par contre, il devient indispensable au maintien des lipides anioniques dans les thylakoïdes durant une carence en phosphate, quand les phospholipides dont le PG, sont utilisés comme source de phosphate par la plante. Un mutant *sqd2* dans un fond génétique *pgp1* (déficient en PG) montre une forte réduction de l'efficacité du photosystème II (Yu and Benning 2003).

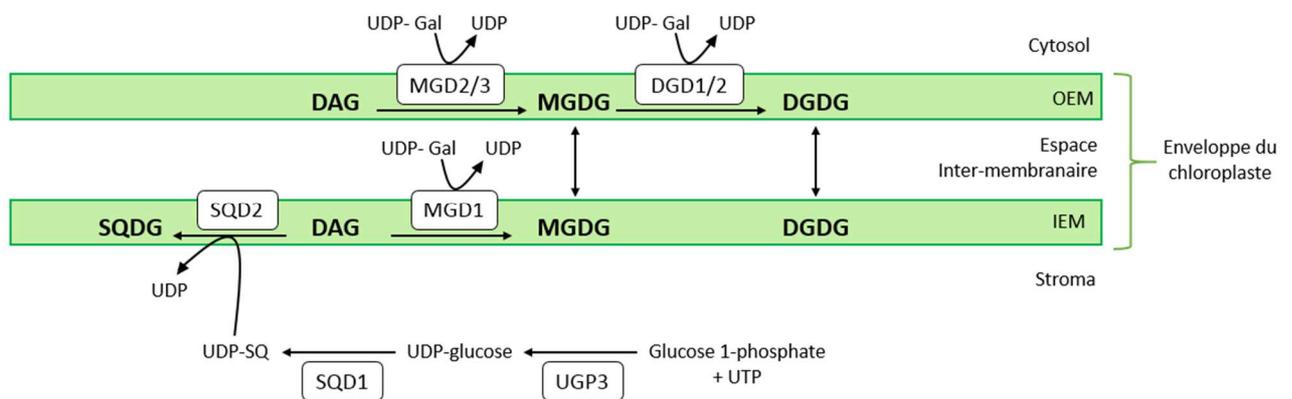


Figure 20 : Synthèse des galactolipides dans l'enveloppe du plaste. Le MGDG est synthétisé par ajout d'une tête galactose par la MGD1 (IEM) ou la MGD2 / MGD3 (OEM) à partir d'UDP-Gal. Il sert ensuite de substrat à la synthèse de DGDG par la DGD1 / DGD2. La tête polaire du SQDG est synthétisée par les enzymes UGP3 et SQD1 avant d'être transférée sur une molécule de DAG par la SQD2. NB : Ce schéma simplifié ne tiens pas compte de l'origine des molécules de DAG (eucaryote ou procaryote). DAG : diacylglycérol, MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol, MGD : MGDG SYNTHASES, DGD : DGDG SYNTHASES, UGP3 : UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE, SQD1 et 2: UDP-SQ SYNTHASE 1 et 2, UDP-Gal : uridine diphospho-galactose, UDP-SQ: UDP-sulfoquinovose, IEM: inner envelope membrane, OEM: outer envelope membrane.

C. Métabolisme des lipides de réserves

1. Synthèse des triacylglycérols (TAG)

Les triacylglycérols (TAG) représentent les principaux composants des lipides de réserve chez les plantes. Ils sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et sont composés d'un squelette glycérol sur lequel sont acylés trois acides gras. Pour les végétaux, les acides gras sont une source d'énergie carbonée très importante, faisant des TAG une réserve d'énergie

par excellence. Chez les plantes, les TAG sont produits lors du développement de l'embryon, permettant à la graine d'accumuler l'énergie dont elle aura besoin au cours de sa germination. Pour cette raison, de nombreuses études se sont focalisées sur ce modèle, afin de décortiquer les mécanismes de formation et d'accumulation des TAG. Néanmoins, les tissus végétatifs sont aussi capables de produire des TAG de manière transitoire, notamment en cas de stress.

La production de TAG implique un réseau métabolique complexe, qui fait intervenir différentes voies de synthèse, dont de nombreuses étapes sont communes avec les voies de production des lipides membranaires (*Chen et al 2012, Li-Beisson et al 2013*). Ainsi, la synthèse des TAG peut être réalisée par une voie linéaire d'assemblage, appelée voie de Kennedy ou par des mécanismes plus complexes faisant intervenir les phospholipides, dont la PC.

a. Voie Kennedy

La manière la plus simple de synthétiser des TAG passe par la voie de Kennedy, que nous avons déjà évoqué pour la synthèse des lipides membranaires (p 28). Le glycérol 3-phosphate subit deux acylations successives sous l'action des GPAT et LPAAT, pour former de l'acide lysophosphatidique puis de l'acide phosphatidique (**Figure 21**). Cette dernière molécule est prise en charge par une phosphatase (PAH) pour former du DAG. Ce pool de DAG synthétisé *de novo* est un carrefour dans la synthèse des glycérolipides qui peut être utilisé pour la synthèse de lipides membranaires comme la PE et la PC ou pour la production de TAG (*Kennedy 1961, Bates et Browse 2012, Li-Beisson et al 2013*) (**Figure 21**). Dans ce dernier cas, la synthèse de TAG implique une dernière acylation sur la position *sn*-3 du DAG, réaction catalysée par une DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE (DGAT). Chez *Arabidopsis*, trois isoformes ont été caractérisées (*Hernandez et al 2012*). Le KO du gène *DGAT1* n'entraîne qu'une réduction partielle de la production d'huile dans la graine. Dans ce mutant, l'activité des autres isoformes DGAT ainsi que celle de la PHOSPHOLIPID DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE (PDAT) peuvent prendre le relais, ce qui pourrait expliquer le phénotype (p 54). Un KO du gène *DGAT2* n'entraîne aucun changement au niveau de l'accumulation de TAG. Cependant, *DGAT2* montre une préférence pour le transfert en *sn*-3 des acides gras dits "atypiques", notamment chez le ricin commun, qui dispose d'acides gras hydroxylés (*Liu et al 2012*). Et une troisième isoforme, *DGAT3* a été identifiée comme étant impliquée dans le recyclage des acides gras 18:2 et 18:3 dans les molécules de TAG chez un mutant d'*A. thaliana* déficient pour le catabolisme des TAG (*Hernandez et al 2012*). Parce que ces enzymes catalysent une étape majeure dans la synthèse des TAG, les DGAT sont la cible de nombreuses études pour modifier quantitativement et qualitativement la production d'huile et de biocarburants.

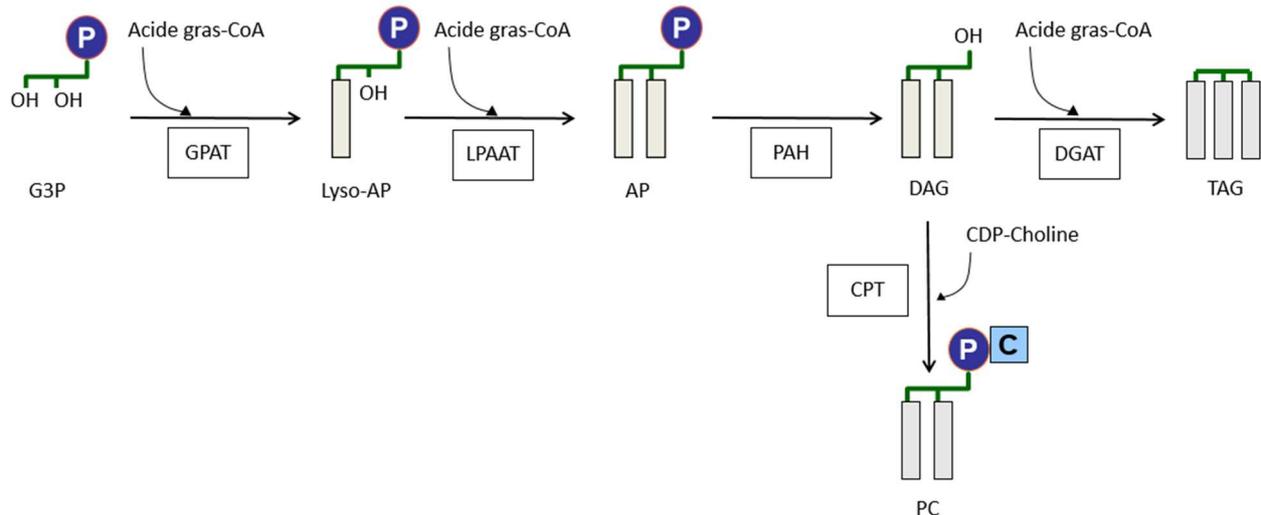


Figure 21 : La voie Kennedy. Le G3P subit deux acylations successives en *sn*-1 puis *sn*-2 sous l'action des GPAT et des LPAAT pour former du lyso-AP puis de l'AP par ajout successif de deux acyl-CoAs. L'activité phosphatase sur l'AP mène à la formation de DAG. Une troisième acylation catalysée par la DGAT à partir du pool d'acyl-CoA permet la synthèse de TAG. Le DAG peut aussi donner naissance aux phospholipides, comme la PC par ajout de la tête polaire CDP-Choline. G3P : glycérol 3-phosphate, GPAT : *sn*-GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE, LPAAT : LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE, Lyso-AP : lyso acide phosphatidique, AP : acide phosphatidique, PAH : PHOSPHATIDIC ACID HYDROLASE, PC : phosphatidylcholine, CPT : CTP : PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE, TAG : triacylglycérols, DGAT : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE.

b. Voies de synthèses impliquant la PC

La voie Kennedy requière un flux d'acide gras provenant du plaste, qui permet la formation de TAG par ajout successif de trois acides gras saturés ou monoinsaturés. Or, cette voie de synthèse ne peut pas expliquer à elle seule la diversité des molécules de TAG, qui contiennent de nombreux acides gras polyinsaturés. La composition des TAG chez les plantes fait également intervenir un flux d'acides gras modifiés (polyinsaturés) provenant du phospholipide membranaire, PC. Ainsi, la cellule est capable de coordonner des flux d'acides gras de diverses origines et de les canaliser en direction des TAG.

Deux grands mécanismes sont impliqués dans la régulation du flux des acides gras modifiés provenant de la PC, vers la synthèse des TAG. Le premier est l'édition des acides gras, qui implique des modifications et des échanges d'acides gras présents sur le squelette de la PC avec le pool d'acyl-CoA (**Figure 23**). Ce mécanisme n'implique pas de synthèse ou de turnover net de PC et donc pas de flux net de glycérol vers la PC. Le second fait intervenir un squelette DAG originaire de la PC : les acides gras de la PC sont modifiés, puis la tête polaire est sectionnée, permettant la création de molécules de DAG-dérivés de la PC et possédant des acides gras insaturés (**Figure 25**).

i. Mécanismes d'édition des acides gras

Chez les plantes, la désaturation des acides gras s'effectuent directement sur les glycérolipides et pour la voie eucaryote, principalement sur la PC (Sperling et al 1993). Les désaturations des acides gras font parties des mécanismes d'édition ou "acyl-editing", qui englobent tous les processus enzymatiques qui permettent les échanges et les modifications des acides gras portés par le squelette DAG de la PC. Ces mécanismes ont été pour la première fois mis en évidence par des expériences de radiomarquage chez le pois. Ces analyses ont démontré que les acides gras néosynthétisés dans le plaste et exportés vers le cytosol sont d'abord incorporés dans la PC. Les acides gras participant à la néosynthèse de PC sont les espèces 18:1, 18:0 et 16:0. L'espèce 18:1 est prise en charge par les désaturases du réticulum endoplasmique FAD2 et FAD3 pour produire des acides gras polyinsaturés (PUFAs), respectivement 18:2 et 18:3 (Okuley et al 1994, Arondel et al 1992). Ces PUFAs sont ensuite adressés au pool d'acyl-CoA par différents mécanismes et participent à la synthèse des autres glycérolipides membranaires et des TAG. Ainsi, le pool d'acyl-CoA est constitué d'acides gras saturés et monoinsaturés en provenance du plaste et d'acides gras polyinsaturés produit par les mécanismes d'édition au niveau de la PC. D'autres expériences de radiomarquage sur le modèle *A. thaliana* ont aussi montré que c'est sur la position *sn*-2 de la PC que la majorité des modifications ont lieu (Tjellström et al 2012, Bates et al 2012). Les mécanismes qui permettent le turn-over de la PC et de ses acides gras, approvisionnant ainsi les pools d'acyl-CoA et de DAG sont présentés dans la section suivante.

α. Le cycle de Lands

Une fois que les acides gras en position *sn*-2 de la PC ont été modifiés par l'action des FAD, ils sont libérés du squelette glycérol par une phospholipase A₂ ou par l'action réverse de la LPCAT (LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE ACYLTRANSFERASE), dont deux isoformes existent chez *A. thaliana*. Ces enzymes coupent l'acide gras positionné en *sn*-2 de la PC, libérant de la lyso-PC et un acide gras qui rejoint le pool d'acyl-CoA (Figure 22). La LPCAT catalyse alors l'ajout d'un autre acide gras provenant du pool cytosolique d'acyl-CoA sur la position *sn*-2 libre de la lyso-PC, afin de reformer de la PC (Wang et al 2012). Ce cycle, nommé cycle de Lands, permet d'enrichir le pool d'acyl-CoA avec des acides gras polyinsaturés.

Dans les graines en développement du double mutant d'*Arabidopsis lpcat1 lpcat2*, les acides gras néosynthétisés sont incorporés en priorité dans le DAG puis retrouvés dans un second temps dans la PC. Ces résultats montrent que la PC est produite *de novo* à partir de DAG et que l'activité LPCAT est essentielle aux échanges entre pool de PC et pool d'acyl-CoA (Bates et al 2012). De plus, dans le double mutant, le taux de lyso-PC augmente et les transcrits des gènes codants pour les phospholipases A sont plus abondants, ce qui suggère que des mécanismes de compensation se mettent en place pour maintenir le cycle de Lands (Wang et al 2012).

Pour que les enzymes de la voie Kennedy puissent utiliser les acides gras nouvellement libérés, il faut qu'ils soient sous forme acyl-CoA. L'intervention des LACS nécessite la consommation de deux molécules d'ATP (Shockey et al 2003). Pour cette raison, l'action

réverse de la LPCAT, qui permet d'enlever l'acide gras en position *sn*-2 et de le coupler directement à une molécule de coenzyme A, est sans doute un mécanisme thermodynamiquement plus favorable que celui des PLA₂ (Lager et al 2013). De récentes études apportent la preuve que ce mécanisme est présent *in vivo* chez les plantes. Dans des lignées de levures dépourvues d'activité DGAT et portant une activité LPCAT faible, l'ajout des enzymes du lin : FAD2, FAD3 et DGAT1, permet d'augmenter le taux de PUFAs dans les TAG. L'introduction du gène LPCAT1 permet d'augmenter les niveaux de TAG polyinsaturés, ce qui confirme que l'action réverse de la LPCAT permet de transférer des PUFAs dans le pool d'acyl-CoA et que ces derniers sont ensuite utilisés par DGAT1 pour produire des TAG (Pan et al 2015).

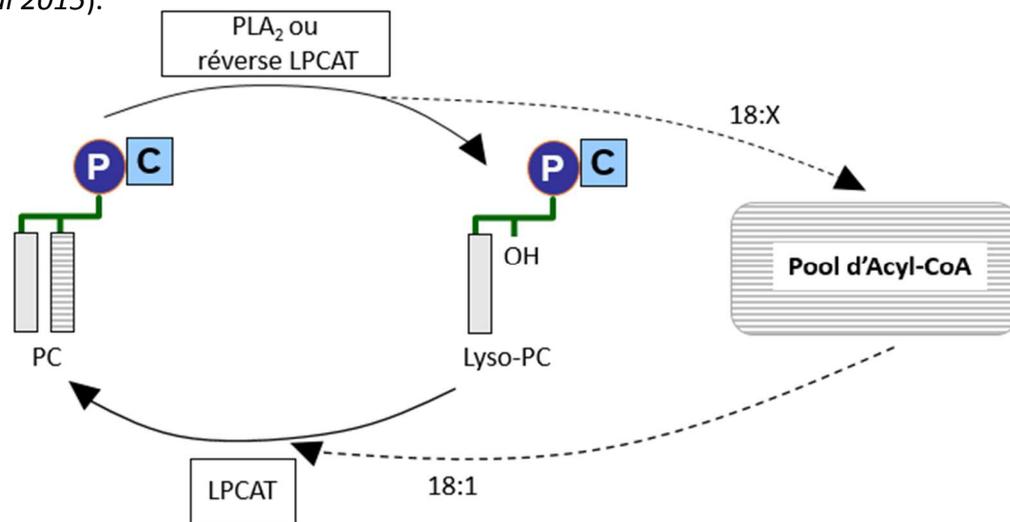


Figure 22 : Cycle de Lands. Après désaturation par les FAD2/3, les acides gras présents en position *sn*-2 de la PC, sont libérés par une PLA₂ ou par l'action réverse de la LPCAT. Une molécule de lyso-PC est formée et l'acide gras libéré rejoint le pool d'acyl-CoA. La LPCAT est aussi capable d'ajouter un acide gras sur la position *sn*-2 libre de la lyso-PC pour reformer une molécule de PC à partir du pool d'acyl-CoA. Ce mécanisme permet de transférer les acides gras édités sur la PC à d'autres lipides membranaires ou aux TAG, par l'intermédiaire du pool d'acyl-CoA. Les flèches pleines représentent le flux du squelette glycérol et les flèches pointillées le flux d'acide gras. PC : phosphatidylcholine, PLA₂ : PHOSPHOLIPASE A2, Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine, LPCAT : LYSOHOSPHATIDYLCHOLINE ACYLTRANSFERASE. Adapté de Bates et al 2016.

β. Edition des acides gras par la PHOSPHOLIPID : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE (PDAT)

L'enzyme PHOSPHOLIPID : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE (PDAT) transfère directement l'acide gras en position *sn*-2 de la PC sur la position *sn*-3 d'une molécule de TAG, formant également de la lyso-PC comme coproduit (Dahlqvist et al 2000) (Figure 23). La lyso-PC serait ensuite pris en charge par la LPCAT pour être re-acylée (Xu et al 2012). Cette activité permet de transférer un acide gras nouvellement modifié directement vers les TAG, sans passer par le pool d'acyl-CoA. En effet, des études conduites principalement sur A.

thaliana et *R. communis*, montrent que PDAT aurait une préférence pour le transfert des acides gras modifiés (Stahl et al 2004, van Erp et al 2011). Au sein de la voie de biosynthèse des TAG, les enzymes DGAT et PDAT ont donc la même fonction mais elles utilisent des pools d'acides gras différents, respectivement le pool d'acyl-CoA et les acides gras en position *sn*-2 de la PC. Une plante *Arabidopsis* KO pour le gène *PDAT1* ne présente aucun changement dans la quantité et la composition des TAG présents dans la graine (Mhaske et al 2005). Cependant, l'expression du gène codant pour la PDAT est surexprimée dans le mutant *dgat1*, qui produit alors 80% des TAG présents chez la plante sauvage (Zhang et al 2009). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'action de PDAT est secondaire à celle de DGAT1 pour la synthèse de TAG dans les graines d'*Arabidopsis*, bien que pouvant compenser en grande partie l'absence de DGAT1. Des essais d'obtention de double mutant *dgat1 pdat1* se sont révélés vains, montrant que les deux enzymes sont primordiales pour la plante (Zhang et al 2009). Récemment, l'implication de ces deux enzymes dans la production de TAG dans les feuilles a été démontrée. L'action de l'enzyme PDAT interconnecte les lipides membranaires et le métabolisme des TAG et elle joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie membranaire dans les feuilles, en cas de stress ou de forte production d'acide gras (Fan et al 2013 *Plant Cell*, Fan et al 2013 *Plant Journal*). La surexpression du gène codant pour PDAT1, entraîne une accumulation de TAG sous forme de gouttelettes lipidiques dans les feuilles et s'accompagne d'une stimulation des enzymes FAS qui augmentent le flux de synthèse des acides gras. La prédominance d'utilisation par les cellules d'une enzyme envers l'autre dépend de l'espèce végétale et de son stade de développement (Banas et al 2013). Chez le tournesol, l'activité de la DGAT est cinq fois supérieure à celle de la PDAT, alors que dans les graines de carthame, l'activité PDAT est prédominante à la fin du développement de la graine.

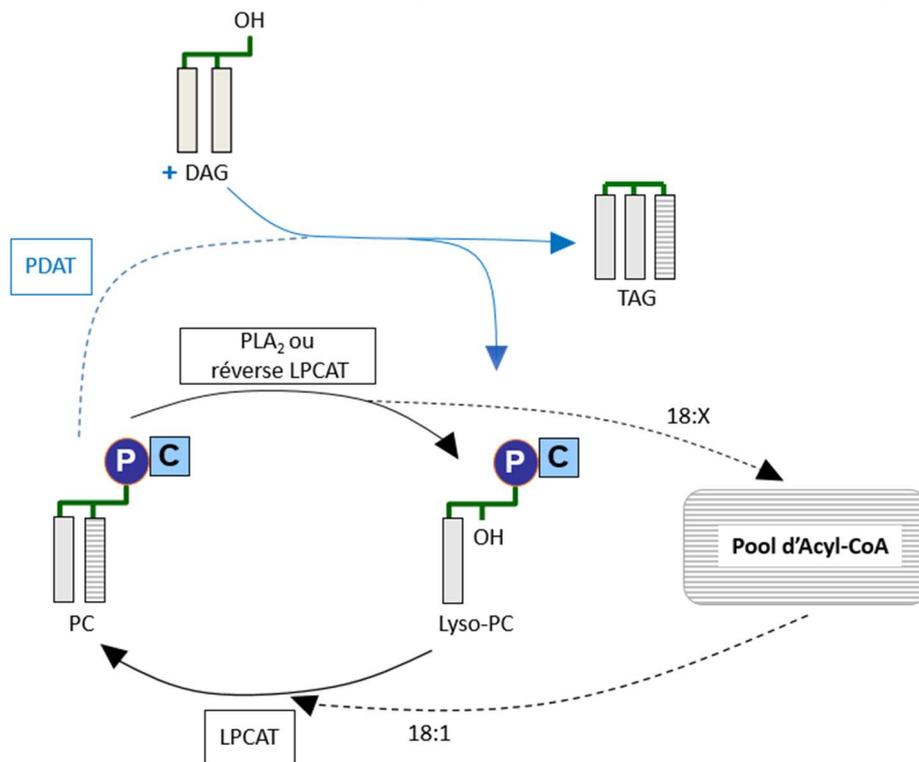


Figure 23 : Rôle de PDAT dans l'édition des acides gras portés par la PC. L'enzyme PDAT est

capable de retirer l'acide gras présent en *sn-2* de la PC pour acyler la position *sn-3* du DAG, formant ainsi une molécule de TAG (comportant un acide gras polyinsaturé en dernière position). La lyso-PC ainsi formée est recyclée par l'action de la LPCAT. Ce mécanisme de transfert d'acide gras sans passer par le pool d'acyl-CoA, privilégie l'incorporation des acides gras insaturés en *sn-3* des TAG. Le cycle de Lands est représenté en flèches noires, l'action de PDAT en flèche bleues. Les flèches pleines représentent le flux du squelette glycérol et les flèches pointillées le flux d'acide gras. PC : phosphatidylcholine, PLA₂ : PHOSPHOLIPASE A₂, Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine, LPCAT : LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE ACYLTRANSFERASE, DAG : diacylglycérol, TAG : triacylglycérols, PDAT : PHOSPHOLIPID : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE.

γ. Rôle des enzymes LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE TRANSACYLASE (LPCT) et ACYL-COA : GLYCEROPHOSPHOCHOLINE ACYLTRANSFERASE (GPCAT)

L'édition des acides gras portés en position *sn-2* de la PC est le principal mécanisme eucaryote permettant la création de PUFAs. Cependant, la composition de la PC, notamment en espèces insaturées sur la position *sn-1*, démontre que d'autres mécanismes existent. La phospholipase A₁ DAD1, est impliquée dans la synthèse de l'acide jasmonique mais aucune étude ne pointe pour le moment un rôle de ces phospholipases dans le turn-over des acides gras de la PC (Ishiguro *et al* 2001). Deux nouvelles enzymes ont été récemment identifiées dans les préparations microsomiales des graines de la plante oléagineuse carthame et dans les feuilles et les racines d'*A. thaliana* : LPCT et GPCAT pourraient jouer un rôle dans les échanges des acides gras entre les positions *sn-1* et *sn-2* de la PC (Lager *et al* 2015). Précédemment, nous avons vu que la lyso-PC issue de l'action de la PDAT, d'une phospholipase A₂ ou de l'activité réverse de la LPCAT, peut être ré-acylée par la LPCAT en PC. Une réaction alternative passe par la LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE TRANSACYLASE (LPCT) qui utilise deux lyso-PC pour former de la glycérophosphocholine (GPC) et de la PC (**Figure 24**). LPCT transfère l'acide gras restant en *sn-1* de la première lyso-PC sur la position *sn-2* de la deuxième lyso-PC (Lager *et al* 2015). Cette voie permet de placer des acides gras insaturés ou modifiés en position *sn-1* de la PC. L'intervention de l'ACYL-COA : GLYCEROPHOSPHOCHOLINE ACYLTRANSFERASE (GPCAT), permet de produire de la lyso-PC à partir de la molécule de GPC (**Figure 24**). Cette enzyme a d'abord été identifiée chez la levure (Stalberg *et al* 2008), puis son activité mesurée dans des fractions microsomiales de plantes comme évoqué précédemment (Lager *et al* 2015). Ces deux enzymes mettent en lumière de nouveaux mécanismes d'échanges des acides gras en position *sn-1* et *sn-2* de la PC, permettant l'édition l'acide gras initialement positionné en *sn-1*.

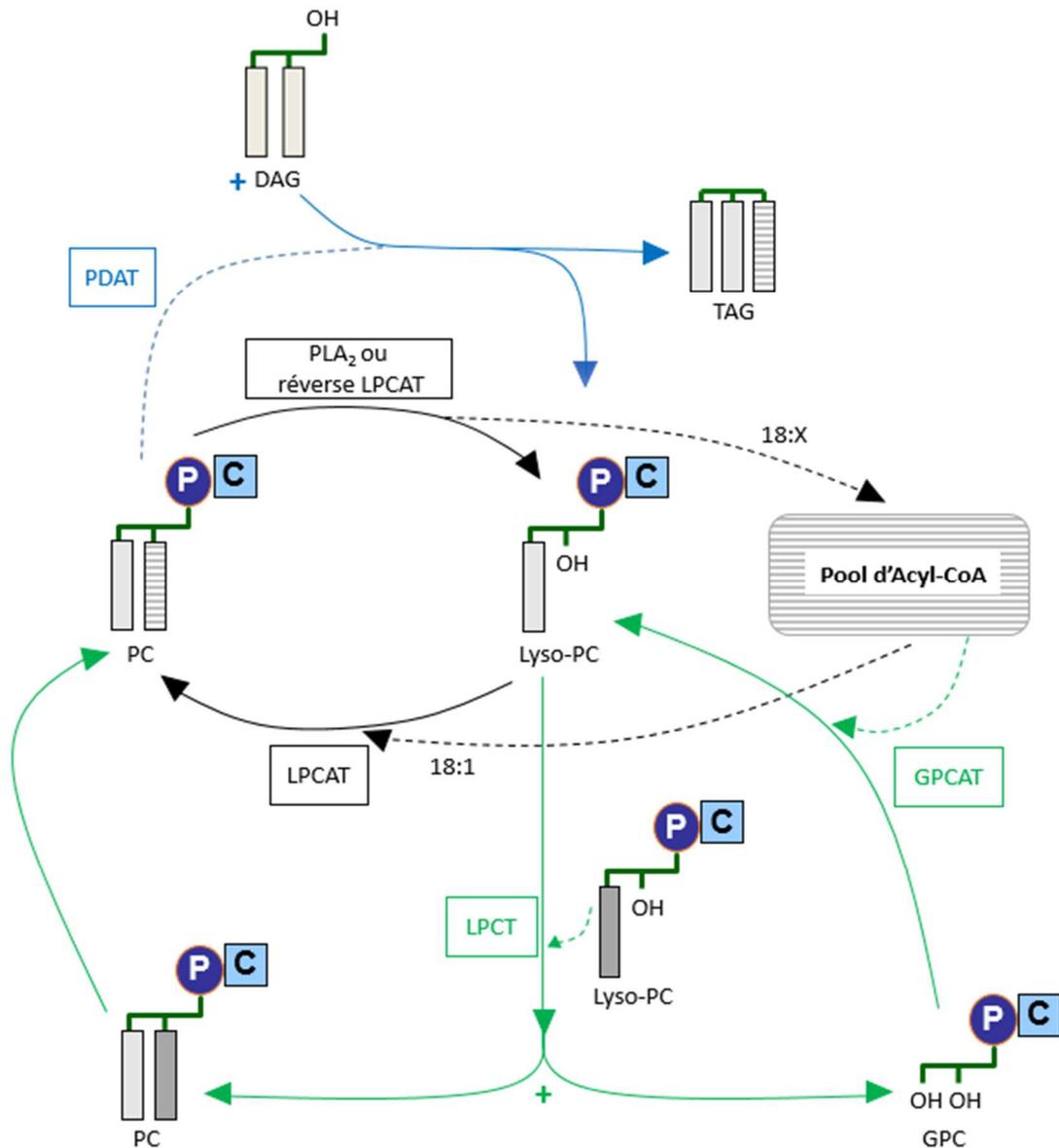


Figure 24 : Ensemble des processus menant à l'édition des acides gras et focus sur le rôle de LPCT et GPCAT. Les molécules de lyso-PC peuvent être recyclées par la LPCAT mais elles peuvent également être prises en charge par la LPCT, qui, utilisant deux lyso-PC comme substrat, synthétise de la PC et de la GPC. Ce mécanisme permet de rendre accessible à la désaturation des acides gras positionnés au départ en *sn*-1 de la PC/lyso-PC. Le GPC formé est recyclé en lyso-PC par la GPCAT en présence d'un acyl-CoA. Le cycle de Lands est représenté en flèches noires, l'action de PDAT en flèches bleues et l'action de LPCT et GPCAT en flèches vertes. Les flèches pleines représentent le flux du squelette glycérol et les flèches pointillées le flux d'acide gras. PC : phosphatidylcholine, PLA₂ : PHOSPHOLIPASE A2, Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine, LPCAT : LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE ACYLTRANSFERASE, DAG : diacylglycérol, TAG : triacylglycérols, PDAT : PHOSPHOLIPID : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE, LPCT : LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE TRANSACYLASE, GPC : glycérophosphocholine, GPCAT : ACYL-COA : GLYCEROPHOSPHOCHOLINE ACYLTRANSFERASE.

ii. Production de DAG dérivé de la PC

La PC étant le site d'édition des acides gras, le pool de DAG provenant de la PC est donc différent du pool de DAG synthétisé *de novo*. Des expériences de marquage au [¹⁴C] acétate ou au [¹⁴C] glycérol ont révélé que dans l'embryon de soja en développement, le pool de DAG néosynthétisé est distinct de celui utilisé pour la synthèse de TAG. De plus, durant la phase d'accumulation des lipides de réserve dans l'embryon, le flux majeur de [¹⁴C] glycérol est dirigé vers la synthèse de PC plutôt que vers celle de TAG. Ces deux études (*Bates et al 2009, Lu et al 2009*) ont montré que le pool de DAG utilisé pour produire des TAG, provient en grande partie de DAG dérivés de la PC, plutôt que de DAG néosynthétisés.

α. Néosynthèse et turn-over de PC permettant la production de DAG

La production de DAG dérivé de la PC doit être en équilibre avec la synthèse *de novo* de PC pour maintenir l'homéostasie de ce phospholipide.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le turn-over de la PC. Premièrement, des études *in vivo* avec des graines de lin et des expériences *in vitro* avec des fractions microsomales de carthame ont mis en évidence l'action réverse de l'enzyme CPT, qui permet d'ajouter ou d'enlever la tête polaire CDP-choline sur une molécule de DAG (*Slack et al 1983*). Cette action réverse permet un équilibre des espèces PC et DAG.

Un deuxième mécanisme impliqué dans la synthèse de DAG à partir de PC est celui qui implique l'action des phospholipases C non spécifiques ou NPC. Comme vu précédemment, ces enzymes sont impliquées dans la réponse au stress mais l'état des connaissances actuelles n'a pas montré leur implication dans la production de TAG (*Li-Beisson et al 2013, Nakamura et al 2005, Gaude et al 2008*).

Finalement, l'action conjuguée de phospholipases D et de phosphatases -qui clivent la choline puis le phosphate de la tête polaire de la PC- permet de créer une molécule de DAG. La suppression de l'activité PLD dans les graines de soja réduit partiellement dans les TAG le taux d'acide gras modifiés provenant de la PC (*Lee et al 2012*). Ce résultat semble indiquer que l'action des PLD/PAH joue effectivement un rôle dans le turn-over de la PC et la synthèse de DAG dérivé de PC.

β. Rôle de la PHOSPHATIDYLCHOLINE : DIACYLGLYCEROL

CHOLINEPHOSPHOTRANSFERASE (PDCT) dans les échanges DAG-PC

L'enzyme PHOSPHATIDYLCHOLINE : DIACYLGLYCEROL CHOLINEPHOSPHOTRANSFERASE (PDCT) est encodée par le gène ROD1 et utilise le DAG et la PC comme substrats. Elle transfère de façon réversible la phosphocholine de la PC au DAG, créant ainsi deux nouvelles espèces de PC et DAG (**Figure 25**). Ce DAG dérivé du squelette de la PC est alors disponible pour la synthèse de TAG. Les mutants *Arabidopsis rod1* montrent une réduction de 40% du flux d'acides gras modifiés de la PC au TAG (*Wickramarathna et al 2015*). Dans le triple mutant *pdct lpcat1 lpcat2*, le taux d'acide gras insaturés dans les TAG baisse de 66% comparé au sauvage (*Bates et al 2012*). Ce phénotype est plus important que l'addition des

deux phénotypes *pdct* et *lpcat1 lpcat2*, ce qui montre que l'activité PDCT peut compenser l'activité LPCAT et vice versa.

Des expériences *in vivo* de radiomarquage suggèrent que les deux pools de DAG, néosynthétisé et dérivé de la PC, sont séparés et que PDCT agit uniquement sur le pool de DAG dérivé de la PC (Bates *et al* 2009). Une hypothèse pour expliquer cette distinction serait que les deux pools soient physiquement séparés dans des parties ou "microdomaines" différents du réticulum endoplasmique (Shockey *et al* 2016). D'autre part, il est aussi possible que la qualité des acides gras influe sur l'affinité de PDCT pour son substrat.

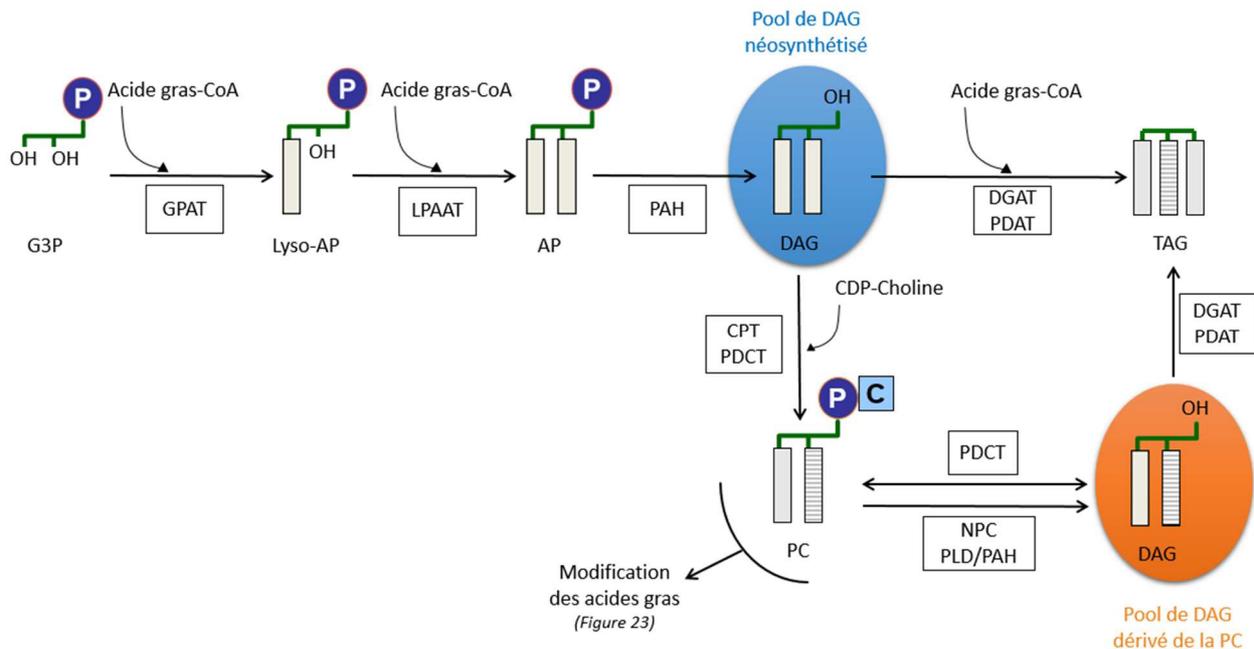


Figure 25 : Synthèse du DAG dérivé de la PC.

La néosynthèse du DAG passe par la double acylation du G3P par la GPAT et la LPAAT, puis par la déphosphorylation de l'AP par la PAH. Suivant l'affinité des enzymes GPAT et LPAAT pour les différentes espèces d'acyl-CoA, le DAG formé peut présenter des acides gras possédant des degrés d'insaturations différents. Le DAG obtenu est le précurseur des molécules de TAG, via l'action de la DGAT ou de la PDAT selon la voie Kennedy ou des lipides membranaires comme la PC. Un autre pool de DAG existe également. Il est appelé "DAG dérivé de la PC" car il est formé d'un squelette glycérol issu d'une molécule de PC, pouvant posséder des acides gras édités. Ce pool de DAG peut provenir de la coupure de la tête polaire de la PC par des enzymes NPC ou par l'action conjuguée des PLD et de PAH. L'enzyme PDCT peut aussi générer du DAG dérivé de la PC en échangeant la tête polaire de la PC avec une autre molécule de DAG. Finalement, un troisième acide gras est ajouté, provenant du pool d'acyl-CoA (action de DGAT) ou de la PC elle-même (au travers de la PDAT) pour former du TAG. Ces mécanismes permettent d'obtenir des acides gras modifiés en *sn*-2 de la molécule de TAG. G3P : glycérol 3-phosphate, GPAT : *sn*-GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE, LPAAT : LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE, Lyso-AP : lyso acide phosphatidique, AP : acide phosphatidique, PAH : PHOSPHATIDIC ACID HYDROLASE,

PC : phosphatidylcholine, CTP : CTP : PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLYLTRANSFERASE, TAG : triacylglycérols, DGAT : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE, PDCT : PHOSPHATIDYLCHOLINE : DIACYLGLYCEROL CHOLINEPHOSPHOTRANSFERASE, NPC : NON-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C, PLD : PHOSPHOLIPASES D, PAH : PHOSPHATIDIC ACID HYDROLASES, PDAT : PHOSPHOLIPID : DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE.

En résumé, la qualité des TAG dans une cellule végétale, dépend de la qualité de ces acides gras. La provenance du précurseur DAG, néosynthétisé à partir de la voie Kennedy ou dérivé de la PC influence grandement la composition des lipides de stockage. Et les mécanismes d'édition des acides gras de la PC permettent d'alimenter les pools d'acyl-CoA et de DAG en acide gras polyinsaturés. Tout un réseau de réactions complexes contribue donc à produire une large gamme de lipides membranaires et de réserve différents, ce qui joue un rôle important dans les mécanismes d'adaptation, comme par exemple la fluidité des membranes à basse température. Pourquoi les plantes produisent-elles un si grand nombre d'espèces moléculaires de TAG reste une question ouverte.

2. Régulation de la production des TAG

a. Cas particulier de la graine

Les voies de synthèse des TAG décrites à partir de la page 50, ont été majoritairement mises en évidence dans les graines des plantes terrestres. En effet, les graines sont les organes des plantes qui accumulent le plus de réserve lipidique, notamment sous forme de triacylglycérols. Ces réserves sont utilisées pour produire l'énergie nécessaire à la germination, palliant ainsi l'absence des mécanismes de photosynthèse qui ne sont pas encore mis en place.

Deux phases définissent la formation de la graine : la morphogénèse durant laquelle l'embryon se développe et la maturation qui comprend les mécanismes d'accumulation des composés de réserves (TAG, amidon et protéines principalement) ainsi que l'acquisition de la dormance et celle de la tolérance à la déshydratation (*Goldberg et al 1994*). Chez le modèle *A. thaliana*, ce sont les cotylédons de l'embryon qui stockent la plus grande quantité des TAG de la graine, avec environ 60% des acides gras totaux (*Li et al 2006*). Durant la maturation des graines, le saccharose produit par la plante lors de la photosynthèse est dirigé vers les siliques pour permettre la formation des TAG (**Figure 26**). La maturation des graines est donc dépendante de l'état physiologique de la plante et peut être influencée par la disponibilité en énergie et en ressources carbonées. En effet, la synthèse d'acide gras consomme de l'énergie sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur sous forme NADPH ou NADH. Les acides gras constituent une source de carbone réduite, ce qui permet une grande libération d'énergie lorsqu'ils sont oxydés lors de la germination (*Baud et Lepiniec 2010*). La quantité et la qualité des TAG peuvent être impactées par le taux d'oxygène et la température. En effet, les graines doivent faire face au manque d'oxygène, dû à leur petite surface d'échange avec le milieu extérieur mais également à la perméabilité faible des tissus les entourant (siliques,...). Des conditions de faibles concentrations en oxygène, inhibent la

formation de TAG chez le soja et *Arabidopsis*, tandis que l'augmentation de ce gaz dans le milieu extérieur stimule la production des lipides de réserves (*Shelp et al 1995, Kuang et al 1998*).

Il a été décrit que des températures basses induisent la production d'acides gras polyinsaturés, distribués parmi les lipides membranaires de la plante pour augmenter la fluidité des membranes (*Los et al 2013*). Chez la graine, le même phénomène a été mis en évidence sur les acides gras portés par les molécules de TAG et pourrait s'expliquer par des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de la désaturase FAD2 (*Garces et al 1994, Rolletschek et al 2007*).

L'accumulation de TAG au cours de la maturation de la graine répond également à des processus encodés dans le génome de la plante. Ainsi, tout un réseau de facteurs de transcription de type "régulateurs maîtres" (ou "master régulateurs") sont activés pour stimuler les voies de biosynthèses des lipides de réserves. Un grand nombre de facteurs de transcription impliqués dans la maturation de la graine sont sous le contrôle du facteur de transcription LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2). LEC2 possède un domaine B3 qui lui permet de se lier aux promoteurs des gènes qu'il induit. La surexpression du gène LEC2 provenant du ricin commun chez *Arabidopsis*, entraîne l'activation des facteurs de transcriptions LEC1, L1L (LEAFY COTYLEDON1-LIKE), FUS3 (FUSCA3) et ABI3 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3), participant à la maturation de la graine et de WRI1 (WRINKLED 1) qui agit directement sur la synthèse d'acide gras et induit une augmentation de TAG (*Kim et al 2014*). FUS3 et ABI3 sont capables de s'autoréguler positivement eux-mêmes ou l'un l'autre durant la maturation de la graine (*Santos-Mendoza et al 2005*). La perte de fonction du gène LEC2 chez les graines matures d'*A. thaliana* provoque une baisse de 15% des protéines et de 30% des lipides de réserves, les taux d'amidon restant équivalents aux graines sauvages (*Angeles-Nunez et al 2011*). A l'inverse, l'expression de LEC2 permet de stimuler la production de protéines de surface des gouttelettes lipidiques comme l'oléosine OLEO1 et la stéroléosine HSD1 (HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (*Baud et al 2009*). Les facteurs de transcriptions ABI3 et ABI5 contrôlent également le niveau d'oléosine au travers des taux d'acide abscissique présents lors des différents stades de développement de la graine (*Crowe et al 2000*). ABI4 est capable d'activer directement l'expression du gène codant pour la DGAT, dernière enzyme de synthèse des TAG (*Yang et al 2011*). Chez *Arabidopsis*, un mutant *wri1* présente 80% de réduction de TAG, indiquant son importance pour la production de lipide dans les graines (*Cernac et Benning 2005*). En effet, WRI1 se lie à des éléments-cis présents dans les régions promotrices de gènes impliqués dans la glycolyse et la synthèse d'acide gras (*Marchive et al 2014*).

Passé les stades de maturation où la graine fait ses réserves, ces facteurs de transcriptions sont réprimés et continuent de l'être une fois la plante développée. Ainsi, une famille de répresseur VAL1, 2 et VAL3 (VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-LIKE 1, 2 et 3) permet d'éteindre les processus de maturation en ciblant directement LEC2, FUS3 et ABI3 ou en rentrant en compétition sur les éléments de liaisons des cibles de ces facteurs de transcription (*Tsukagoshi et al 2007*). Afin d'augmenter la production d'huile dans les tissus

végétatifs des plantes, des stratégies utilisant la surexpression des gènes activant les voies de synthèses des TAG sont actuellement utilisées. Néanmoins, l'inhibition des gènes réprimant les mécanismes de production est peut être aussi intéressante à étudier.

b. Cas particulier des tissus végétatifs

Les tissus végétatifs des plantes terrestres et en particulier les racines et les feuilles, ne sont pas des tissus qui accumulent de larges quantités de TAG, bien que les enzymes impliquées dans leur synthèse soient présentes (pour revue : *Xu et Shanklin 2016*). Par exemple, les TAG représentent moins de 1% des glycérolipides totaux dans les feuilles en situation optimale de croissance (*Tjellström et al 2015*). L'absence de TAG dans les feuilles s'explique par le fait que ce sont des tissus "sources". Ils sont spécialisés dans la photosynthèse et la production de carbohydrates qui sont ensuite exportés pour permettre la croissance et le développement de la plante. Pendant la journée, en parallèle de la photosynthèse, les feuilles accumulent de l'amidon, source d'énergie qui est dégradée en sucres solubles pendant la nuit. Ainsi, à l'inverse des graines qui accumulent des TAG, la source primaire de stockage de carbone dans les tissus photosynthétiques est l'amidon (*Kelly et Feussner 2016*) (**Figure 26**). Il est néanmoins possible d'orienter le métabolisme des feuilles vers la production de TAG par ingénierie génétique. Ainsi, *Vanhercke et al 2014*, ont réussi à faire produire des TAG à des feuilles de tabac, représentant environ 15% de leur poids sec. Pour cela ils ont co-exprimé les gènes d'*A. thaliana* codant pour les facteurs de transcriptions WRI1 ou LEC1/2, ceux des ACCases et des acyltransférases et inhibé le retour des acides gras d'origine eucaryote vers le chloroplaste en mutant le transporteur TGD1 ou l'enzyme MGD1. Ils ont également couplé cette stratégie avec la surexpression des oléosines, protéines de surfaces des gouttelettes lipidiques et en mutant des protéines impliquées dans la dégradation des lipides de réserve (SDP1, CGI-58) pour favoriser le maintien des TAG dans les cellules. Les cellules végétatives sont donc capables de répondre à une stimulation du facteur de transcription WRI1. Chez *Arabidopsis*, seul WRI1 est capable d'induire l'activation des gènes qui sont responsables de la synthèse des acides gras dans la graine : les mutants *wri3* et *wri4* n'affectant pas l'accumulation de TAG dans cet organe de la plante. Les trois isoformes sont néanmoins impliquées dans la production d'acides gras nécessaires à la synthèse de cutine dans les fleurs, permettant la bonne formation de l'organe floral (*To et al 2012*). Ce résultat montre que certains facteurs de transcription WRINKLED sont également exprimés dans les tissus végétatifs de la plante. Leur implication dans la production de TAG dans ces tissus reste encore à déterminer.

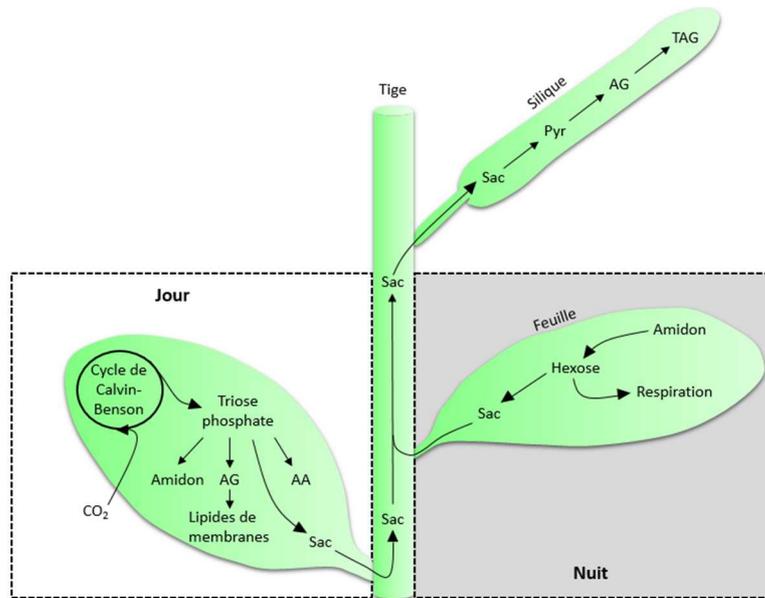


Figure 26 : Métabolisme des réserves énergétiques dans les feuilles. Au cours de la journée, la photosynthèse convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique, ce qui permet d'alimenter la synthèse de sucres et de molécules organiques dérivées à partir de dioxyde de carbone (CO₂) dans le cycle de Calvin-Benson localisé dans le stroma des chloroplastes. Les trioses phosphates produits permettent la synthèse de l'amidon, des lipides membranaires et des acides aminés dans le chloroplaste ou sont exportés vers le cytosol pour la synthèse du saccharose (Sac). Durant la nuit, l'amidon peut être hydrolysé en glucose et plus de 80% du carbone assimilé pendant la journée est exporté sous forme de saccharose dans le phloème, depuis les feuilles matures jusqu'aux organes reproducteurs. Dans les graines et les fruits, le saccharose est alors clivé en glucose et fructose pour permettre la synthèse d'amidon mais aussi de protéines de stockage et d'huile. AG : acide gras, Pyr : pyruvate, TAG : triacylglycérol. Schéma adapté de *Kelly et Feussner 2016*.

i. Les plantes stressées produisent des TAG dans les feuilles

L'accumulation de TAG dans les tissus végétatifs est souvent considérée comme "transitoire", répondant notamment à des stimuli de stress. Les exemples connus de stress induisant une production de TAG dans les tissus végétatifs des plantes ne sont pas nombreux. On compte ainsi la fumigation à l'ozone, le froid et la sécheresse et la carence en azote. Des feuilles d'épinard présentent une accumulation de TAG et une baisse de la quantité de PC et des galactolipides en présence d'un traitement à l'ozone. Les TAG proviendraient de l'hydrolyse du MGDG via une activité GGGT (GALACTOLIPID : GALACTOLIPID GALACTOSYLTRANSFERASE) (*Sakaki et al 1985 et 1990*). C'est cette même activité GGGT, identifiée comme étant due la protéine SFR2 (SENSITIVE TO FREEZING 2), qui semble également responsable de la production de lipides de réserve au court d'un stress au froid chez *Arabidopsis* (*Moellering et al 2010*). L'enzyme SFR2 permet de former du tri et du tétra-galactosyldiacylglycérol (TG DG et Te DG) à partir de MGDG et libère également du DAG qui est à son tour acylé en position *sn*-3 pour former des TAG. Le remodelage des

membranes du chloroplaste par SFR2 augmente leur stabilisation et leur résistance au froid. En effet, le gel entraîne une déshydratation des cellules (de la glace se forme dans l'apoplaste), les organites cellulaires (dont les chloroplastes) se flétrissent et l'excès de MGDG serait orienté vers la production de TAG (Moellering et al 2010, Roston et al 2014). Lors d'un stress hydrique, une baisse de la teneur en MGDG concomitante avec une augmentation de la teneur en TAG a été observée, que les plantes soient tolérantes (*C. plantagineum* par exemple) ou sensibles à la déshydratation comme *Arabidopsis* (Gasulla et al 2013). La réponse des cellules à ces stress démontrent une remobilisation des lipides membranaires et en particulier des galactolipides, pour produire du DAG, précurseur des TAG, plutôt qu'une néosynthèse des lipides de réserves.

Les carences en nutriment (phosphate et azote) sont des situations connues et utilisées pour favoriser la formation de lipides de stockage dans les microalgues (Abida et al 2015). Chez les plantes, les études qui mettent en évidence une accumulation de TAG consécutive à une carence en nutriment sont plus rares. Durant une carence en phosphate, les remaniements des lipides membranaires, à savoir la production des galactolipides (DGDG notamment) pour remplacer les phospholipides dégradés dans le but de recycler le phosphate présent dans les têtes polaires sont bien décrits (Jouhet et al 2004, Michaud et al 2016). Shimojima et al 2015 ont également montré qu'une carence en phosphate entraîne une accumulation de TAG dans les feuilles et les racines chez différentes espèces de plantes (*Arabidopsis*, tomate et tabac). Cette accumulation est de manière surprenante non couplée avec une expression des enzymes de la voie de biosynthèse des TAG : DGAT1/2 et PDAT, ce qui suggère peut être une inhibition du catabolisme des lipides de réserve. La comparaison avec une carence en azote a également permis de montrer que la production de TAG met plus de temps à se mettre en place en carence phosphate qu'en carence d'azote (respectivement 10 jours contre 7 jours) chez les plantules d'*Arabidopsis*. Et que la production de TAG en carence de phosphate est 1,5 fois plus faible que celle retrouvée en carence d'azote. Les mêmes expériences chez un mutant *pgm-1* (Phosphoglucomutase plastidiale), n'accumulant pas d'amidon suggèrent une accumulation de TAG encore plus forte. Ces résultats interpellent sur la dualité amidon/TAG et les flux de carbone qui peuvent être redirigés à une voie de synthèse quand l'autre est inhibée. Néanmoins, les conclusions de Shimojima et al 2015 ne s'appuient que sur de l'imagerie et demandent à être confirmées par un dosage des TAG. L'effet d'une carence en azote sur des plantes a mis en évidence une accumulation de TAG et d'esters phytyles contenant des acides gras, associée à une diminution du MGDG et de la chlorophylle (Gaude et al 2007). Yang et al 2011 ont montré qu'en présence de concentrations d'azote très faibles (0.1 mM), la teneur en TAG augmente fortement et qu'elle est concomitante avec un arrêt de la croissance chez les plantules âgées de sept jours. De manière intéressante, la production de TAG est accentuée par la présence de saccharose dans le milieu (50 mM) et les gènes de la voie de biosynthèse des TAG sont stimulés : DGAT1/2 et PDAT. Ce résultat illustre l'effet d'une source de carbone sur la production de TAG et suggère que les modèles mixotrophes sont peut-être plus intéressants que les modèles autotrophes pour une production de biocarburants.

3. Gouttelettes lipidiques : lieu de stockage des TAG

Les gouttelettes lipidiques sont des compartiments cellulaires qui permettent de stocker les TAG produits par le réticulum endoplasmique. Ces compartiments ne sont pas inertes, ils interagissent avec les processus cellulaires, notamment grâce aux protéines présentes dans la monocouche lipidique les entourant, monocouche constituée essentiellement de phospholipides. Ainsi, les gouttelettes lipidiques sont impliquées dans la mobilisation des réserves (dégradation des TAG) mais également dans la réponse aux stress, les voies de signalisation des phytohormones et le développement des plantes.

a. Synthèse et régulation des gouttelettes lipidiques

La synthèse des TAG s'effectue dans le réticulum endoplasmique. L'assemblage des gouttelettes lipidiques commence quand les TAG s'accumulent entre les deux feuillettes de la membrane du réticulum. La gouttelette grossit et par un phénomène de bourgeonnement, elle est "expulsée" dans le cytoplasme, emportant avec elle le feuillet externe de la membrane du réticulum, qui compose la monocouche de lipides membranaires de la surface des gouttelettes (Yatsu et al 1972). La production de TAG et la formation de gouttelettes semblent s'effectuer dans des endroits spécifiques du réticulum. Ainsi, des études ont montrées que les enzymes DGAT, catalysant la dernière étape de formation des TAG et les oléosines, protéines de surface des gouttelettes, étaient localisées dans des microdomaines spécifiques (Shockey et al 2006). De façon plus anecdotique, la présence de gouttelettes lipidiques dans les plastes et les noyaux a également été décrite (Besagni et Kessler 2013, Uzbekov et Roingard 2013). Peu d'éléments mécanistiques sont connus concernant l'initiation de la formation des gouttelettes lipidiques, leur croissance et leur libération du réticulum. En effet, les gouttelettes lipidiques ont été longtemps été considérées comme étant uniquement des compartiments de réserve, les études se basant principalement sur les graines des plantes. Néanmoins, les gouttelettes lipidiques apparaissent aujourd'hui bien plus que de simples compartiments inertes de stockage. Les études sur les biocarburants et les huiles à valeur ajoutée ont stimulé l'intérêt pour ces compartiments cellulaires. La présence de protéines dans la monocouche membranaire entourant les gouttelettes est nécessaire aux interactions avec les autres territoires cellulaires. Chez les plantes, trois grandes catégories de protéines existent dans les gouttelettes : les oléosines, les caléosines et les stéroléosines.

Les oléosines sont retrouvées dans les graines et les tissus germinatifs (Kim et al 2002) et sont généralement absentes des tissus végétatifs de la plante, bien qu'elles puissent être exprimées de manière artificielle dans les feuilles (Beaudoin et Napier 2000, Wahlroos et al 2003). Elles s'oligomérisent dans des zones du réticulum endoplasmique et pourraient aider au bourgeonnement des gouttelettes. Ces protéines sont directement impliquées dans la stabilité et la régulation de la taille des gouttelettes. Des constructions d'ARNi chez *Arabidopsis*, visant à supprimer l'expression du gène principal de la famille OLEO1, induisent des tailles de gouttelettes aberrantes chez les embryons (Siloto et al 2006). Des études chez

la cacahuète ont également montrées que l'isoforme OLEO3 est capable d'une double activité phospholipase A / MGAT. Les cacahuètes surexprimant la protéine augmentent leur production de DAG et de TAG et présentent en parallèle une baisse de la teneur en phospholipides, montrant que ces protéines peuvent aussi être impliquées dans l'équilibre lipides membranaires/lipides de stockage (*Parthibane et al 2012*). Les oléosines joueraient également un rôle dans le recrutement de lipases qui permettent de mobiliser les réserves lipidiques. Les mutants *oleo1* chez *Arabidopsis* présentent une mobilisation des TAG réduite (*Siloto et al 2006*). Bien que les oléosines semblent avoir un rôle essentiel dans le maintien et la dégradation des gouttelettes lipidiques, elles sont uniquement présentes dans les graines, suggérant que d'autres mécanismes existent dans les tissus végétatifs (*Laibach et al, 2015*). Récemment, deux nouvelles protéines présentes sur la surface des gouttelettes ont été identifiées dans les tissus végétatifs de l'avocat et d'*A. thaliana*. Ces LDAP1 et LDAP2 (LIPID DROPLET-ASSOCIATED PROTEINS) seraient impliquées dans leur stabilisation (*Horn et al 2013*).

Les caléosines sont des protéines transmembranaires dépendantes du calcium et possèdent un rôle structurel et fonctionnel. La suppression de l'expression des gènes codant pour les oléosines chez le soja, induit la production de caléosines, montrant que ces protéines peuvent se suppléer (*Schmidt et Herman 2008*). Les caléosines sont importantes pour le maintien des gouttelettes lipidiques dans les tissus végétatifs, ceux-ci n'exprimant pas d'oléosines (*Aubert et al 2010*). De plus, les caléosines sont retrouvées chez les microalgues et les champignons, contrairement aux oléosines, uniquement retrouvées chez les plantes (*Huang et al 2009*). Cela suggère un lien évolutif entre ces protéines, les oléosines étant hypothétiquement des protéines qui ont évoluées à partir des caléosines. En plus de leur participation à la stabilité des gouttelettes, ces protéines sont impliquées dans le métabolisme des oxylipines. Elles sont capables d'agir en tant que peroxydases, catalysant la réaction d'oxygénation hydroperoxide-dépendante des acides gras pour produire des acides gras époxylés (*Meesapyodsuk et Qiu 2011*). Ces acides gras modifiés sont ensuite impliqués dans les réponses aux phytohormones, dans la gestion du stress et de l'immunité de la plante (*Mosblech et al 2009*). Chez *Arabidopsis*, la perturbation de la fonction caléosine induit une baisse du taux de dégradation des acides gras (*Poxleitner et al 2006*).

Enfin les stéroléosines, sont des protéines fréquemment associées aux gouttelettes lipidiques des graines et jouent un rôle important dans la signalisation aux brassinoïdes (*Chapman et al 2012*).

De nombreuses questions concernant le métabolisme des gouttelettes lipidiques restent encore en suspens. Par exemple, quels sont les mécanismes qui régulent la taille et le nombre des gouttelettes ? Ces deux paramètres jouent-ils un rôle physiologique ? Pourquoi existe-il des différences entre les organismes, les tissus, les conditions physiologiques de la plante ?

4. Catabolisme des TAG

Chez les plantes, le catabolisme des lipides est fortement présent durant la germination de la graine, la sénescence de la plante et en cas de stress. Comme évoqué page 43, les phospholipases sont impliquées dans le turn-over des lipides membranaires notamment au travers des échanges de têtes polaires et d'acides gras. Il a été également rapporté que ces réactions permettent le renouvellement des membranes en éliminant les lipides oxydés et en remplaçant les acides gras détériorés par des acides gras néosynthétisés (Nigam et Schewe, 2000).

La dégradation des molécules de TAG permet de mobiliser les réserves des gouttelettes lipidiques. L'hydrolyse des TAG s'effectue par une coupure des liaisons ester entre les acides gras et le squelette diacylglycérol. Elle est réalisée de manière séquentielle, les premières lipases s'attaquant à la position *sn*-1 et/ou *sn*-3 pour libérer des acides gras et du DAG et/ou du MAG (Monoacylglycérol) (Kelly et Feussner 2016). Le relargage des acides gras est suivi par la β -oxydation des acides gras dans le peroxyosome, dont les produits peuvent être utilisés pour la respiration dans les mitochondries ou pour la gluconéogenèse dans le cytosol (Graham 2008).

Les lipases sont localisées à la surface de la monocouche des phospholipides qui recouvrent les gouttelettes lipidiques mais les mécanismes qui leur permettent d'accéder à leur substrat, les TAG, sont encore mal connus (Czabany et al 2008). Dans certains cas, comme les stades précoces de germination de la graine de concombre, il a été montré que des phospholipases peuvent dégrader la membrane entourant les gouttelettes, menant à la création d'espaces où les TAG sont accessibles (Noll et al 2000, Rudolph et al 2011). Les protéines retrouvées à la surface des gouttelettes lipidiques jouent également un rôle important, comme la caléosine qui peut être impliquée dans la dégradation des TAG lors de la germination (Poxleitner et al 2006).

Chez Arabidopsis, la première étape du catabolisme des TAG est catalysée par les enzymes SDP1 (SUGAR-DEPENDANT 1) et son homologue SDP1-Like, mises en évidence chez les graines (Eastmond 2006). Ensemble, les deux enzymes catalysent 95% de la première étape d'hydrolyse des TAG, libérant des acides gras et du glycérol ou du MAG. Dans un double mutant *sdp1 sdp1-l*, seulement 20% des graines forment des plantes adultes, ce qui montre l'importance de ces protéines mais suggère également des mécanismes compensatoires. SDP1 est initialement adressée au peroxyosome, puis transloquée à la surface des gouttelettes lipidiques par des "tubulations" formées par le peroxyosome (Thazar-Poulot et al 2015). La présence et l'activité de SDP1 dans les tissus végétatifs d'*A. thaliana* a été mise en évidence par l'observation de mutants *sdp1* qui présentent une augmentation de 50 fois de la teneur en TAG dans les racines (Kelly et al 2013). Fan et al 2013 et 2014 ont également montré que les TAG synthétisés à partir de la PC dans les feuilles sont pris en charge par l'enzyme SDP1 et que leurs acides gras sont dégradés par la β -oxydation. SDP1 est une enzyme intéressante à cibler pour des stratégies d'ingénierie visant l'accumulation de TAG dans les tissus végétatifs ou les graines.

Les étapes suivantes qui visent à dégrader le DAG et le MAG ne sont pas encore bien identifiées. Des gènes codant pour des MAGL (MONOACYLGLYCEROL LIPASES) ont été identifiés chez *Arabidopsis*. L'isoforme MAGL8 est un candidat probable pour le catabolisme du MAG durant la germination car il possède une forte affinité pour ce substrat, notamment les MAG contenant des acides gras 20:1. De plus, cette protéine a été observée à la surface des gouttelettes lipidiques (Kim et al 2016).

La recherche d'autres enzymes impliquées dans le catabolisme des TAG a mis en avant les protéines ATGL (ADIPOCYTIC TRIGLYCERIDES LIPASES) et CGI-58 (COMPARATIVE GENE IDENTIFICATION-58), protéines conservées chez les eucaryotes (James et al 2010). Chez *Arabidopsis*, 24 protéines appartiennent à la famille des CGI58-like et certaines d'entre elles présentent des activités MAG lipases. CGI-58 a également été décrite comme pouvant réguler le flux des acides gras dirigés vers le peroxysome par son association avec le transporteur PXA1 (PEROXISOMAL ABC TRANSPORTER 1), localisé à la surface de cet organelle (Park et al 2013). CGI-58 est exprimée dans tous les tissus de la plante et elle aurait un rôle important dans les cellules de Garde, la lipolyse des TAG permettant d'apporter l'énergie nécessaire à la production d'ATP, indispensable l'ouverture des stomates (McLachlan et al 2016).

D. Focus sur le métabolisme lipidique des microalgues

Ce chapitre résume les connaissances du métabolisme des lipides des microalgues. La recherche sur ces modèles est relativement récente et elle s'appuie sur les données préexistantes obtenues chez les plantes terrestres.

Les algues unicellulaires vivent dans des environnements très variés, ce qui peut expliquer la forte diversité d'acides gras et de lipides d'une espèce à l'autre. D'une manière générale, les compositions en lipides des microalgues sont assez différentes de celles des plantes. Par exemple, les microalgues contiennent plus d'acide gras à longue chaîne (Very Long Chain Fatty Acid, VLCFA), c'est-à-dire avec des chaînes carbonées supérieures à 18 carbones. Elles sont également plus riches en acides gras insaturés comme l'acide arachidonique (20:4), eicosapentaénoïque (EPA, 20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6) (Harwood et Guschina 2009). Comme pour les végétaux supérieurs, ce sont les galactolipides MGDG et DGDG qui sont les espèces dominantes dans ces organismes (Da Costa et al 2016). Néanmoins, les compositions en glycérolipides des algues sont également variables d'une espèce à l'autre. Par exemple; la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* ne possède pas de PC, pourtant essentielle chez les plantes. Les microalgues produisent également des lipides polaires "atypiques" tels que les glycérolipides bêtaïne: DGTS (diacylglycérol-O-N,N,N-triméthyl homoserine) chez *Chlamydomonas* et *Nannochloropsis* par exemple ou le DGTA (diacylglycérol-hydroxyméthyl-N,N,N-triméthyl β -alanine) chez *Phaeodactylum* (Eichenberger 1990). Chez cette dernière espèce, on peut aussi trouver de l'acyl-SQDG, c'est-à-dire un SQDG portant au niveau du sucre quinovose un acide gras à longue chaîne.

En 2016, les génomes de 21 espèces de microalgues (dont ceux de *P. tricornutum* et *N. gaditana*) ont été séquencés et partiellement annotés et des travaux d'identification de gènes candidats sont actuellement en cours (Zienkiewicz et al, 2016). En effet, la reconstruction des voies de synthèses des glycérolipides et en particulier des TAG chez les microalgues se base sur les prédictions génomiques et l'identification d'enzymes orthologues dont on connaît les fonctions chez d'autres organismes comme la levure, les animaux ou les plantes. L'avancée des connaissances pour le modèle *C. reinhardtii* a également favorisé le transfert à d'autres espèces de microalgues (Giroud et al, 1988), ainsi que les récents progrès effectués en transformation génétique, permettant d'étudier les phénotypes de mutants générés. Durant la dernière décennie, les études tendent à montrer que certains points de la biosynthèse des acides gras et des TAG diffèrent entre plantes et microalgues.

Chez les végétaux supérieurs et les microalgues, les TAG sont normalement synthétisés dans le réticulum endoplasmique. Toutefois, de récentes données tendent à prouver qu'une voie de biosynthèse est également présente dans le chloroplaste de *C. reinhardtii* (Fan et al 2011, Vieler et al 2012, Li et al 2014). Les gènes codant pour les enzymes responsables des voies classiques de production de TAG, comme la voie Kennedy, ont également été identifiés. La plupart des gènes codant pour la synthèse des acides gras dans les plastes sont aussi présents chez les microalgues. Les gènes des ACCases et des FAS sont présents chez *C. reinhardtii*, *P. tricornutum*, *Nannochloropsis* et *Chlorella* (Riekhof et al 2005, Bowler et al 2008, Vieler et al 2014, Blanc et al 2010). Les microalgues contiennent aussi les acyltransférases Acyl-CoA dépendantes, bien que des divergences avec les plantes soient observées en termes de copie de gènes. Chez *Arabidopsis*, neuf GPAT extraplastidiales et cinq LPAT sont connues. Pour *N. gaditana* ce sont neuf GPAT et neuf LPAT (Radakovits et al 2012). Le manque d'étude concernant les ACIDE PHOSPHATIDIQUE PHOSPHATASES (PAP), ne permettent pas pour le moment de conclure sur d'éventuel homologues chez les microalgues. A l'inverse, les données sur les DGAT sont bien référencées. Chez la plupart des microalgues, une seule isoforme de DGAT1 est encodée, comme pour les plantes, alors que *N. oceanica* présente deux isoformes (Li et al 2014). De manière intéressante, l'isoforme de DGAT1 prédite pour *P. tricornutum* est plus proche de l'enzyme des plantes que celle retrouvée chez les autres microalgues (Guihéneuf et al 2011). De plus, le gène de DGAT1 peut donner lieu à deux transcrits, "court et long", qui diffèrent par une insertion de 63 paires de bases rendant le transcrit long inactif. En condition physiologique, seul le transcrit court encode une enzyme active. Le transcrit long est décrit comme un transcrit "pré-mature", qui est produit en réponse à une carence en azote puis épissé pour donner une transcrit actif (Guihéneuf et al 2011). Chez les microalgues, la diversité des isoformes de DGAT2 est inégale, avec 12 isoformes différentes pour *N. oceanica* (Vieler et al 2012). Chez *P. tricornutum* il existe 4 isoformes putatives (Gong et al 2013). Les microalgues sont aussi capables, comme les végétaux supérieurs, d'utiliser les glycérolipides membranaires comme

donneurs d'acide gras pour la synthèse des TAG. Des séquences encodant pour des PDAT ont été identifiées dans la plupart des génomes des microalgues.

Dans les graines d'*A. thaliana*, la production de TAG est principalement sous la dépendance des facteurs de transcription LEC2 et WRI1 et les TAG synthétisés dans le réticulum endoplasmique sont stockés dans des gouttelettes lipidiques stabilisées par des protéines comme les oléosines (Chapman et al 2012). Chez *C. reinhardtii*, le seul facteur de transcription "master regulator" caractérisé pour le moment est NRR1 (Nitrogen Responsive Regulator 1). Les mutants perte-de-fonction *nrr1* présentent une diminution de 50% du niveau de TAG en réponse à une carence en azote (Boyle et al, 2012). Des transcriptomes réalisés sur *N. oceanica* et *N. gaditana*, ont mis en avant d'hypothétiques orthologues pour WRL1.

Les caractérisations des gouttelettes lipidiques des modèles *C. reinhardtii* et *N. oceanica* sont à ce jour les plus avancées (Wang et al 2009, Nguyen et al 2011). Une analyse protéomique chez *C. reinhardtii* a démontré que les gouttelettes sont associées à une trentaine de protéines, dont les enzymes impliquées dans la synthèse des TAG (GPAT, LPAT et PDAT) et celles impliquées dans la signalisation et la dégradation des TAG (Vieler et al 2012, Moellering et Benning 2010). Pourtant, aucun équivalent des protéines associées aux gouttelettes lipidique de la graine n'a été détecté chez ces microalgues, ce qui suggère une évolution divergente dans les facteurs associés au stockage des TAG. De ce point de vue, d'autres catégories de protéines ont été identifiées chez les algues, telle que la "MAJOR LIPID DROPLET PROTEIN", MLDP (Moellering et Benning 2010). Des orthologues de cette protéine sont retrouvées dans les lignées des algues vertes mais pas dans les algues rouges, les diatomées ou les plantes (Moellering et Benning 2010, Peled et al 2010, Davidi et al 2012). Le rôle des MLDP est essentiel pour la dynamique des gouttelettes: les MLDP sont capables de s'associer à la fois aux gouttelettes et au réticulum endoplasmique. Elles stabilisent les gouttelettes et permettent de recruter d'autres protéines et en particulier la tubuline (Tsai et al 2015). Les MLDP pourraient donc être impliquées dans le transport intracellulaire de ces gouttelettes. D'autres études chez *N. oceanica* ont révélé la présence de protéines LDSP (LIPID DROPLET SURFACE PROTEIN), qui ne sont pas encore caractérisées (Vieler et al 2012).

La production de TAG dans les microalgues résulte d'une réponse à un stress. Les gouttelettes doivent être formées et dégradées rapidement pour pouvoir mobiliser facilement ces réserves d'énergie, ce qui n'est pas comparable au stockage qui existe dans les graines où, a priori, c'est la réserve d'énergie sur le long terme qui prime. La différence de fonction des gouttelettes dans ces deux systèmes explique peut-être le manque de similitude observé au niveau des protéines associées. Ainsi les mécanismes de synthèse des TAG et de formation des gouttelettes lipidique dans les microalgues s'apparentent peut-être plus à ceux décrits dans les tissus végétatifs des plantes lorsque celles-ci sont soumises à un stress.

Les connaissances que nous avons du métabolisme des microalgues sont loin d'être complètes. Le séquençage des génomes a été une étape importante pour améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires, permettant une comparaison avec les gènes d'autres espèces connues. Concernant le métabolisme des lipides, de nombreuses similarités entre plantes terrestres et microalgues ont été mises à jour. Il existe néanmoins des différences, observables notamment au travers du nombre d'isoformes, souvent plus élevé chez les microalgues. De manière intéressante, cette diversité enzymatique fait écho à la diversité lipidique, encore une fois plus étendue chez les microalgues que les plantes. On peut penser que cette diversité a été favorisée par le fait que les microalgues doivent s'adapter à des environnements très variés, caractérisés par des changements rapides de leurs paramètres physico-chimiques (teneur en minéraux, disponibilité de la lumière,...).

III. Stratégie de génétique chimique

Comme évoqué précédemment, il existe des conditions dans lesquelles les TAG s'accumulent : principalement dans les graines des plantes oléagineuses ou en cas de carence en nutriment chez les microalgues. Afin d'étudier la voie de synthèse des lipides de stockage, différentes stratégies sont décrites dans la littérature, comme celles faisant intervenir de l'ingénierie moléculaire. D'autres méthodes consistent à perturber l'état physiologique des cellules en utilisant des inhibiteurs chimiques de certaines voies de biosynthèse. Quand la molécule utilisée agit sur une cible spécifique connue, permettant sa caractérisation fonctionnelle au niveau cellulaire, on parle d'une stratégie de génétique chimique réverse ("reverse chemical genetics"). Les intérêts d'une telle technique sont nombreux, à commencer par la facilité de mise en œuvre consistant à incuber un ou plusieurs composés avec un modèle cellulaire ou végétal. Les banques de composés chimiques appliquées à l'agronomie ou au biomédical sont des ressources disponibles, dans lesquelles il est possible de puiser une variété de molécules. De plus, un même composé peut être testé en parallèle sur différentes espèces, sans avoir besoin de cibler un organisme séquencé car les outils moléculaires ne sont pas nécessaires. Ces tests sont très malléables : l'application des molécules peut s'effectuer à différentes concentrations, sur différents temps et les réponses peuvent être observées à court et long terme. En jouant sur les concentrations appliquées, l'étude de gènes vitaux dont le knock-out est létal peut aussi être réalisée. De même, des familles de gènes entières peuvent être réprimées ou induites par une seule molécule, ce qui peut être une première approche avant de construire des mutants multiples (Chevalier et al 2016).

La stratégie de génétique chimique réverse a déjà été utilisée avec succès pour étudier la synthèse de certains lipides chez les plantes. C'est le cas de l'inhibiteur Galvestine-1 qui interfère avec la synthèse des galactolipides d'*A. thaliana*, en inhibant les MGDG synthases (Botté et al 2011, Boudière et al 2012). Chez les protozoaires *Toxoplasma goondi* et *Plasmodium falciparum*, il a été montré que l'action d'analogues du piperidinyl-

benzimidazolone sur le métabolisme des glycérolipides engendre un arrêt de la prolifération cellulaire (Saïdani et al 2014).

A. Inhibiteurs de croissance

L'utilisation de molécules chimiques pour induire l'accumulation de TAG semble donc possible. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle un arrêt de la croissance cellulaire pourrait favoriser un basculement des flux de synthèse des lipides membranaires vers les lipides de stockage, des molécules ciblant différentes voies métaboliques ont été testées dans cette étude. Ces composés ont été choisis pour leurs propriétés anti-prolifération cellulaire comme les anticancéreux : taxol, méthotrexate et analogues ou comme l'herbicide oryzaline. D'autres ont été testés pour leur impact sur le métabolisme lipidique comme différentes classes d'inhibiteurs de la synthèse des stérols ou la rapamycine qui possède une action systémique en agissant sur la voie mTOR. Parmi ces diverses molécules, certaines sont utilisées dans la pharmacopée humaine et animale et induisent des effets secondaires sur le foie (cirrhose, accumulation de cholestérol et de TAG,...). Cet organe étant le lieu privilégié de la néosynthèse des lipides de réserve chez les mammifères, il est aussi intéressant de tester ces molécules chez les plantes et les microalgues. C'est le cas du méthotrexate, un inhibiteur de la voie de biosynthèse du folate et du métabolisme C1, qui favorise une accumulation importante de TAG chez la plante modèle *A. thaliana* (**Figure 27**).

Molécule	Voie de biosynthèse ciblée	Cible	Organisme testé
Méthotrexate	Métabolisme C1	DHFR	<i>A. thaliana</i> <i>P. tricornutum</i>
Triméthoprime			
Pyriméthamine			
5-Fluorouracile	Synthèse des nucléotides	TS	
Taxol	Cytosquelette	Tubuline	<i>A. thaliana</i>
Oryzaline			
Rapamycine			
Mévastatine	Synthèse des Stérols	HMG-CoA	<i>P. tricornutum</i>
Simvastatine			<i>A. thaliana, P. tricornutum</i>
Buténafine		Squalène époxydase	<i>P. tricornutum</i>
Terbinafine			
Estrone		rétrocontrôle sur la voie de synthèse?	
Ethinylestradiol			

Figure 27 : Récapitulatif des différents traitements utilisés. mTOR : mammalian Target Of Rapamycin, DHFR : DIHYDROFOLATE REDUCTASE, TS : THYMIDYLATE SYNTHASE, TORC1 : TOR COMPLEX 1, HMG-CoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A.

1. Synthèse des folates et Métabolisme C1

a. Folates

Le terme générique "folate" désigne l'ensemble des molécules qui ont pour structure de base l'acide folique. Les folates sont impliqués dans le transport d'unités monocarbonées. Ils sont composés d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminibenzoïque (pABA), ainsi que d'une

chaîne glutamate (**Figure 30**) dont le nombre de résidus est variable (Rébeillé et al 2006). Les formes actives de ces composés au sein des cellules sont les formes réduites, à savoir le dihydrofolate (DHF) et le tétrahydrofolate (THF). L'acide folique est la forme oxydée, communément appelée vitamine B9, qui est utilisée comme complément alimentaire. Une fois absorbée par l'organisme elle est réduite en DHF et THF. La présence des résidus glutamate a une grande influence sur le devenir des folates concernant leur transport intra et extracellulaire, leur stabilité et leur utilisation. Chez *A. thaliana* par exemple, les méthionines synthases, utilisent uniquement les dérivés polyglutamylés du CH₃-THF pour synthétiser la méthionine (Ravanel et al 2004). Chez les plantes, la synthèse des folates s'effectue dans différents compartiments cellulaires (Rébeillé et al 2006). La dernière étape, concernant la synthèse de THF à partir du DHF est effectuée dans la mitochondrie par l'enzyme DHFR (DIHYDROFOLATE REDUCTASE). Les séquences nucléiques et protéiques des DHFR animales et végétales sont très conservées (Aveek et al 2014). Toutefois, chez les plantes, les microalgues et certains protozoaires, l'activité DHFR a la particularité d'être portée par des protéines bi-fonctionnelles : l'activité de la DHFR est associée à une activité Thymidylate synthase au sein d'un complexe appelé THY (Bachmann et Follmann 1987, Cella et al 1991, Lazar et al 1993). Chez *Arabidopsis*, il existe trois gènes codant pour trois isoformes du complexe DHFR-TS : THY1, THY2 et THY3 (Goreleva et al 2016, en cours de soumission). La THYMIDYLATE SYNTHASE (TS) catalyse la réaction de transformation de la base nucléique dUMP (déoxyuridine-monophosphate) en dTMP ou thymidylate (déoxythymidine-monophosphate) en présence du co-facteur CH₂-THF. La réaction libère une molécule de DHF qui est recyclée en THF par la DHFR (**Figure 29**). Ainsi, la proximité spatiale des deux enzymes permet un "channeling" qui évite au DHF de se disperser dans le milieu (Liang et Anderson 1998).

b. Métabolisme C1

Le terme de métabolisme C1 désigne l'ensemble des réactions qui nécessitent le transfert d'unités monocarbonées et dont le THF est le cofacteur central. Les réactions faisant intervenir un cofacteur folate sont plus particulièrement impliquées dans la synthèse des nucléotides et dans celle de la méthionine (Met). Le flux le plus important du métabolisme C1 est tourné vers les réactions de méthylation qui impliquent la synthèse et la régénération de la méthionine. Cet acide aminé est essentiel à la synthèse des protéines mais il est également le précurseur de l'AdoMet ou SAM (S-adénosylméthionine), la molécule qui est le donneur universel de groupements méthyles dans la quasi-totalité des réactions de méthylations se déroulant dans les cellules. Chez les plantes, il existe trois voies de biosynthèse de la méthionine : une voie de synthèse *de novo*, une voie de synthèse spécifique du règne végétal et impliquant la SMM (S-méthylméthionine) et une voie de recyclage de la S-adénosylhomocystéine (AdoHcy) qui est le produit obtenu lorsque l'AdoMet a donné son groupement méthyle (Thèse de Djeneb Camara, 2011). Le recyclage de l'AdoHcy en AdoMet nécessite la synthèse de Met et une molécule de CH₃-THF (**Figure 28**).

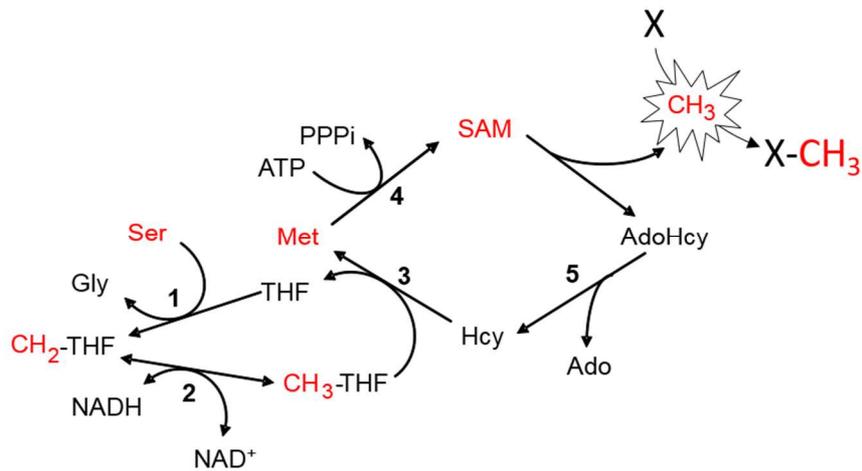


Figure 28 : Intervention de la molécule tétrahydrofolate (THF) dans le recyclage des S-Adénosylméthionine (SAM), donneurs universels de groupements méthyl. Les donneurs d'unités C1 chez les plantes sont la sérine, la glycine et le formate. Ces derniers libèrent un groupement CH_2 au profit du THF (1). Une molécule de $\text{CH}_3\text{-THF}$ est ensuite formée en utilisant le cofacteur NADH (2). Le groupement méthyle est transféré sur une molécule d'homocystéine (Hcy) pour former l'acide aminé méthionine (Met) (3). La consommation d'une molécule d'ATP permet de synthétiser une molécule de SAM qui transférera son groupement méthyle sur un substrat X (4). La molécule de S-Adénosylhomocystéine (AdoHcy) obtenue, perd son groupement adénosyl pour revenir à la forme Hcy, prête à un nouveau transfert de groupement méthyle par le $\text{CH}_3\text{-THF}$ (5).

Les méthylations sont des réactions essentielles à la survie cellulaire. Elles sont impliquées dans la synthèse de très nombreux métabolites comme la chlorophylle et la vitamine E chez les plantes pour ne citer que deux exemples. La SAM joue aussi un rôle important dans les processus de régulation (méthylation de protéines et des acides nucléiques, régulation épigénétiques, ...). En ce qui concerne le métabolisme lipidique, la phosphatidylcholine -qui est le phospholipide majeur des membranes- est dépendante pour sa synthèse des réactions de méthylations. Chez les plantes, la PC est synthétisée par ajout d'une tête polaire phosphocholine sur un squelette diacylglycérol. La phosphocholine est principalement formée par trois méthylations successives de son précurseur la phosphoéthanolamine (McNell *et al* 2001). Chez les mammifères, la PC peut également provenir de la méthylation de la phosphatidyléthanolamine (Vance *et Walkey* 1998). Ces réactions existent aussi chez les végétaux mais semblent minoritaires. De manière intéressante, chez des rats nourris avec un régime déficient en choline ou méthionine, la concentration en folate décroît (Varela-Moreiras *et al* 1995, Alonso-Apperte *et Varela-Moreiras* 1996) et le taux de TAG augmente dans le foie, ce qui illustre la relation entre le métabolisme C1 et celui des lipides (Tuma 1974, Pomfret *et al* 1990). Ces effets secondaires sont les mêmes que ceux retrouvés lors de traitements aux inhibiteurs de la DHFR.

c. Inhibiteurs de la DIHYDROFOLATE REDUCTASE (DHFR) et de la THYMIDYLATE SYNTHASE (TS)

La disponibilité de groupement méthyl est importante pour le métabolisme lipidique, puisqu'elle est nécessaire à la synthèse de phosphatidylcholine (PC). L'inhibition des réactions de méthylation peut être obtenue en bloquant la biosynthèse du THF, cofacteur central du métabolisme C1. Pour cela, l'enzyme DHFR est une cible intéressante car elle peut-être spécifiquement inhibée par des molécules qui sont des analogues structuraux du DHF. Une stratégie d'inhibition de la DHFR a été réalisée en utilisant plusieurs de ces inhibiteurs spécifiques, méthotrexate, triméthoprimine et pyriméthamine (**Figures 29 et 30**). D'après *Sathasivam 2008*, ces inhibiteurs stoppent la croissance cellulaire en phase G1 ou S du cycle cellulaire. En parallèle, parce que la DHFR est associée chez les plantes avec la TS dans une entité bi-fonctionnelle, un inhibiteur de la TS : le 5-fluorouracile, a été testé. Les activités DHFR et TS sont étroitement couplées. Quand la DHFR est inhibée, le recyclage des molécules d'AdoMet est compromis, induisant une baisse du taux général de méthylation cellulaire et un ralentissement de la synthèse des bases pyrimidiques au travers de la TS (*Pommier 2006*). Chez *Arabidopsis*, quand la quantité de folate diminue dans une cellule consécutivement à un traitement méthotrexate, les dérivés folates disponibles sont en priorité adressés à la synthèse de nucléotides au dépend des réactions de méthylations (*Loizeau et al 2008*).

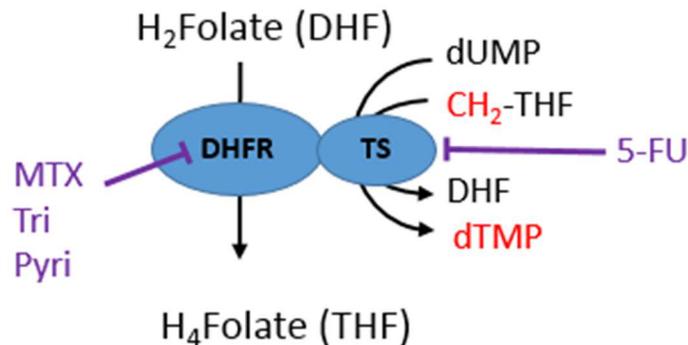


Figure 29 : Représentation de l'enzyme bi-fonctionnelle DIHYDROFOLATE REDUCTASE – THYMIDYLATE SYNTHASE (DHFR-TS) et des domaines ciblés par les molécules méthotrexate (MTX), triméthoprimine (Tri), pyriméthamine (Pyri) et 5-fluorouracile (5-FU).

i. Méthotrexate et analogues

Le méthotrexate (MTX) ou N-4(((2,4-diamino-6-pteridiny) methyl) methylamino)) benzoil a été synthétisé la première fois par Farber en 1956 (**Figure 30**). Il est utilisé dans les traitements anticancéreux mais également pour soigner la polyarthrite rhumatoïde, depuis la découverte de son activité immunosuppressive par Friedman en 1961 (*Allison 2000*). Le MTX est connu pour inhiber les DHFR d'origines eucaryote et procaryote (*Albani et al 1985*) et pour avoir une forte affinité avec l'enzyme, plus forte encore que son substrat naturel, le Dihydrofolate (DHF) (*Pommier 2006*).

Chez les mammifères, il a été montré que le MTX peut subir des réactions de polyglutamation comme les molécules folates endogènes, ce qui augmente son temps de demi-vie au sein des cellules car il n'est plus détoxifié par les aldéhydes oxydases du foie ou la DAMPA, carboxypeptidase de la flore bactérienne intestinale (Chabner et al 1985, Genestier et al 2000). Sous cette forme polyglutamylée il peut également agir sur d'autres cibles cellulaires comme l'enzyme AICAR (5-AMINO-IMIDAZOLE CARBOXAMIDE RIBONUCLEOTIDE TRANSFORMYLASE) qui utilise le THF pour synthétiser les bases purines. La THYMIDYLATE SYNTHASE (TS) a besoin du cofacteur THF produit par la DHFR pour synthétiser du thymidine monophosphate (dTMP) à partir de déoxyuridine monophosphate (dUMP). En présence de MTX, la TS est donc inhibée indirectement par le traitement mais cela n'explique que 20% de baisse de l'activité de la TS. D'autres mécanismes interviennent comme l'inhibition directe de l'enzyme par des formes MTX-glutamates (Genestier et al 2000).

Chez les humains et les rongeurs, le traitement au MTX induit des effets secondaires divers (Alarcon 2000), les plus courants étant ceux impliquant une toxicité du foie : lésions hépatiques, accumulation de TAG dans le foie, cirrhose (Freeman-Narrod 1977, Sathasivam 2008). Dans les foies des individus traités, le ratio AdoMet/AdoHCy ainsi que la quantité de folate sont fortement diminués (Svardal et al 1988, Varela-Moreiras et al 1995). L'ajout de facteurs lipotropes comme la méthionine, la choline ou la bétaine contrecarre les effets du MTX : en présence de ces composés, le taux de THF augmente dans les cellules du foie et la quantité de TAG est abaissée (Tuma 1974, Rhee et al 1989).

Comme vu précédemment, les domaines des DHFR des mammifères et des plantes sont très conservés (Samanta 2014). La toxicité du MTX sur les végétaux n'est donc pas surprenante : Lutterbeck et al 2015, ont ainsi montré que le MTX induit une inhibition de la germination et du développement post-germination et un taux élevé d'apoptose chez les plantules d'*Allium cepa* et de *Lactuca sativa*. La sensibilité au MTX du modèle de culture cellulaire de *Daucus carota* est très proche d'autres végétaux (maïs, riz, pois) mais également de celle des bactéries et des mammifères (Albani et al 1985). Au laboratoire, l'effet du MTX sur des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* a déjà été utilisé pour analyser les réponses du métabolisme C1 à un manque en folate (Jabrin et al 2003, Loizeau et al 2008, Van Wilder et al 2009, Camara et al 2012).

α. Triméthoprime et pyriméthamine

Le triméthoprime et la pyriméthamine sont aussi des inhibiteurs de la DHFR. Leurs structures ressemblent à celle du noyau ptérine qui constitue les folates (**Figure 30**) (Bushby et Hitching 1968, Assaraf 2007). Le triméthoprime diffuse passivement au travers des membranes, contrairement au MTX qui emprunte les transporteurs de folates à la surface des membranes des cellules mammifères (Thèse de Karen Loizeau, 2009). Pour cette raison, le triméthoprime est utilisé comme antibactérien, anti-protozoaire (trypanosome et leishmanie) et selon Then 2004, pourrait-être utilisé comme herbicide. Il semble inhiber plus

efficacement les DHFR d'origine procaryote qu'eucaryote (Albani et al 1985, Quinlivan et al 2000), ce qui ne l'empêche pas d'avoir des effets secondaires sur le foie des patients traités (Karpman et Kurzrock 2004). Peu d'études ont été réalisées sur les végétaux mais il semble avoir un effet toxique chez l'algue verte *Chlorella vulgaris* (Borecka et al 2016). La pyriméthamine est principalement utilisée comme traitement antipaludique et pour lutter contre la toxoplasmose (Aronson et al 2016).

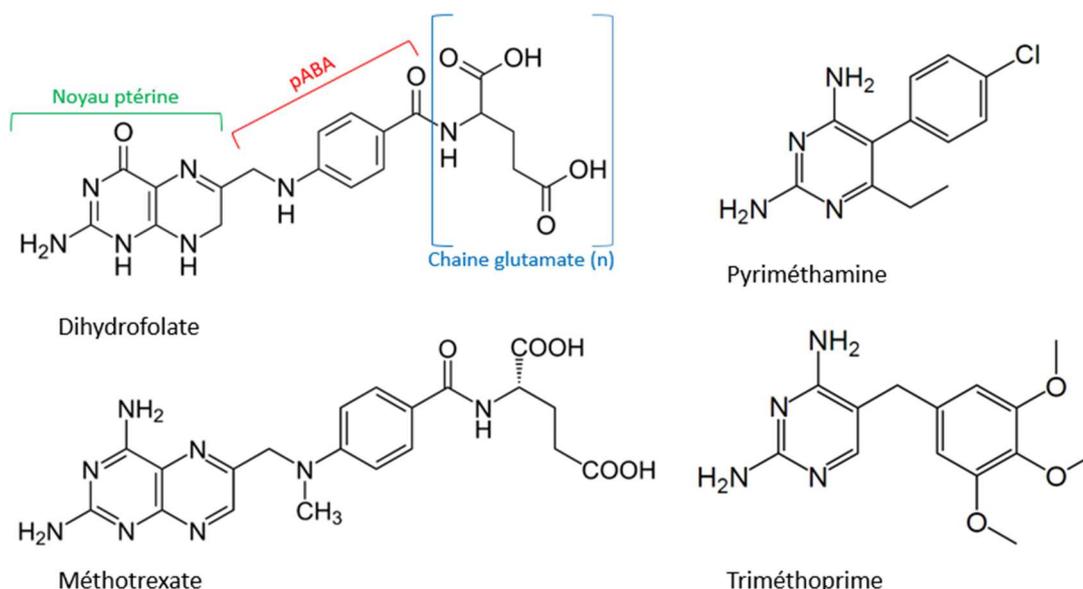


Figure 30 : Structure du dihydrofolate (DHF) et de ses antagonistes : méthotrexate, triméthoprime et pyriméthamine. pABA : acide para-aminobenzoïque

Chez mammifères, les plantes, les bactéries et les protozoaires, la présence d'antagonistes des folates induit une inhibition de l'enzyme DHFR, ce qui se traduit par un manque de méthylation dans les cellules et une diminution de la synthèse des bases nucléiques. Chez les animaux, cela a pour conséquence d'augmenter la production de lipide de réserve dans le foie, conduisant à des effets secondaires indésirables. Chez les végétaux, aucune étude n'a encore mis en évidence un éventuel lien entre inhibition du métabolisme C1 et accumulation de TAG.

β . Analogue de la pyrimidine : le 5-fluorouracile

Le 5-fluorouracile (5-FU) est utilisé pour traiter les cancers colorectaux ainsi que les tumeurs de l'appareil digestif : estomac, œsophage, pancréas (Pommier 2006). Le 5-FU cible la thymidylate synthase et conduit à un arrêt de la conversion de la déoxyuridine monophosphate (dUMP) en déoxythymidine monophosphate (dTMP). La TS est inhibée de manière non compétitive par des métabolites du 5-FU à savoir 5-fluorodéoxyuridine monophosphate (5-FdUMP). L'abolition de la formation de dTMP empêche la synthèse d'ADN et la division cellulaire au niveau de la phase S du cycle cellulaire (Aparicio et al 2002). Le traitement favorise également l'accumulation de 5-FdUTP (5-fluorodéoxyuridine

triphosphate) qui peuvent être incorporés dans l'ADN. Les uracil glycosylases ont la capacité de restaurer l'ADN mais elles peuvent également induire des dommages quand la réparation est mal effectuée, ce qui contribue à la toxicité du 5-FU (*Ingraham et al 1982, Schuetz et al 1986*). Le 5-FU peut aussi être incorporé à l'ARN sous forme 5-FUTP (5-fluorouridine triphosphate) du fait de sa proximité structurale avec l'uracile (**Figure 31**), ce qui peut interférer avec la maturation de ces molécules (*Amstrong et al 1986, Yazd Pershing 2002, Pommier 2006*). Pour ces raisons, l'action du 5-FU n'est pas uniquement confinée à la phase S (*Daher et al 1994, Pizzorno 2003*).

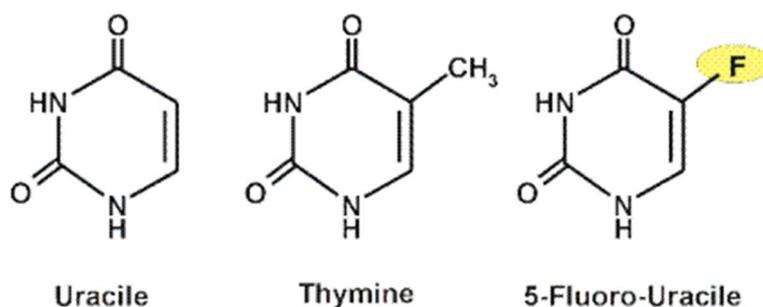


Figure 31 : Structure du 5-fluorouracile (5-FU) et des bases uracile et thymine. Adapté d'une figure du professeur J.F. Heron, Faculté de Médecine de Caen.

Chez les patients traités, le 5-FU provoque généralement des nausées, diarrhées, une perte d'appétit et une baisse du taux de globules rouges et plaquettes (*Cancer research UK organisation*). Le 5-fluorouracile est également toxique pour la levure *S. cerevisiae* et chez les plantes *Allium cepa* et *Lactuca sativa*, où il provoque des aberrations chromosomiques et une baisse de la taille moyenne des tiges (*Albani et al 1985*).

2. Autres inhibiteurs

Des inhibiteurs de croissance ciblant d'autres voies de signalisation que le métabolisme C1 ont également été sélectionnés et testés pour leur efficacité à induire l'accumulation de lipides de stockage chez le modèle de plante *A. thaliana* ainsi que sur la diatomée *P. tricornutum*. Ces molécules inhibitrices ciblent le cytosquelette, la voie mTOR et, plus proche du métabolisme des lipides, la synthèse de stérols.

a. Inhibiteurs du cytosquelette

Les inhibiteurs du cytosquelette et plus particulièrement des microtubules, sont classiquement utilisés dans les traitements anticancéreux car leur effet premier est de stopper la prolifération cellulaire. Certains comme l'oryzaline sont aussi utilisés comme herbicides. Ces molécules agissent sur la polymérisation ou dépolymérisation des faisceaux de microtubules, qui sont composés de dimères de tubuline α et β . Les microtubules jouent un rôle important dans le maintien de la forme des cellules et le trafic vésiculaire et ils sont essentiels lors de la mitose, notamment pour la séparation des chromosomes. De manière

intéressante chez les plantes, les animaux, les champignons et les protozoaires, les inhibiteurs de microtubules sont efficaces uniquement chez certains groupes taxonomiques, d'autres organismes se révélant résistants (*Dostál et Libusová, 2014*).

i. Taxol

Le taxol est le nom communément utilisé pour la molécule de paclitaxel, isolée de l'if du Pacifique (*Taxus Brevifolia*) ou de certains champignons endophytes (*Taxomyces andreanae*) et découverte en 1971 par *Wani et al.* Le taxol est utilisé pour traiter les cancers du sein, des ovaires et des bronches. Les effets secondaires chez les patients sont classiques des chimiothérapies : perte de cheveux, troubles digestifs, système immunitaire affaibli (*Cancer research UK organisation*). Contrairement aux autres inhibiteurs de microtubules, le taxol opère sur les cellules animales comme végétales (*Vaughan et Vaughn 1987*). Certains organismes sont cependant résistants, comme *S. cerevisiae*. Le taxol agit sur les microtubules en abaissant la concentration critique des sous-unités de tubulines nécessaires à leur formation et augmente le pourcentage de sous-unités tubuline assemblées (*Weaver 2014*). En présence de la molécule, les microtubules sont protégés du désassemblage et forment des structures super-stables (*Schiff et Horwitz 1981, Jordan 2002*). L'arrêt de la division cellulaire s'effectue durant la phase de mitose.

ii. Oryzaline

L'oryzaline fait partie de la famille des dinitroalanines. Elle cible plus particulièrement la sous-unité α de la tubuline (*Dempsey et al 2013*) et favorise la dépolymérisation des microtubules, au contraire du taxol. L'oryzaline est utilisée comme herbicide : chez *Arabidopsis*, cette molécule entraîne l'inhibition de la division cellulaire et réduit le dépôt de cellulose, les microtubules étant nécessaires pour permettre l'orientation correcte des microfibrilles de cellulose. Le traitement conduit à des malformations au niveau des régions méristématiques des tiges et des racines. De manière intéressante, aucune cellule en apoptose n'est cependant détectée et la taille des cellules est accrue suite au traitement (*Corson et al 2009*). Chez le modèle de plante *Heamanthus katherinae*, 0.1 μ M suffisent pour dépolymériser les microtubules et empêcher toute polymérisation *de novo* (*Morejohn et al 1987*). Cependant, l'impact de l'oryzaline diffère suivant les espèces de plantes. Ainsi le soja (*Glycine max*) est environ 110 fois plus résistant que les graines d'avoine lors de la germination (*Avena sativa*) et 10 fois plus résistant que l'ivraie *Lolium sp.*, une adventice souvent ciblée par des traitements à l'oryzaline. Les plantes monocotylédones sont de manière systématique les plus sensibles alors que les rosidées (un des deux clades des plantes dicotylédones) comme le concombre, le soja, le chou,... sont généralement les plus résistantes (*Feutz 1992*). De même, les champignons proches des animaux sont généralement résistants (*Lopes et al 2012*), au contraire des protozoaires comme *P. falcifarum* (*Dempsey 2013*), parasite contenant un plaste vestigial qui est relativement proche des plantes en terme d'évolution (*Cavalier-Smith 2010*).

b. Inhibiteur de la voie mTOR : la rapamycine

Dans les systèmes eucaryotes, la kinase TOR, est un des régulateurs les plus importants de la croissance et du développement des cellules (*Caldana et al 2013*). En effet, la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) intègre de nombreux signaux et contrôle des processus incluant la transcription et la traduction, l'autophagie, le métabolisme du carbone,... (*Wullscheleger et al 2006, Wang et Proud 2011*). La voie de signalisation mTOR passe par deux complexes protéiques distincts, TORC1 et TORC2. Chez les mammifères, TORC1 contrôle des processus relatifs à la croissance comme le métabolisme lipidique en réponse aux hormones de croissances (*Zoncu et al 2011*). Et c'est le seul des deux complexes à être sensible à la rapamycine. Les gènes du complexe TORC1 sont présents chez *Arabidopsis* (*Anderson et Hanson 2005*), pourtant selon *Menand et al 2002*, la croissance des plantes ne semble pas inhibée par le traitement. Des études plus récentes montrent au contraire que des doses plus importantes que celles utilisées chez les mammifères inhibent la croissance cellulaire (10 μ M dans une culture liquide de plantules d'*A. thaliana*, *Xiong et Sheen 2012*). Chez des mutants inductibles pour la répression de la voie TOR (*Caldana et al 2013*), des phénotypes sévères d'arrêt de la croissance sont observés, en parallèle d'une accumulation d'amidon et de lipides de stockage. Les TAG qui s'accumulent sont surtout polyinsaturés et pour les autres classes de lipides, des changements mineurs sont seulement enregistrés, montrant que la composition des membranes n'est pas affectée. Chez ces mutants d'*Arabidopsis*, la régulation de la biomasse semble passer par une redirection des flux de carbone vers l'amidon et les TAG. Chez les levures, l'inhibition de TORC1 mène à l'accumulation de glycogène (*Schmelzle et al 2004*).

Le lien entre la voie mTOR et le métabolisme de stockage des TAG se situe probablement au niveau de l'enzyme PAH1. En effet, chez les levures, l'enzyme Pah1 -qui déphosphoryle l'acide phosphatidique au profit du DAG et qui est donc impliquée dans la néosynthèse de TAG- est régulée par TORC1 de manière directe et indirecte. Quand les cellules se multiplient dans un milieu riche, Pah1 est phosphorylée sur différents sites par différentes kinases incluant TORC1, ce qui empêche son association avec les membranes du réticulum endoplasmique, limitant ainsi la synthèse de TAG (*Dubots et al 2014*). Ces kinases sont réprimées lors d'une carence en nutriments ou lors de l'entrée en phase stationnaire, favorisant l'accumulation de TAG (*Hosaka et Yamashita 1984, Adeyo et al 2011*). Pah1 est alors recrutée à la membrane et déphosphorylée par le complexe Nem1-Spo7 (*Choi et al 2011*). Cette forme non-phosphorylée et active de Pah1 est capable de synthétiser du DAG mais elle est aussi très instable et est rapidement reconnue par le protéasome (*Pascual et al 2013*). C'est par le contrôle du complexe Nem1-Spo7 que TORC1 agit indirectement sur Pah1 (*Dubots et al 2014*).

c. Inhibiteurs du métabolisme des stérols

Chez les plantes, les stérols jouent un rôle dans la viabilité cellulaire, l'embryogénèse, la division cellulaire, la biogénèse des chloroplastes et la modulation de l'activité et de la distribution de nombreuses protéines liées aux membranes, comme certains récepteurs

(Babiychuk et al 2008, Kim et al 2010). Ce sont aussi des précurseurs de molécules signaux qui régulent la croissance et le développement chez les animaux (hormones stéroïdes) ainsi que chez les végétaux (brassinostéroïdes). Les stérols appartiennent à la classe des terpénoïdes et dérivent tous de l'IPP (Isopentenyl pyrophosphate). Chez les animaux, la balance acide gras / stérol est indispensable lors de la croissance. Il existe ainsi des facteurs de transcriptions comme les SREBPs (STEROLS REGULATORY ELEMENT BINDING PROTEINS) qui régulent les gènes des enzymes responsables de la synthèse de cholestérol, acide gras, TAG et phospholipides (Osborne 1997, Bengoechea-Alonso et Ericsson 2007). Les stérols sont capables de réguler la synthèse des acides gras au travers des gènes FAS (Bennet et al 1995). Chez la souris, une perturbation de la cascade de régulation sous contrôle des SREPs induit une augmentation de cholestérol et de TAG, ce qui se traduit par une adipose du foie (Horton et al 2002).

L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des stérols au laboratoire, c'est révélée intéressante pour la production de TAG, notamment sur le modèle de microalgue *P. tricornutum*. Les molécules utilisées inhibent la voie de synthèse des stérols passant par le mévalonate et sont classées en trois familles distinctes (Figure 32). Les inhibiteurs de la HMG-CoA reductase: les statines (mévastatine et simvastatine), les inhibiteurs de la squalène époxydase : buténafine et terbinafine et les analogues structuraux des stérols : estrone et ethinylestradiol.

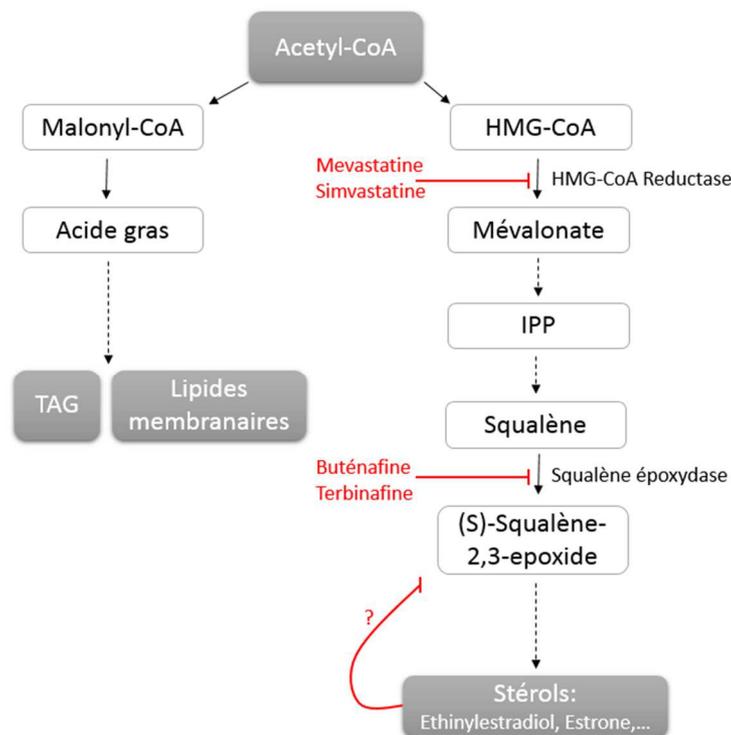


Figure 32 : Schéma simplifié des voies de synthèse des glycérolipides et des stérols depuis leur précurseur commun, les acyl-CoA et action des différentes classes d'inhibiteurs. Les inhibiteurs utilisés sont représentés en rouge. HMG-CoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A, IPP : isopentenyl pyrophosphate.

i. Inhibiteurs de la HMG-CoA : statines

La mévastatine a été la première molécule découverte de la famille, en 1976 par *Endo et Kuroda*, suivie par la lovastatine qui a été isolée d'une souche de champignon *Aspergillus terreus*. Cette dernière a été chimiquement modifiée pour former la simvastatine, qui a une action inhibitrice plus importante. Les statines ciblent l'enzyme hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A ou HMG-CoA et inhibent ainsi la production de mévalonate (**Figure 32**). Ces molécules inhibitrices sont dites hypolipémiantes et sont prescrites pour faire baisser le taux de cholestérol et de TAG dans le sang et réduire les risques cardio-vasculaires. Certains patients peuvent présenter des complications dans le foie et les muscles (hépatotoxicité), la HMG-CoA étant localisée dans le foie, qui est le site primaire de synthèse de cholestérol (*Gluba-Brzozka et al 2016*).

ii. Inhibiteurs de la squalène époxydase : buténafine et terbinafine

La buténafine et la terbinafine sont des antifongiques utilisés dans les traitements à infections cutanées. Ces inhibiteurs ciblent l'enzyme squalène époxydase (**Figure 32**). Chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, l'exposition à la terbinafine induit une accumulation de squalène et une augmentation de la mortalité cellulaire (*Kajikawa et al 2015*). Chez *Nannochloropsis oceanica*, la terbinafine induit une augmentation de la transcription du gène FAS de type I après 12 à 24h de traitement, ce qui se traduit par une augmentation du niveau d'acides gras sur une période de 7 jours suivants le traitement (*Lu et al 2014*). De manière intéressante, aucune accumulation de TAG n'est détectée. Le phénotype de ces algues présente aussi des chloroplastes déformés, sûrement liés à la diminution des galactolipides MGDG et DGDG et du PG.

iii. Analogues structuraux des stérols : estrone et éthinylestradiol

L'estrone et l'éthinylestradiol font partie des produit finaux de la synthèse des stérols. Ce sont des hormones œstrogènes : l'estrone est synthétisée par les ovaires, tandis que l'éthinylestradiol est une molécule synthétique communément utilisée dans les pilules contraceptives.

Matériel & Méthodes

I. Matériel Végétal

A. Construction de lignées d'*A. thaliana*

1. Sélection des lignées du NASC

Des lignées de plantes knock-out (KO) pour les gènes *NPC4* (AT3G03530) et *NPC5* (AT3G03540) ont été obtenues via le centre européen de stockage de graines d'*Arabidopsis* (NASC). La présence d'un ADN de transfert dans le gène d'intérêt a été vérifiée par génotypage de la première génération (F1). Pour cela, une PCR (Polymerase Chain Reaction) a été réalisée sur de l'ADN génomique en utilisant deux amorces placées dans le gène (pour vérifier si un allèle sauvage est présent) ou une amorce sur le gène et une autre sur l'ADN de transfert. Les lignées NPC4 (SALK_046713C) et NPC5 (SALK_084476C) se sont révélées hétérozygotes pour la mutation. Les graines F1 ont été replantées pour réaliser un génotypage de la deuxième génération (F2). Une vérification de l'absence de la protéine est également réalisée par western blot.

a. Extraction d'ADN génomique

Un morceau de feuille est placé dans 400 µL de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl pH 7,5 – 250 mM NaCl et 25 mM EDTA) avec 3 à 5 billes en verre. L'échantillon végétal est broyé pendant 1 minute à 30 rotations.seconde⁻¹ (MM 300, Retsch) puis centrifugé 10 minutes à 16 000 G. Le surnageant est récupéré et placé dans un volume équivalent d'isopropanol (conservé à -20°C) et laissé reposer 5 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 minutes à 16 000 G et le surnageant est éliminé. Les culots d'ADN sont lavés avec de l'éthanol 70% (conservé à -20°C) et ce dernier est éliminé après une centrifugation de 5 minutes, 16 000 G. Afin de se débarrasser de toute trace d'alcool, les culots sont mis à sécher 5 à 10 minutes à 37°C, tubes ouverts. Les culots sont ensuite repris dans 20 µL de tampon TE (10 mM tris-HCl pH 7,5 et 1 mM EDTA pH 8) ou de l'eau et stockés à -20°C.

b. PCR de génotypage

L'ADN génomique des mutants supposés ainsi que de plante sauvage Colombia (Col-0, contrôle positif) sont amplifiés grâce à la Taq Pol DNA Polymérase (Euromedex) dans un mix de 15 µL :

Eau: 10.575 µL

Tampon B, 10X : 1.5 µL

dNTPs 10 mM : 0.3 µL

Oligonucléotide Sens 10 µM : 0.75 µL

Oligonucléotide Antisens 10 µM : 0.75 µL

Enzyme : 0.125 µL

ADN : 1 µL

Matériel & Méthodes

Une PCR avec gradient de température "Touch-up" est utilisée, ce qui facilite l'amplification de l'ADN génomique. Le T_m (melting temperature) des amorces est autour de 50°C.

1- Dénaturation initiale : 10 minutes, 94°C

2- Début du touch-up, 7 cycles :

- Dénaturation, 30 secondes à 94°C
- Hybridation, 45 secondes de 47 (1^{er} cycle) à 53°C (7^{ème} cycle)
- Elongation, 1 minute à 72°C

3- Début des 25 cycles d'amplification :

- Dénaturation, 30 secondes à 94°C
- Hybridation, 45 secondes à 53°C
- Elongation, 1 minute à 72°C

4- Elongation finale : 2 minutes à 72°C

2. Complémentation

L'utilisation de deux mutants de lignées différentes pour un même gène permet de valider que le phénotype observé est bien dû à l'effet de l'absence d'expression du gène. Une autre méthode est de compléter le gène en le réintroduisant dans la plante mutée, ce qui doit restaurer le phénotype sauvage. Ayant eu des difficultés à obtenir une deuxième lignée KO homozygote pour les gènes *NPC4* et *NPC5* à partir du NASC, la stratégie de la complémentation a été choisie.

a. Clonage du gène (Technique Gateway, partie I)

Le gène est d'abord amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques à partir d'ADN complémentaire (ADNc) afin de ne cloner que sa séquence codante. Les protéines NPC4 ou NPC5 seront fusionnées dans le plasmide final avec un tag histidine (his) et la Green Fluorescent Protein (GFP) en C-terminal, l'amorce antisens choisie évite donc d'amplifier le codon stop de nos protéines d'intérêt. De plus, l'amorce sens doit comporter en 5' la séquence "CACC": cela permet à l'insert d'être reconnu par la topoisomérase présente dans le kit mais surtout de l'orienter et de faciliter son insertion au sein du vecteur d'entrée (qui comporte une extrémité complémentaire "GTGG").

Mix PCR, 25 µL final :

Eau : 14.7 µL

Tampon HF, 5X : 5 µL

dNTPs 10 mM : 0.5 µL

Oligonucléotide Sens 10 µM : 1.87 µL

Oligonucléotide Antisens 10 µM : 1.87 µL

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) : 0.25 µL

ADN : 2.5 µL

Matériel & Méthodes

Une PCR touch-up est réalisée avec une température de dénaturation de 98°C, les températures d'hybridation allant de 55°C à 65°C avec 1.5 minute d'élongation. Les séquences amplifiées de *NPC4* et *NPC5* sont purifiées sur gel d'agarose 1% et introduites dans un vecteur d'entrée utilisant le kit Gateway d'Invitrogen "pENTR Directional TOPO Cloning Kits". Dans 6 µL final, le produit PCR et le plasmide pENTR sont mélangés avec un ratio de 14:1 ng. 1 µL de tampon est également ajouté (salt solution, fournie par le kit). La réaction est laissée 20 minutes à température ambiante.

b. Transformation d'*Escherichia coli*

Après la ligation, le vecteur est directement transformé dans *Escherichia coli DH5α*. 1 µL du produit de ligation est ajouté à 50 µL de bactéries thermo-compétentes et laissé 20 minutes dans la glace. Les bactéries sont ensuite placées 30 secondes à 42°C puis rapidement remises dans la glace pour 10 minutes environs. Cette étape permet de créer des pores par choc thermique dans les membranes des bactéries et de faciliter l'internalisation du vecteur d'intérêt. Les bactéries transformées sont placées 1h à 37°C et à 134 rpm dans un Infors HT Minitron après ajout de 250 µL de milieu LB (Luria-Bertani, Roth). 100 µL de bactéries sont ensuite étalées sur boîtes LB-agar (Lennox, Roth) contenant l'antibiotique de sélection du vecteur, ici la kanamycine (50 µg.mL⁻¹, Roth) et laissées une nuit à 37°C.

c. PCR sur colonies

Les colonies bactériennes obtenues après transformation sont testées en PCR pour voir si elles possèdent le vecteur contenant le gène d'intérêt *NPC4* ou *NPC5*. Pour cela, les colonies présentes sur la boîte de pétri sont re-suspendues dans de l'eau. 2 µL de cette solution est ajoutée au mix de PCR classique (voir p 82), avec une amorce sur le vecteur (M13 Forward - 20) et une autre sur le gène. Une PCR touch-up est ensuite réalisée :

1- Dénaturation initiale : 10 minutes, 94°C

2- Début du touch-up, 6 cycles :

- Dénaturation, 30 secondes à 94°C
- Hybridation, 45 secondes de 59 (1^{er} cycle) à 64°C (6^{ème} cycle)
- Elongation, 1.5 minute à 72°C

3- Début des 25 cycles d'amplification :

- Dénaturation, 30 secondes à 94°C
- Hybridation, 45 secondes à 64°C
- Elongation, 1.5 minute à 72°C

4- Elongation finale : 2 minutes à 72°C

Les bactéries présentant le gène d'intérêt *NPC4* ou *NPC5* sont mises en culture à 37°C avec agitation sur la nuit dans 2 mL de milieu LB et en présence de kanamycine. Les plasmides sont ensuite purifiés en utilisant le kit "miniprep NucleoSpin® Plasmid" de Macherey-Nagel

et envoyés à séquencer afin de confirmer la présence de notre gène d'intérêt et de s'assurer que le gène en présence n'a pas subi d'altération durant le clonage.

d. Clonage du gène (Technique Gateway, partie II)

Le kit Invitrogen "Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix" contient les enzymes du phage λ "intégrase et excisionase" qui permettent une recombinaison homologue sur des sites spécifiques "att" prévus sur les vecteurs d'entrée et le vecteur de destination. Dans notre cas, nos vecteurs d'entrée pENTR-NPC4 ou pENTR-NPC5 et le vecteur final pEarleyGate 103 ont le même antibiotique de sélection (kanamycine). Pour cette raison, avant la recombinaison, une PCR d'amplification du gène d'intérêt ainsi que des séquences "att" du plasmide pENTR est réalisée. Les inserts sont amplifiés dans un volume final de 25 μL à l'aide de la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) comme à la page 84. Une PCR touch-up est réalisée avec une température de dénaturation de 98°C, les températures d'hybridation allant de 51°C à 61°C et 1.45 minute d'élongation. Le produit de PCR est purifié sur gel d'agarose 1%. La réaction de recombinaison est ensuite réalisée comme suit : 100 ng d'insert sont incubés avec 150 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ du plasmide de destination pEarleyGate 103 en présence de 1 μL de LR clonase (5X) dans un volume final de 5 μL . Le mélange est laissé 1h à 25°C puis 30 minutes à 37°C après ajout de 0.5 μL de Protéinase K afin de stopper la réaction. La transformation des *Escherichia coli DH5 α* compétentes est ensuite réalisée en ajoutant 2.5 μL de produit de ligation à 50 μL de bactérie (voir p 84). Les clones positifs présentant nos gènes d'intérêts ont été sélectionnés par PCR, puis amplifiés et purifiés selon le protocole page 85.

e. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

100 μL d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) sont placées dans la glace et 1 μg de plasmide pEarleyGate 103-NPC4 ou NPC5 est ajouté avant que les bactéries décongèlent. Les bactéries étant thermo-compétentes, 5 minutes à 37°C permettent au plasmide de pénétrer dans les cellules. Ces dernières sont ensuite laissées 30 minutes au repos dans la glace avant d'être incubées 2h à 28°C avec agitation, en présence de 500 μL de milieu LB. 400 μL de bactéries sont ensuite étalées sur des boîtes LB-agar contenant 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de kanamycine (sélection du plasmide de destination), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de rifampicine (sélection de la souche) et de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gentamicine (Roth) qui permet la sélection du plasmide "helper" pMP90, responsable de la virulence chez *A. tumefaciens*. Après 2 jours d'incubation à 28°C, les colonies sont sélectionnées pour la présence des gènes d'intérêt NPC4 ou NPC5 par PCR (voir p 84). Les clones positifs sont ensuite mis en culture à 28°C avec agitation sur la nuit dans 2 mL de milieu LB et en présence de kanamycine, rifampicine et gentamicine. Un stock glycérol de cette culture est conservé à - 80°C (1 mL de la culture ajoutée à 1 mL de glycérol 50%). Les plantes mutantes pour NPC4 et NPC5 seront transformées avec cette construction afin de compléter leur phénotype.



Figure 33 : Schéma simplifié du plasmide final pEarleyGate 103-NPC4 ou NPC5. KanaR : résistance à la kanamycine (sélection des bactéries), BastaR : résistance à l'herbicide basta (sélection des plantes), 35S : promoteur fort chez les plantes (du virus du chou-fleur), GFP : green fluorescent protein, His : étiquette histidine.

3. Lignées de surexpressseurs (OE)

Dans la construction pEarleyGate 103-NPC4/5, les gènes d'intérêts sont sous contrôle du promoteur fort du virus de la mosaïque du chou-fleur 35S. Ces constructions ont donc été utilisées pour transformer des souches d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (Col-0) afin d'obtenir des mutants surexprimant ces protéines.

4. Lignées knock-out (KO) simple et double mutant (Technique CrispR/Cas9)

Les gènes *NPC4* et *NPC5* sont présents sur le 3^{ème} chromosome d'*A. thaliana* et distants de 1307 bp. Dans ces conditions, l'obtention de double mutant par croisement est très difficile, raison pour laquelle la technique CrispR/Cas9 a été utilisée. De plus, afin de créer des doubles mutants, il est nécessaire avec cette méthode de passer par des constructions simple mutant, ce qui permet d'avoir une autre lignée simple mutante en parallèle de celle du NASC.

a. Technique

CrispR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas9 est un système de défense utilisé par certaines bactéries comme *Streptococcus pyogenes*, pour se protéger d'invasions phagiques. L'ADN étranger est détecté par l'endonucléase Caspase 9 et comparé à des séquences guides ARN de type "CrispR": si le double brin formé est complémentaire, Cas9 clive l'ADN invasif. Ce système est proche de celui des ARN interférents chez les organismes eucaryotes.

Ce mécanisme peut être utilisé pour cibler spécifiquement les gènes d'intérêt à muter. En introduisant des constructions porteuses de la séquence Cas9 et des guides spécifiques pour les gènes d'intérêts il est possible de créer des KO de un ou plusieurs gènes (**Figure 34**). Les constructions suivantes s'appuient sur le protocole de *Feng et al 2013* et nous avons utilisés les vecteurs optimisés pour le modèle *A. thaliana* par *Chang et al 2016*.

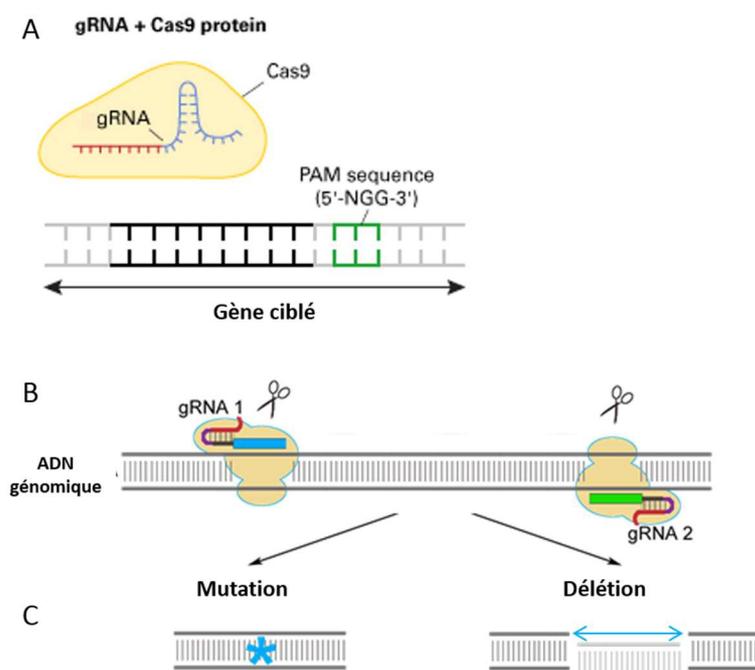


Figure 34 : Principe du système CrispR/Cas9. A) Un guide ARN spécifique du gène à cibler permet à la Cas9 de se positionner sur l'ADN génomique de la plante. Le design des guides doit prendre en compte la proximité d'une région PAM, nécessaire à la liaison de Cas9. B) Pour chaque gène à muter, deux guides sont produits afin de supprimer une partie du gène et donc de le rendre non fonctionnel (Schéma C, délétion). Si une des deux réactions ne marche pas, il peut également avoir une mutation qui conduit à l'extinction du gène si la coupure de l'endonucléase est mal réparée (Schéma C, mutation). Cas9 : CASPASE 9, gRNA : ARN guide, PAM sequence : protospacer adjacent motif. Schéma adapté de <https://www.addgene.org/CRISPR/guide/>.

b. Design des guides

Les guides sont composés d'une partie appelée "gRNA scaffold" qui est une partie commune et identique pour tous les clonages de types CrispR/Cas9. Le gRNA scaffold est déjà présent dans le vecteur d'entrée. La deuxième partie est appelée "gRNA spacer", c'est une séquence d'environ 20 nucléotides qui doit être construite spécifiquement en fonction de la région à cibler. Le spacer contient également dans sa séquence une région PAM, indispensable au positionnement de la Cas9.

Le design de la partie spacer des guides s'effectue sur des sites spécialisés comme <https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/> qui permettent d'afficher pour le gène d'intérêt les positions de guide ARN (gRNA) potentiel. Le choix des spacers (deux pour chaque gène) doit tenir compte de la quantité de base GC (entre 40 et 80%), être à proximité d'une séquence PAM et présenter zéro "off-target" pour éviter de cibler d'autres gènes que celui d'intérêt. Une fois les gRNA spacers sélectionnés, des séquences spécifiques sont ajoutées aux extrémités afin de permettre une ligation dans le vecteur d'entrée du système CrispR/Cas9. Les spacers sont ensuite synthétisés en temps qu'oligonucléotides (sens et antisens).

c. Clonage dans le vecteur d'entrée

Chaque couple de gRNA spacer (oligonucléotides sens et antisens) subit une réaction d'hybridation : oligonucléotides sens et antisens : 5 μ L à 100 μ M, 5 μ L de tampon d'hybridation 10X (100 mM de tris pH=7.5 et 1.5 M de NaCl) et 35 μ L d'eau. La réaction se produit à 95°C pendant 4 minutes puis est laissée refroidir sur la nuit.

Les spacers sont ensuite ligués dans le vecteur d'entrée pAtU6-26:gRNA, qui contient la partie gRNA scaffold fusionnée au promoteur RNAPol AtU6-26 (**Figure 35**). Le plasmide est digéré utilisant les sites de restriction BbsI (New England Biolabs) : 2 μ g de vecteur, 2 μ L de tampon NEB2, 1,1 μ L de BbsI et 20 μ L d'eau incubé 1.5h à 37°C. La digestion est ensuite vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et le plasmide digéré est purifié via le kit miniprep NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel. Comme les spacers hybridés comportent déjà dans leurs séquences le site de coupure BbsI, leur insertion dans pAtU6-26:gRNA peut se faire directement. La ligation se déroule 2h à température ambiante, dans un volume complété avec de l'eau à 10 μ L : 150 ng de plasmide digéré, 0.5 μ L de spacers hybridés, 1 μ L de T4 ligase et 1 μ L de tampon pour T4 ligase (NEB). Le produit de digestion est ensuite transformé par choc thermique dans *E. coli* DH5 α et étalé sur boîtes avec l'anticorps de sélection carbenicilline (Roth), comme vu page 85. Afin de sélectionner les bactéries contenant le plasmide pAtU6-26:gRNA avec notre insert, trois colonies sont mises en culture sur la nuit et le plasmide extrait comme précédemment (p 85). Les plasmides ont été digérés avec l'enzyme BbsI : ceux n'ayant pas intégré les gRNA spacers sont digérés, tandis que pour ceux contenant les spacers, le site de restriction n'existe plus ; le vecteur n'est pas coupé par l'enzyme.

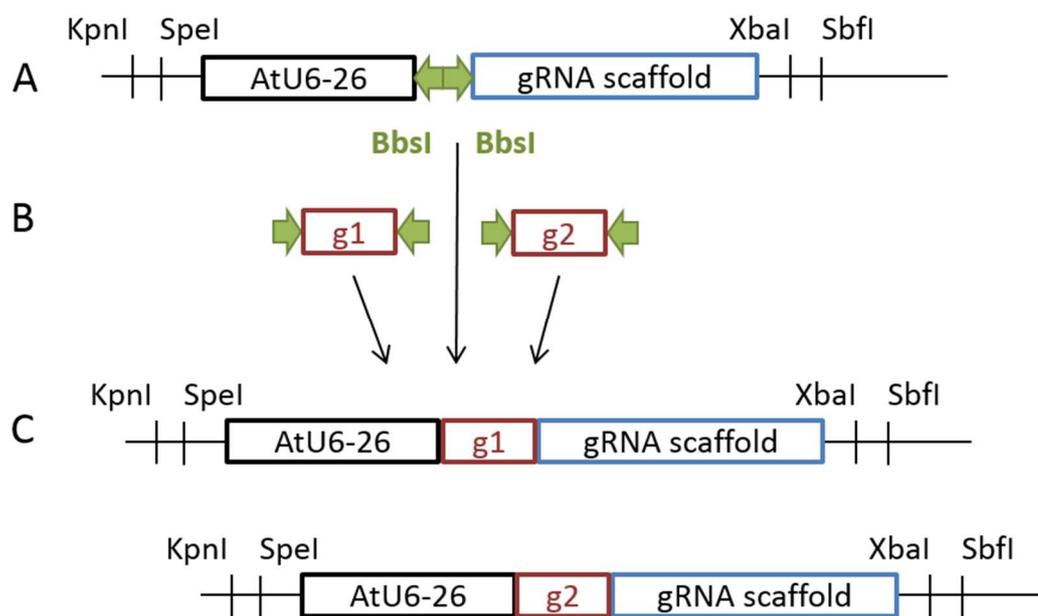


Figure 35: Ligation des gRNA spacers (g1 et g2) dans le vecteur d'entrée pAtU6-26:gRNA. A) Digestion du vecteur par BbsI. B) Hybridation des oligonucléotides pour le guide 1 et le guide 2 (pour un gène : 2 guides). C) Ligation des guides dans le vecteur.

Matériel & Méthodes

Cette réaction permet d'obtenir deux constructions pour chaque gène ciblé contenant respectivement le guide 1 et 2. Comme nous ciblons deux gènes : *NPC4* et *NPC5*, nous obtenons 4 plasmides. L'étape suivante est la réunion des guides 1 et 2 au sein du même vecteur. Pour cela, le vecteur contenant le guide 1 doit être digéré 1.5h à 37°C avec les enzymes de restrictions SpeI et KpnI-HF (NEB) et le plasmide contenant le guide 2 avec XbaI et KpnI-HF.

Digestion 1 :

2 µL Smart Buffer (NEB)
2 µg de plasmide pAtU6-26:spacer-1-gRNA
1 µL KpnI-HF
1 µL SpeI
1 µL rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, NEB)
Complété à 20 µL d'eau

Digestion 2 :

2 µL Smart Buffer
2 µg de plasmide pAtU6-26:spacer-2-gRNA
1 µL KpnI-HF
1 µL XbaI
Complété à 20 µL d'eau

Les produits de digestion : à savoir le plasmide pAtU6-26:g1-gRNA ouvert (digestion 1) et l'insert AtU6-26-g2-gRNA (digestion 2) sont purifiés sur gel d'agarose 1% et sur mini colonne. Puis une ligation est effectuée avec 150 ng de plasmide (contenant le guide 1), un ratio de 1:3 pour l'insert (guide 2), 1 µL de T4 ligase, 1 µL de tampon T4 ligase et complété avec de l'eau à 10 µL. La ligation est permise car les sites XbaI et SpeI partagent des extrémités compatibles. Après 2h à température ambiante, le produit de ligation est transformé dans des *E. coli* compétentes comme vu précédemment.

Les colonies obtenues sont vérifiées par PCR en utilisant les oligonucléotides standards M13 sens et antisens, la taille des amplicons attendue est de 800 bp par cassette gRNA. Les plasmides peuvent aussi être purifiés et digérés avec SacI qui permet de retirer les guides du plasmide (700 bp attendues).



Figure 36 : Construction pAtU6-26:spacer1-gRNA-spacer2-gRNA. Les deux guides g1 et g2 sont présents dans la même construction.

Cette étape peut être déclinée plusieurs fois afin de combiner le nombre voulu de guides dans un même vecteur. Ainsi, pour les deux gènes *NPC4* et *NPC5* on peut construire un plasmide contenant les 4 guides. Une fois le plasmide construit, la vérification se fait par digestion par SacI et PvuI-HF sinon il est difficile de faire la différence entre le vecteur (2 900 bp) et l'insert (2 500 bp).

d. Clonage dans le vecteur de destination

La cassette contenant les guides (pAtU6-26:spacer1-gRNA) ainsi que la cassette Cas9 (pBSK:pUBQ10:CoCas9) sont clonées ensemble dans pCAMBIA2300, le vecteur final, en une étape de clonage. Les digestions sont réalisées à 37°C pendant 1.5 h :

Digestion de pAtU6-26:gRNA(s) :

2 µg de plasmide

2 µL de Tampon CutSmart

1 µL de KpnI-HF

1 µL de SbfI (+ 1 µL de PvuI-HF dans le cas de 4 guides ou plus)

Volume final à 20 µL complété avec de l'eau

Digestion de pBSK:pUBQ10:CoCas9 :

2 µg de plasmide

2 µL de Tampon CutSmart

1 µL de EcoRI-HF

1 µL de SbfI

Volume final à 20 µL complété avec de l'eau

Digestion de pCAMPBIA2300 :

2 µg de plasmide

2 µL de Tampon CutSmart

1 µL de KpnI-HF

1 µL de EcoRI-HF

1 µL de rSAP

Volume final à 20 µL complété avec de l'eau

Les produits de digestion, à savoir les guides (700 bp par cassette), la Cas9 (5.5 Kb) et le vecteur final pCAMBIA sont purifiés sur gel d'agarose 1% et sur mini colonne. Une ligation est ensuite effectuée avec 150 ng de pCAMBIA2300 digéré, un ratio de 1:3 pour les guides et la Cas9, 1 µL de T4 ligase, 1 µL de tampon T4 ligase et complété avec de l'eau à 15 µL. Après 2h à température ambiante, le produit de ligation est transformé dans des bactéries *E. coli* compétentes comme vu précédemment. Le plasmide pCAMBIA2300 est sélectionné par la résistance à la kanamycine. Afin de sélectionner des clones, des pré-cultures sont réalisées et les plasmides extraits et digérés avec Sall et EcoRI qui coupent à la fois la cassette des guides et celle de la Cas9. Les plasmides sont ensuite prêts pour être transformés dans *Agrobacterium tumefaciens*.

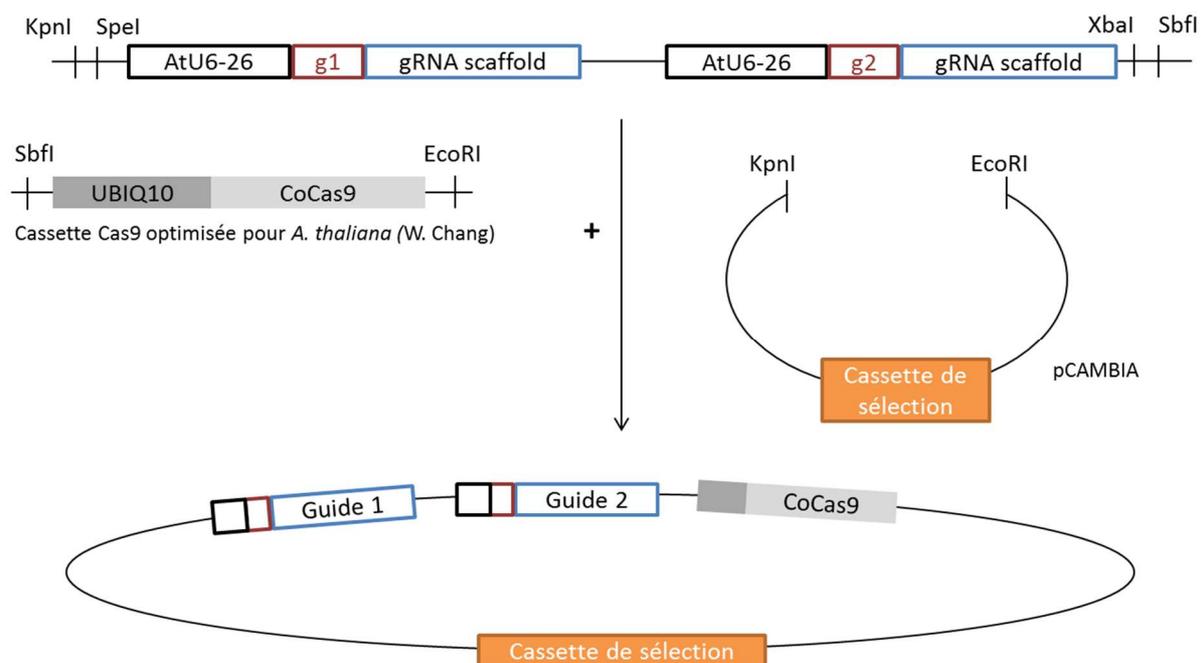


Figure 37 : Clonage des guides (pour un gène) et de la Cas9 dans le vecteur final pCAMBIA.

La cassette de sélection comporte une sélection kanamycine pour les bactéries et une sélection Hygromycine B pour les plantes. CoCas9 : CASPASE 9, UBQ10 : UBIQUITINE 10, g1 et g2 : guides 1 et 2.

5. Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*A. thaliana* sont plantées suivant le protocole page 95, environs 3 semaines avant la transformation. Une cinquantaine de graines sont plantées par pot. Il est important de laisser les semis 2 à 3 jours à 5°C et à l'obscurité, afin de lever la dormance des graines et que celles-ci aient une croissance et une floraison synchronisées. L'état de stress des plantes est également à surveiller (bien arroser, ...) car cela influe sur le taux de transformants. Lors de la transformation, les plantes doivent présenter des bourgeons de fleur encore fermés, afin qu'*A. tumefaciens* infecte les méristèmes des organes reproducteurs de la plante. On obtiendra ainsi des gamètes et *a fortiori* des graines qui auront intégré la construction d'intérêt dans leur génome.

Une pré-culture d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction d'intérêt est incubée à 28°C pendant 24h dans 10 mL de milieu LB, 20 µg.mL⁻¹ de gentamicine, 50 µg.mL⁻¹ de rifampicine ainsi que l'antibiotique de sélection pour notre vecteur. Une fois cette pré-culture saturée, 150 µL sont placés dans un volume de 200 mL de LB (contenant encore une fois les 3 antibiotiques). Après 24h, la densité optique (DO) est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf) jusqu'à atteindre 0.8. Les bactéries sont ensuite centrifugées à température ambiante 15 minutes à 7 000 rpm. Le surnageant est retiré et les culots re-suspendus dans 200 mL d'une solution de glucose 5%. Si la DO dépasse 0.8, il est possible d'ajuster le volume de cette solution pour retrouver la bonne concentration. Les bourgeons floraux des plantes sont trempés environs 20 secondes dans

cette solution de bactérie à laquelle a été rajouté au préalable 0.05% de Silwett L-77 (Lehle Seeds). Ce détergent permet de faire mousser la solution et de créer un "biofilm" propice à l'infection d'*A. thaliana* par *A. tumefaciens*. Les plantes sont ensuite entourées de film plastique et laissées 12h sous éclairage faible (sensibilité à la lumière). Cela permet de maintenir une humidité élevée ce qui favorise également la pénétration des bactéries dans les plantes. Pour améliorer l'acclimatation des plantes après transformation, elles sont placées 24h dans un phytotron toujours entourées de film plastique puis ce dernier est retiré un jour plus tard.

Chaque construction est transformée au moins deux fois selon le protocole de *Clough et Ben 1998*. Les plantes issues de transformations différentes seront analysées en parallèle ce qui permettra d'avoir différents réplicas biologiques et de s'affranchir d'éventuels phénotypes indésirables (dû à une insertion particulière dans le génome par exemple).

a. Sélection des transformants

i. *Constructions Gateway*

Après transformation, les plantes sont laissées en culture jusqu'au développement des siliques. Après séchage, les graines sont récoltées et plantées en terre. Les semis sont placés 2 à 3 jours à 5°C et à l'obscurité pour synchroniser la croissance (stratification). Quand les plantules apparaissent et forment une petite rosette, du Basta (Bayer) 1/1000^{ème} est vaporisé : seules les plantes transformées vont être porteuses de la résistance à cet herbicide et survivre au traitement. Il est possible de faire plusieurs pulvérisations à 2 jours d'intervalle. Afin de vérifier la présence des protéines NPC4 et NPC5 (dans le cas d'une complémentation) ou de la surexpression de ces deux protéines (dans le cas d'une construction de surexprimeurs), des extraits totaux de protéines sont réalisés et testés en Western Blot. Les graines des plantes positives sont récoltées et semées dans un milieu stérile. Les plantules obtenues serviront de précurseurs aux modèles cellulaires.

ii. *Constructions CrispR/Cas9*

Après transformation, les plantes sont laissées en culture jusqu'au développement des siliques. Après séchage, les graines sont récoltées et stérilisées (voir p 94). Les graines sont ensuite reprises dans une solution d'agarose 0.1% stérile pour être déposées sur boîte agar-Hygromycine B. En effet, les constructions sont porteuses de la résistance à l'Hygromycine B, antibiotique qui inhibe la croissance des hypocotyles quand les plantes sont cultivées en absence de lumière. Seules les plantules résistantes seront capables de skotomorphogénèse : elles poussent verticalement tandis que les plantes ne portant pas le vecteur transformé avec la résistance poussent "allongées" dans le milieu. Comme la présence de sucre peut également inhiber la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité, les plantes sont cultivées sur milieu minimum : 0.22% de milieu MS sans vitamine (MS Basalt Salt, Sigma), 0.8% d'agar Kalys HP 696 (Kalys Biotechnologie) et le pH est ajusté à 5.7 avec une solution de KOH. Après stérilisation, l'Hygromycine B est rajoutée à une concentration de 10 à 12.5 µg.mL⁻¹ (Sigma).

Les graines plantées sont ensuite laissées 3 jours à 4°C et à l'obscurité (stratification) puis la croissance s'effectue 5 jours en chambre de culture (humidité 55%, 20°C) mais à l'abri de la lumière. Après 1 jour d'acclimatation à la lumière passé sur la paillasse, les plantes sont ensuite placées en chambre de culture (jour/nuit : 22h/6h, humidité : 55%, 20°C, intensité lumineuse : 90 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) jusqu'à que les plantules soit assez résistantes pour un transfert en terre.

Afin de confirmer que cette première génération de plantes transformées (F1) présente bien une délétion ou une mutation pour notre gène d'intérêt, l'ADN génomique de ces plantes est extrait (voir p 82) et une PCR de génotypage effectuée (voir p 82), avec des oligonucléotides qui viennent s'hybrider de part et d'autre des guides 1 et 2. Si la Cas9 a coupé après les deux guides, un morceau du gène aura été enlevé et la taille de l'amplicon sera plus petite que pour une plante sauvage. Si la plante est hétérozygote, deux bandes sont visibles (une pour l'allèle muté et l'autre pour l'allèle sauvage). Dans le cas d'une plante hétérozygote, il faudra génotyper la génération F2 pour trouver une plante homozygote. Un autre cas de figure est que la Cas9 peut ne couper qu'après un seul des deux guides (**Figure 34**). A ce moment-là, le résultat de la PCR de génotypage peut s'avérer négatif, bien que la coupure puisse être suffisante pour créer une protéine non fonctionnelle. Pour vérifier si une mutation, même sur un seul allèle a eu lieu : une PCR d'amplification autour de chaque guide est réalisée avec un cycle supplémentaire de dénaturation et d'hybridation. Cela permet dans un premier temps, de séparer les amplicons des oligonucléotides, puis de ré-hybrider les ADN en duplexe. Ces duplexes sont alors mis à migrer dans un gel de polyacrylamide 12% natif, tampon TBE (90 mM tris et acide borique et 2 mM EDTA). Les hétéroduplexes (appariement d'ADN sauvage avec un ADN muté) migrent plus lentement que les homoduplexes (appariement de deux ADN sauvages ou de deux ADN mutés) car ils ont une structure plus encombrée. Ce système de PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis Based) permet de déterminer si une plante à une mutation ponctuelle et si elle est homozygote ou hétérozygote pour la mutation (*Zhu et al 2014*).

Le génome des plantes homozygotes pour la mutation, est vérifié une dernière fois par séquençage.

6. Résumé des constructions

Simple mutants			Double mutants		
Techniques:	KO		Techniques:	KO	
NASC	NPC4 (SALK_046713C)	NPC5 (SALK_084476C)	CrispR	NPC4/5 (4 guides)	NPC4/5 par croisement des simples KO
CrispR	NPC4	NPC5	NASC	NPC4/5 par croisement des lignées simple KO	
	OE			OE	
Gateway	NPC4	NPC5	Gateway	NPC4/5 par croisement des lignées simple OE	
	Complémentation				
Gateway	NPC4	NPC5			

	Lignées validées
	Plantes transformées et en cours de validation
	Lignées à faire

Figure 38 : Résumé des lignées construites

B. Culture des plantes

1. En terre

Une trentaine de graines sont d'abord placées 2h (ou sur la nuit) à - 80°C, afin de tuer d'éventuels pathogènes. Elles sont ensuite semées à la surface d'un pot contenant un mélange de terreau/vermiculite 5/1 et arrosées avec de l'engrais à 2 g.L⁻¹ (Plant-Prod, hydrosoluble). La levée de dormance et la stratification s'effectuent à 4°C et à l'obscurité pendant 2 à 3 jours. Les graines sont ensuite placées dans une chambre de culture (jour/nuit : 22h/6h, intensité lumineuse : 90 µE.m⁻².s⁻¹, humidité : 55%, 20°C), avec un capot qui, faisant office de mini serre, permet de créer un environnement propice à la germination. Environ 2 semaines plus tard, les plantules sont assez grandes et résistantes pour être transférées dans des pots individuels. Les plantes sont arrosées environ 2 fois par semaine dont une fois avec de l'engrais. Une fois les siliques formées, les plantes sont ensachées et placées dans une chambre de séchage pour 3 semaines au minimum avant récolte des graines.

2. *In vitro*

Après séchage, les graines sont récoltées et stérilisées d'abord par 2h à - 80°C puis par le protocole suivant : les graines sont placées dans 1 mL d'éthanol 70% stérile et agitées pendant deux minutes. L'éthanol est ensuite éliminé et 1 mL de solution de stérilisation est ajoutée (Tween 20, 4% et Javel 4%, réalisée *de novo*). Les graines sont incubées 15 minutes sous agitation dans cette solution puis lavée quatre fois dans de l'eau stérile. Les graines sont ensuite reprises dans une solution d'agarose 0.1% stérile pour être déposées sur boîte agar.

Le milieu agar pour la culture de plante *in vitro* se compose de 4.41 g.L⁻¹ de milieu MS (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA), 10 g.L⁻¹ de saccharose, 0.5 g.L⁻¹ de MES (Sigma) et 8 g.L⁻¹ d'agar (Kalys HP 696). Le pH est ajusté à 5.7 avec une solution de KOH.

La levée de dormance et la stratification s'effectuent à 4°C et à l'obscurité pendant 2 à 3 jours. Les graines sont ensuite placées dans une enceinte de culture (jour/nuit : 22h/6h, intensité lumineuse : 90 µE.m⁻².s⁻¹, humidité : 55%, 20°C).

C. Cultures cellulaires de la plante *A. thaliana* et de la diatomée *P. tricornutum*

1. Culture d'*Arabidopsis thaliana*

a. Culture cellulaire

La souche utilisée en laboratoire est dérivée du méristème foliaire (Axelos *et al* 1992). Bien que possédant des chloroplastes et effectuant la photosynthèse, ces cellules sont hétérotrophes. Pour cette raison, elles sont cultivées dans un milieu complet contenant une

Matériel & Méthodes

source de carbone (*Gamborg et al 1968*). Le milieu inclut 4.41 g.L⁻¹ de MS (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA), 15 g.L⁻¹ de saccharose, 10 mL.L⁻¹ de solution 2.4-D à 0.12 g.L⁻¹ (Acide 2.4 Dichlorophenoxyacétique, phytohormone, TCI) et 10 mL.L⁻¹ de solution 3Pi (50 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ et 3.9 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, qui complète en phosphate). Le pH est ajusté à 5.7 avec une solution de KOH.

Les cellules sont cultivées à 22°C dans des ballons Kjeldahl contenant 200 mL de milieu de culture et maintenues sous agitation rotatoire permanente à 125 rpm et sous lumière constante (100 µE.m⁻².s⁻¹).

Le repiquage des cellules s'effectue une fois par semaine en plaçant 10-15 mL de cellules dans 200 mL de milieu neuf. La population croît avec une vitesse maximale d'environ un doublement cellulaire toutes les 24h.

b. Culture de cals

La génération de cultures cellulaires de cals s'effectue à partir des lignées de plantes KO et OE validées comme étant homozygotes. Pour cela, les plantes sont d'abord cultivées *in vitro* (voir p 94), afin de se placer dans des conditions stériles. Une fois les plantules développées, un bout de feuille est découpé à l'aide d'un scalpel stérile et déposé sur boîte agar contenant : 4.41 g.L⁻¹ de MS de milieu MS (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA), 30 g.L⁻¹ de saccharose, 8 g.L⁻¹ d'agar (Kalys HP 696) et 10 mL.L⁻¹ de solution d'hormone 2.4-D à 0.12 g.L⁻¹, qui permet la dédifférenciation des cellules foliaires. Le pH est ajusté à 5.7 avec une solution de KOH. Après 1 mois de culture à 22°C et en présence de lumière continue, les feuilles se sont dédifférenciées en cal. Il est conseillé de génotyper les cals obtenus, afin de s'assurer encore une fois que les plantes sélectionnées étaient bien homozygotes (voir p 95). Alternativement, les protéines totales peuvent être extraites et la présence (ou l'absence) de la protéine d'intérêt vérifiée par western blot. Les cals sont ensuite repiqués une fois par mois sur un nouveau milieu solide. Pour travailler sur une suspension cellulaire, 3 à 4 boîtes de cals provenant de la même plante sont placés dans 200 mL de milieu de culture cellulaire liquide (voir p 95). Pendant un mois, le milieu est changé toutes les semaines, sans diluer les cellules. Puis, la concentration cellulaire devient suffisante pour pouvoir repiquer 5 mL de cellules sédimentées dans 200 mL de nouveau milieu (*Barkla et al 2014*).

i. Extraction d'ADNg de cals

Les cals étant plus résistant que des cellules de feuilles, un protocole spécifique doit être utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique. Une petite quantité de cals est broyé dans 200 µL de tampon CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, tris HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 20 mM pH 8, β-mercaptoéthanol 0.2%) en présence de sable de fontainebleau (SiO₂, sds) avec l'aide d'un pilon. 800 µL de tampon CTAB est rajouté immédiatement après broyage, puis le mélange est mélangé et laissé à 60°C pendant 30 minutes. Après 10 minutes de centrifugation à 11 000 rpm, 50 µL du surnageant est récupéré et placé dans 500 µL d'un mélange de chloroforme/isoamylalcool 24/1, mélangé puis centrifugé 10 minutes à 11 000 rpm. 400 µL du surnageant est ajouté à 400 µL d'isopropanol froid et les tubes sont laissés au minimum 1h

à - 20°C (ou sur la nuit). Après cette étape, l'ADN précipité est centrifugé 15 minutes à 4°C, le surnageant supprimé et les culots lavés avec de l'éthanol 70% froid. Une deuxième centrifugation à froid, 5 minutes à 11 000 rpm permet de visualiser les culots : l'éthanol est retiré et les tubes séchés à 37°C pendant 10 minutes. L'ADNg est ensuite repris dans 50 µL d'eau ou de tampon TE et stocké à - 20°C.

La PCR de géotypage s'effectue comme vu précédemment page 83.

c. Suivi de la croissance cellulaire

Le poids frais permet de suivre la croissance des cultures cellulaires. 5 mL de cellules sont récoltées et le milieu de culture est éliminé sur une pompe à vide. Les cellules sont ensuite pesées. La courbe de croissance des cellules est réalisée en effectuant un poids frais tous les jours.

2. Culture de *Phaeodactylum tricornutum*

a. Préparation du milieu de culture ESAW

Le milieu de culture ESAW (Enrichment Solution with Artificial Water) présenté **Figure 39**, est utilisé pour la culture de la diatomée *P. tricornutum*.

Salt Solution 1 (10X)	Concentration du stock (g/L)	Volume pour 1L de milieu	Concentration finale dans le milieu (M)
NaCl	211.94	100 mL	3.63×10^{-1}
Na ₂ SO ₄	35.50		2.50×10^{-2}
KCl	5.99		8.03×10^{-3}
NaHCO ₃	1.74		2.07×10^{-3}
KBr	0.863		7.25×10^{-4}
H ₃ BO ₃	0.230		3.72×10^{-4}
NaF	0.28		6.67×10^{-5}
Salt Solution 2 (10X)			
MgCl ₂ 6H ₂ O	95.92	100 mL	4.71×10^{-2}
CaCl ₂ 2H ₂ O	13.44		9.14×10^{-3}
SrCl ₂ 6H ₂ O	0.218		8.18×10^{-5}
Azote (N) et Phosphate (P) solutions stock			
NaNO ₃	46.67	1 mL	5.49×10^{-4}
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3.094	1 mL	2.24×10^{-5}
Fer solution stock			
Fe-EDTA	3	1 mL	8.18×10^{-6}
Vitamines			
Thiamine · HCl (vit. B ₁)	100	1 mL	2.96×10^{-7}
Biotine (vit. H)	1		4.09×10^{-9}
Cyanocobalamine (vit. B ₁₂)	2		1.48×10^{-9}

Trace Metals solution stock	Concentration du stock (g/100mL)	Volume pour 1L de milieu	Concentration finale dans le milieu (M)
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3.09	1 mL	8.30×10^{-6}
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.73		2.54×10^{-7}
CaSO ₄ .7H ₂ O	0.016		5.69×10^{-8}
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.54		2.42×10^{-6}
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.148		6.12×10^{-10}
Na ₂ SeO ₃	0.017		1.00×10^{-10}
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.149		6.27×10^{-10}
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.98		3.92×10^{-9}

ESAW 1P1N : 100 mL salt 1
 100 mL salt 2
 1 mL de NaNO₃
 1 mL de NaH₂PO₄
 1 mL de Fer-EDTA
 1 mL de Trace metals
 1 mL de vitamines
 795 mL d'eau ultra pure stérile

Figure 39 : Milieu de culture ESAW pour *Phaeodactylum tricornutum*.

Matériel & Méthodes

Les composés (Sigma) des solutions salées stock ("salt solutions") 1 et 2 sont pesés et autoclavés dans 1 L d'eau ultra pure. Excepté pour le NaHCO_3 qui est autoclavé sous forme de poudre puis rajouté à la solution salt 1 en condition stérile. Les solutions d'azote et de phosphate, de fer, de "trace métal" et les vitamines sont préparées dans 1 L d'eau et filtrées à $0.20 \mu\text{m}$ (Sartorius stedim biotech). La **Figure 39** présente la composition du milieu ESAW final pour 1 L. Les microalgues sont maintenues dans un milieu ESAW 10P10N (ou appelé ESAW 10X) par ajout de 10 mL des solutions stocks phosphate (P) et azote (N). Le protocole du milieu de culture a été adapté au laboratoire à partir de *Harrison et al 1980*, *Falciatore et al 2000* et *Berges et al 2001*.

b. Conditions de culture

Pour compléter les résultats obtenus chez les végétaux supérieurs concernant la production de TAG durant les expériences d'incubation avec des composés chimiques, des tests ont également été réalisés chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* : Pt1 (souche 8.6 CCMP2561). En routine, cette souche de microalgue est maintenue dans des incubateurs (Infors HT Minitron Pro) à 20°C , 110 rpm, $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{ms}^{-1}$ et dans un cycle jour/nuit 12h/12h. Elles sont repiquées en conditions stériles, 2 fois par semaine dans 50 mL de milieu ESAW 10P10N à une concentration de $1\cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} .

c. Suivi de la croissance cellulaire

Le suivi de la multiplication des algues en culture est effectué par comptage du nombre de cellules à l'aide d'un compteur de cellules LunaTM (logos biosystem) qui donne également une valeur moyenne de la taille des cellules (μm).

3. Mesure de la chlorophylle et de la production de TAG

En parallèle du suivi de la croissance des cultures d'*A. thaliana* et de *P. tricornutum*, d'autres paramètres comme l'évolution de la quantité de chlorophylle et la production de lipides de réserve sont suivis quotidiennement par des mesures de fluorescence en utilisant un spectrophotomètre lecteur de plaque (Tecan, Infinite[®]M1000 PRO). Pour cela, 160 μL de cellules sont placées dans une plaque 96 puits à fond noir (ThermoFisher Scientific) et la chlorophylle est excitée à 440 nm avec une émission analysée à 680 nm. En cas de densité cellulaire trop importante les échantillons sont dilués avant les mesures. Le marquage des TAG est ensuite réalisé par ajout de 40 μL de la solution de coloration Nile Red (ou rouge de nile, Sigma). Après 20 minutes d'incubation, la solution de marquage est excitée à 530 nm et l'émission analysée à 580 nm. Les mesures de chlorophylle et de Nile Red sont ensuite ramenées à la quantité de cellules présentes pour le modèle *A. thaliana* (g/10mL de culture) ou normalisées pour chaque échantillon à $1\cdot 10^6$ cellules. mL^{-1} pour *P. tricornutum*.

II. Expériences d'incubation des cultures cellulaires avec des inhibiteurs de croissance et en carence d'azote

A. Modèle *A. thaliana*

Pour les expériences d'incubation, les cultures cellulaires sont standardisées comme suit : les cellules ou les cals sont repiqués 48h avant le début de l'expérience dans 200 mL de milieu neuf à une concentration de $0.18 \text{ g} \cdot 10^{-1} \text{ mL}$ de culture (**Figure 42**). La quantité de cellules est déterminée par la pesée du poids frais. Le matin du début de l'expérience, les cellules sont à nouveau repiquées dans 100 mL de milieu neuf à une concentration de $0.3 \text{ g} \cdot 10^{-1} \text{ mL}$. Ce repiquage permet de s'assurer que les cellules soient en phase exponentielle en début d'expérience et qu'il n'y ait pas d'élément nutritif limitant dans le milieu. Après une demi-journée de récupération post-repiquage, les cellules sont incubées avec les molécules d'intérêt (**Figure 40**) ou lavées trois fois avec un milieu dépourvu d'azote ($4.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de MSP09, Caisson Laboratories), $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de saccharose, $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de solution 2.4-D à $0.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de solution 3Pi), pH = 5.7 et placées dans 100 mL de ce même milieu.

La croissance cellulaire est suivie tous les jours par mesure du poids frais. Après 3 jours d'incubation (72h), la présence de gouttelettes lipidiques est observée en microscopie confocale avec la coloration au Nile Red et les cellules sont récoltées et congelées à -80°C (**Figure 42**).

Molécules	Abréviations	Concentrations (μM)	Solution de dilution
Methotrexate	MTX	3	Tris 50mM pH8
5-Fluorouracile	5-FU	200	Tris 50mM pH8
Pyriméthamine	Pyri	200	100% DMSO
Triméthoprim	Tri	200	Tris 50mM pH8
Taxol	Tax	50	100% DMSO
Oryzoline	Ory	100	100% DMSO
Rapamycine	Rapa	15	100% DMSO
Milieu sans azote	-N	/	/

Figure 40 : Molécules et concentrations finales utilisées pour les expériences d'incubation avec les cultures cellulaires d'*A. thaliana*. Pour chaque molécule, une gamme de concentration a été testée et ne sont présentées ici que les concentrations présentant l'effet le plus intéressant. La concentration finale en culture de tris 50 mM (trishydroxyméthylaminométhane) et DMSO (diméthylsulfoxyde) ne dépassent pas respectivement 0.6% et 0.3%.

1. Expérience d'incubation avec des lipides fluorescents dans les conditions MTX et carence d'azote

Les expériences d'incubations de cellules d'*A. thaliana* avec des lipides couplés à des sondes fluorescentes, suivent le même protocole que celui décrit précédemment (**Figure 42**). Les cellules sont repiquées 48h avant le début de l'expérience, ainsi que le jour même. Après un temps de récupération de 5h, les cellules sont incubées avec le Méthotrexate (3 μ M) ou lavées trois fois dans un milieu sans azote. A chaque condition (témoin, MTX ou - N) est également ajouté 250 nM d'acide gras libre FL C₁₆ (ThermoFisher Scientific) ou 500 nM de PC mono-marquée : TopFluor®PC (Avanti Polar Lipids, Inc.) ou 500 nM de PC doublement marquée : Bis-Bodipy® FC C₁₁-PC, (ThermoFisher Scientific). Les lipides fluorescents sont marqués sur leurs acides gras (**Figure 41**). Ils sont dilués dans de l'éthanol 100% et la concentration finale en culture de l'éthanol ne dépasse pas 0.05%. Durant les 3 jours de traitement, les cellules sont protégées de la lumière pour éviter une dégradation des fluorochromes. Après 72h d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois dans du milieu complet (condition MTX) ou sans azote (condition - N). La fluorescence est suivie par microscopie confocale juste après rinçage des cellules (0h), puis 2h30 et 4h plus tard. Les cellules sont ensuite récoltées et congelées à - 80°C.

Nom	Nom complet	Formule brute	Formule développée	Excitation/Emission
Top Fluor PC	1-palmitoyl-2-(dipyrometheneboron difluoride) undecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₄₈ H ₈₃ BF ₂ N ₃ O ₈ P		495/503nm
Bis-BODIPY FL C11-PC	1,2-Bis-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-5-Indacene-3-Undecanoyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholine	C ₅₂ H ₇₈ B ₂ F ₄ N ₅ O ₈ P		488/530nm
BODIPY FL C16	4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a, 4a-Diaza-5-Indacene-3-Hexadecanoic Acid	C ₂₇ H ₄₁ BF ₂ N ₂ O ₂		488/510nm

Figure 41 : Principales propriétés des lipides marqués avec des sondes fluorescentes.

2. Expériences d'incubation avec des molécules radioactives

a. Suivi de la radioactivité dans le milieu de culture et de son incorporation dans les cellules

Des expériences contrôles ont été réalisées dans un premier temps pour connaître le taux et la vitesse d'incorporation de la radioactivité C^{14} dans les cellules (Bates et al 2007, Tjellström et al 2012). Pour cela, les cellules sont repiquées 48h avant le début de l'expérience, ainsi que le jour même. Après un temps de récupération de 2h, les cellules sont incubées avec 0.2 μCi d'acétate (acetic acid, sodium salt, [1,2- ^{14}C]-Ethanol, Perkin Elmer) ou $2.66 \cdot 10^{-2}$ μCi de glycérol-3-phosphate ou "G3P" (glycerol 3-phosphate, L [U- ^{14}C], Perkin Elmer). Dans un souci de confinement des matières radioactives, les cellules sont cultivées dans des erlens de 500 mL placés dans un incubateur (Infors HT Minitron), en rotation circulaire de 125 rpm et sous lumière constante ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Le suivi de la radioactivité a été réalisé pendant 29h en utilisant un détecteur à scintillation (Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2900, Perkin-Elmer). Pour mesurer la radioactivité présente dans le milieu, 1 mL de milieu de culture est placé dans 8 mL de liquide scintillant (Ready SafeTM, Beckman Coulter) et les coups par minute (CPM) du C^{14} détectés durant 5 minutes pour chaque échantillon. Pour mesurer la radioactivité incorporée dans les cellules, 1 mL de milieu de culture est prélevé, les cellules sont lavées 3 fois avec de l'eau puis récoltées et placées dans une cuve pour scintillateur comme expliqué ci-dessus. Pour chaque mesure, les CPM ont été ramenés à la quantité de cellules présentes, exprimée en poids frais.

b. Expériences d'incubations avec des molécules radioactives durant le traitement MTX et en carence d'azote

Les expériences d'incubations de cellules d'*A. thaliana* avec des précurseurs radioactifs, suivent le même principe que décrit précédemment : les cellules sont repiquées 48h avant le début de l'expérience, ainsi que le jour même (**Figure 42**). Après un temps de récupération de 2h, les cellules sont incubées avec 0.2 μCi d'acétate ou $2.66 \cdot 10^{-2}$ μCi de G3P marqués au C^{14} . Après 7h d'incubation, l'expérience de chasse sur 72h commence : les cellules sont lavées 3 fois afin de supprimer les molécules radioactives dans le milieu des cellules. Pour la condition - N, les cellules sont rincées avec du milieu MS sans azote et pour les conditions témoins et MTX, les cellules sont rincées avec du milieu MS complet. Le méthotrexate est ensuite rajouté (3 μM), pour cette dernière condition. Le suivi de la radioactivité dans le milieu de culture comme dans les cellules est effectué quotidiennement par scintillation. Chaque jour, une mesure du poids frais est également effectuée, ainsi qu'un prélèvement de cellules qui est congelé à -80°C dans une optique d'extraction des lipides.

Matériel & Méthodes

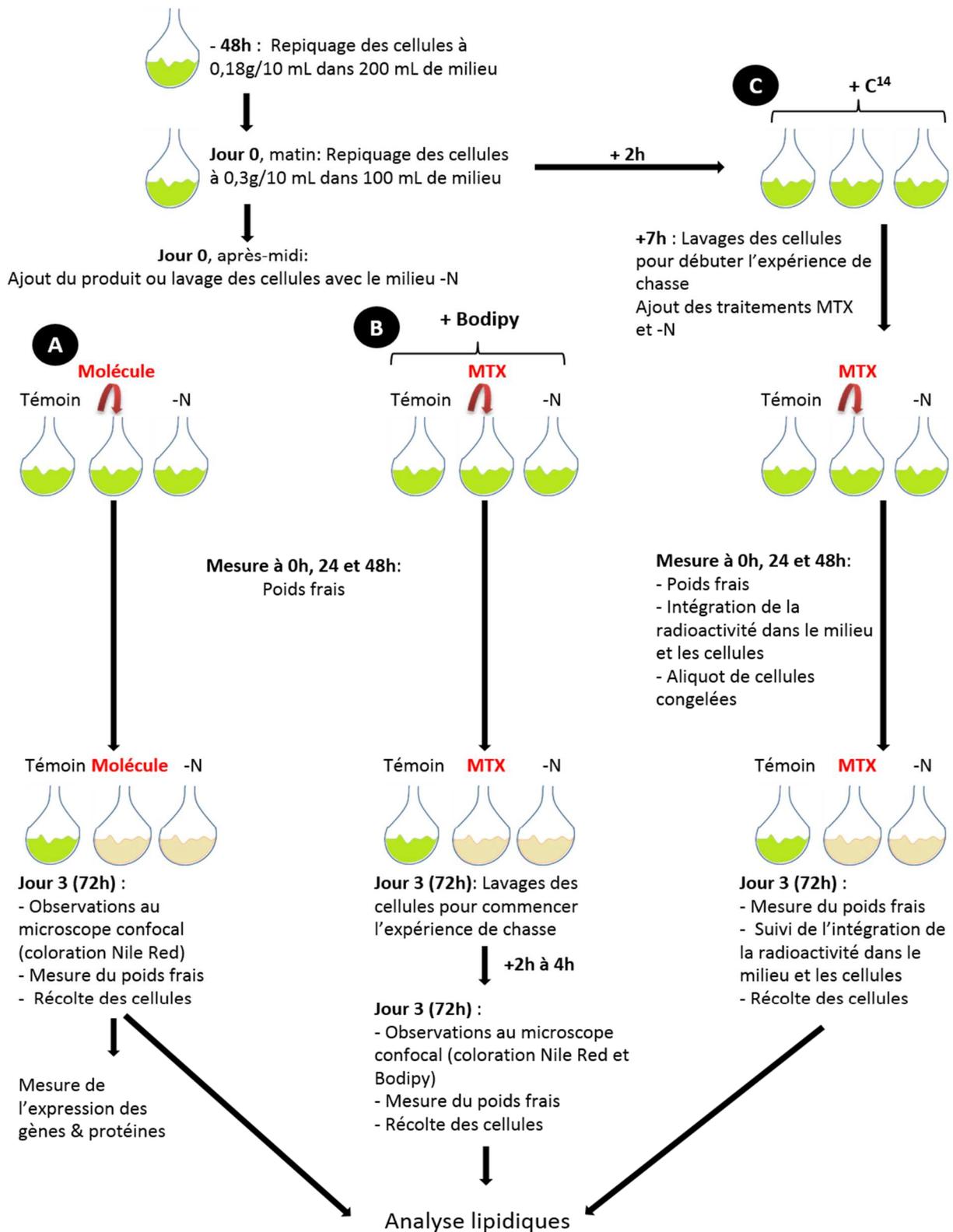


Figure 42 : Expérience d'incubation des cellules d'*A. thaliana*, vue d'ensemble. A) Expériences d'incubation avec le MTX (ou une autre molécule chimique) et la carence d'azote. B) Expériences d'incubation avec les PC marquées avec un fluorochrome dans les conditions MTX et - N. C) Expériences d'incubation avec de l'acétate ou du glycérol 3-phosphate radiomarqués dans les conditions MTX et - N. MTX : méthotrexate, - N : carence en azote.

B. Modèle de diatomée *P. tricornutum*

Les microalgues sont un modèle apprécié pour l'étude de la formation et de l'accumulation des lipides de stockage. De plus, c'est un matériel végétal qui autorise des conditions de cultures dans de petits volumes. Pour cette raison, il est possible d'effectuer un criblage ("screen") rapide sur une large gamme de molécules et de concentrations, dans de petits volumes comme des plaques 48 puits. Puis de réaliser des cultures dans de plus gros volumes ("scale-up") pour les conditions où la production de TAG est maximale.

1. Criblage des molécules

a. Conditions de culture

Le modèle *P. tricornutum* est cultivé pendant deux jours en milieu ESAW 1X à 20°C et 110 rpm avec un cycle de lumière jour/nuit 12h/12h à 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{ms}^{-1}$. La concentration cellulaire des cultures est ensuite réalisée et les cellules récoltées par une centrifugation de 5 minutes à 5 000 G et à température ambiante. Le culot cellulaire est ensuite lavé deux fois avec un milieu ESAW sans azote (ESAW – N). Les cultures sont ensuite reprises dans un milieu sans azote pour un volume final de 25 mL et une concentration ajustée à $2\cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹. Les diatomées sont ensuite placées dans des plaques 48 puits à raison de 250 μL de culture par puits, avec des billes de verres de 4 mm, stérilisées sous UV, permettant d'aérer le milieu et de prévenir d'une éventuelle décantation des cellules. Les puits sont ensuite complétés à 500 μL avec du milieu ESAW 1X contenant les molécules à tester ou avec du milieu ESAW – N pour les cellules contrôles. L'impact des molécules sur la production de TAG est comparé à l'accumulation de TAG lors d'une carence en azote. Après l'ajout des composés à tester, les plaques sont refermées à l'aide de parafilm et incubées 48h ou 72h en conditions standards (voir plus haut). Une aliquote de 16 μL de chaque échantillon est prélevé et placé dans une plaque 96 puits noire et 144 μL d'eau sont rajoutés afin d'atteindre un volume de 160 μL pour une dilution de 10X. Ces échantillons permettent de mesurer les paramètres suivants pour chaque traitement : la concentration cellulaire, la chlorophylle et l'accumulation de TAG par coloration au Nile Red. La production de TAG est suivie par spectrophotométrie et en microscopie à épifluorescence. Les protocoles sont identiques à ceux utilisés dans les sections pages 105 et 106.

b. Composés testés

Tous les composés ont été suspendus dans du DMSO 100%, puis dilués en série dans du milieu ESAW 1X. La concentration finale en culture de DMSO est gardée constante à 0.5%. Ce même pourcentage de DMSO est rajouté aux conditions témoins. Chaque concentration testée est réalisée en triplicata biologique. Chaque réplica biologique fait l'objet d'un duplicata technique pour le suivi de la croissance, de la chlorophylle et de l'accumulation de TAG. En parallèle, les composés sont ajoutés à un milieu ESAW sans microalgue, afin d'estimer dans les mêmes conditions leur autofluorescence et d'éventuelles interactions avec le colorant Nile Red.

i. Inhibiteur de la croissance cellulaire

Un parallèle avec les expériences effectuées chez les cellules de plante supérieure *A. thaliana* est effectué chez *P. tricornutum*. Pour se faire, les diatomées ont été exposées 72h aux molécules présentées **Figure 43**.

1	Molécules	Concentrations (nM)	Concentrations (µM)	Solution de dilution
	Methotrexate	/	0.1 - 1 - 3 - 10 - 30 - 100	100% DMSO
	5-Fluorouracile	0.001 - 0.01 - 0.1 - 1	0.01 - 0.03 - 0.1 - 0.3 - 3 - 1 - 10 - 30 - 55 - 100 - 300	
	Pyriméthamine	/	1 - 3 - 10 - 30 - 100	
	Triméthoprim	/	0.3 - 1 - 3 - 10 - 30 - 100 - 300	
2	Molécules	Concentrations des nutriments (mM)	Concentrations du MTX (µM)	
	Sodium Acétate (NaAcetate)	15	0.1 - 1 - 10 - 100	
		30	1 - 10 - 100	
		60		
	Glycérol	60	10	
		100		
	Glucose	50	0.1 - 1 - 10 - 100	

Figure 43 : Concentrations des molécules exposées chez le modèle *P. tricornutum*. 1) Exposition d'une gamme de concentrations d'inhibiteurs du métabolisme C1. 2) Exposition parallèle d'une gamme de concentrations de l'inhibiteur méthotrexate et de différentes concentrations en nutriments.

ii. Autres inhibiteurs

Pour compléter des expériences entreprises par l'équipe dans l'optique d'un dépôt de brevet sur des molécules induisant l'accumulation de TAG dans le modèle *P. tricornutum*, les diatomées ont été exposées 48h avec les composés suivants (**Figure 44**).

Molécules	Concentrations (µM)	Solution de dilution
Terbinafine	0.1 - 1 - 3 - 10 - 30 - 100	100% DMSO
Butenafine	10 et 30	
Ethynylestradiol	12.5 et 50	
Simvastatine		
Mevastatine		
Estrone	50 et 100	

Figure 44 : Concentrations des molécules exposées chez *P. tricornutum*.

2. Scale-up de la culture pour le composé 5-Fluorouracile et pour les carences en nutriments

Les cultures de *P. tricornutum* sont repiquées à 1.10^6 cellules.mL⁻¹ dans un milieu ESAW 10X et cultivées en conditions standards (voir p 96). Après 5 jours de culture, les traitements sont initiés. Pour le 5-fluorouracile deux concentrations – basées sur les résultats obtenus lors du criblage initial- sont testées : 0.07 µM et 0.3 µM (respectivement 0.07 et 0.32% de DMSO final en solution). Pour les conditions de carence, les cellules sont centrifugées (1 500 G, 30 minutes) et lavées 3 fois avec du milieu ESAW sans azote ou sans phosphate, puis mises

en culture 3 jours. Un suivi quotidien des cultures sur les paramètres : croissance, chlorophylle et accumulation de TAG est réalisé (voir p 104-105). Au 3^{ème} jour les cultures sont récoltées : centrifugation à 3 500 G, 10 minutes à température ambiante et les culots cellulaires sont congelés en vue d'une extraction de lipide.

III. Techniques de microscopie

A. Microscopie optique

Chez le modèle *A. thaliana*, un suivi de la production d'amidon en condition témoin et MTX a été réalisé sur 3 jours. Un aliquot de 0.5 mL de cellules est récolté à 0, 24, 48 et 72h et marqué avec 100 µL de lugol (10% (p/v) de KI et 5% (p/v) de Iodine). Les cellules sont rincées 3 fois à l'eau et observées sous lumière blanche (objectif EC Plan-NEOFLUAR 40X/0.75, Zeiss Axio Scope A1).

Les cellules de *P. tricornutum*, sont aussi examinées en lumière blanche afin de déterminer leur morphologie cellulaire et la taille et la forme du chloroplaste.

B. Microscopie à épifluorescence

L'observation des gouttelettes lipidiques marquées par du Nile Red chez les microalgues permet de compléter les données obtenues avec le lecteur de plaque. Les cellules (160 µL) sont incubées 20 minutes avec 40 µL de Nile Red (2.5 µg.mL⁻¹, 100% DMSO), puis examinées avec en épifluorescence avec un filtre FITC. Les nombre et la taille des gouttelettes lipidiques ainsi que la fluorescence du chloroplaste sont visualisés. Les acquisitions sont réalisées avec un microscope à épifluorescence Zeiss Axio Scope A1 et un objectif 100X à immersion à huile (EC Plan-NEOFLUAR 100X/1,3 Oil).

C. Microscopie confocale

Les cellules d'*A. thaliana* sont visualisées avec un microscope confocal (Leica, TCS SP2) et un objectif à immersion à huile Apo45x\1.25-0.75.

1. Suivi de la chlorophylle

La chlorophylle est excitée à 488 nm et le spectre d'émission récolté autour de 680 nm. Les images obtenues sont pseudo-colorées en rouge.

2. Suivi des lipides de stockage

Les gouttelettes lipidiques formées dans les cellules peuvent être observées après un marquage au Nile Red (Sigma). Pour ce faire, 40 µL de Nile Red (2.5 µg.mL⁻¹, 100% DMSO) et

160 μ L de cellules sont incubés durant 20 minutes. Le Nile Red est excité à 543 nm et les longueurs d'ondes d'émissions sont récoltées dans une fenêtre de 559 à 603 nm. Les images obtenues sont pseudo-colorées en jaune.

3. Coloration des noyaux

Afin de visualiser les noyaux des cellules, 5 μ L d'une solution de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Sigma) à 10 μ g.mL⁻¹ contenant 0.2% de Triton (permettant de rendre perméables les cellules végétales au colorant) est incubé 15 minutes avec 50 μ L de cellules. Le DAPI est excité à 358 nm et le signal récolté autour de 461 nm. Les images sont pseudo-colorées en bleu.

4. Suivi des lipides fluorescents

Les cellules incubées avec les lipides fluorescents Top Fluor PC ou FL C16 sont excitées à 488 nm et le spectre d'émission récupéré entre 505 et 550 nm. Pour la Bis-Bodipy FL C11-PC, l'excitation est également réalisée à 488 nm et les longueurs d'ondes d'émissions récoltées entre 505 et 590 nm. Les images sont pseudo-colorées en vert.

IV. Analyse des glycérolipides de plante et de diatomée

Des protocoles équivalents pour l'extraction des lipides, le dosage des acides gras totaux, la migration sur chromatographie sur couche mince une dimension et la quantification des lipides en chromatographie en phase gazeuse sont utilisés pour les deux modèles *A. thaliana* et *P. tricornutum*.

A. Extraction (Méthode Folch)

Les échantillons : entre 0.3 et 0.5 g de cellules sont lyophilisés sur la nuit. Ils sont ensuite broyés dans de l'azote liquide et rapidement transférés dans un tube contenant 4 mL d'éthanol bouillant. Chaque échantillon est placé 5 minutes dans un bain marie à 90°C; cette étape permet d'inhiber les lipases présentes dans l'échantillon et ainsi de prévenir une dégradation lipidique. 2 mL de méthanol sont ensuite ajoutés suivi de 8 mL de chloroforme, le mélange étant homogénéisé par bullage d'argon pendant 1 minute. La présence d'argon permet également de placer les échantillons en atmosphère neutre et de prévenir ainsi leur oxydation. Les tubes sont ensuite recouverts d'aluminium et laissés au repos à température ambiante pour 1 heure. Afin de se débarrasser des débris cellulaires, les extraits sont filtrés sur laine de verre. La séparation des phases organique et hydrophile est réalisée par ajout de 3 mL de chloroforme:méthanol 2:1, v/v et de 5 mL de chlorure de sodium 1% et les échantillons sont agités par bullage d'argon pendant 1 minute puis centrifugés 20 minutes à 1 000 rpm. La phase inférieure contenant les lipides est récupérée et évaporée sous argon,

puis stockée à - 20°C. L'extraction des lipides des cellules végétales et des microalgues est réalisée selon la méthode de *Folch et al 1957*, repris par *Simionato et al 2013* et *Abida et al 2015*.

B. Quantification des extraits totaux

La quantification des acides gras en chromatographie en phase gazeuse permet de déterminer la quantité de lipide présent dans les extraits.

1. Méthanolyse

Afin de quantifier les lipides extraits, une méthanolyse des acides gras est réalisée sur 10 µL des extraits totaux lipidiques dans 3 mL de milieu de méthanolyse (méthanol:acide sulfurique 40:1, v/v). Un standard interne est également rajouté : 10 µg de C15:0 ou C21:0 (Sigma). La réaction se déroule 1h à 100°C, puis les tubes sont laissés refroidir sur la paillasse au moins 5 minutes. 3 mL d'eau et 3 mL d'hexane sont ajoutés, le mélange est vortexé et laissé 20 minutes au repos à température ambiante afin de laisser le temps aux deux phases de se former. La phase supérieure contenant les lipides est prélevée et mise à évaporer. Afin de récupérer l'intégralité des acides gras méthylés, une seconde étape de lavage à l'hexane est réalisée. Après évaporation, les esters méthylés sont stockés à - 20°C.

2. Dosage des acides gras en chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

Les acides gras méthylés issus de la méthanolyse sont décongelés, repris dans 200 µL d'hexane et évaporés. Cette étape permet de les concentrer dans le fond du tube. Puis ils sont re-suspendus dans 50 µL à 100 µL d'hexane et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). Toutes les analyses ont été réalisées sur une GC-FID Perkin Elmer, sur une colonne de cyanopropyl polysilphènesiloxane BPX70 (SGE), avec des températures croissantes de 130 à 180°C, l'azote étant utilisé comme gaz vecteur. Les esters méthylés sont ensuite identifiés grâce à leur temps de rétention et à leur comparaison avec des standards (Sigma). Le temps de rétention d'une molécule dépend du nombre de carbone et de son degré d'insaturation. La quantification de chaque espèce moléculaire est réalisée par analyse de la surface des pics et par le rapport obtenu avec celui du standard interne C15:0 ou C21:0.

C. Séparation et dosage des glycérolipides

La séparation des différentes catégories de glycérolipides est réalisée par chromatographie sur couche mince (TLC). Les lipides sont déposés sur une plaque de verre recouverte de silice qui forme la phase stationnaire. La phase mobile constituée de solvant progresse le long de la phase stationnaire par capillarité et entraîne avec elle les lipides qui sont séparés en

fonction de leur polarité. Les lipides neutres sont séparés par TLC monodimensionnelle et les lipides polaires sont séparés par TLC bidimensionnelle.

1. Chromatographie sur couche mince (TLC)

Les extraits lipidiques totaux sont repris dans du chloroforme et 300 µg sont déposés sur une plaque de verre comportant une couche de silice (Silica gel 60, Merck).

Les lipides neutres migrent 1h dans un mélange de solvant : hexane:diethylesther:acide acétique 70:30:1, v/v. Un standard de DAG (Sigma) est également déposé sur la plaque pour permettre d'identifier cette espèce moléculaire plus facilement. Les lipides polaires migrent 1.5h dans un mélange de solvant Sens 1 : chloroforme:méthanol:eau 65:25 :4, v/v. La plaque est ensuite séchée et laissée sous argon sur la nuit. Pour la deuxième migration la plaque de silice est pivotée d'un quart de tour et placée dans un mélange Sens 2 : chloroforme:acétone:méthanol:acide acétique:eau 50:20:10:10:5, v/v pour 1.5h. Après migration, les plaques mono et bidimensionnelles sont séchées et les lipides sont visualisés sous UV après pulvérisation à l'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique 0.2%, p/v dans du méthanol).

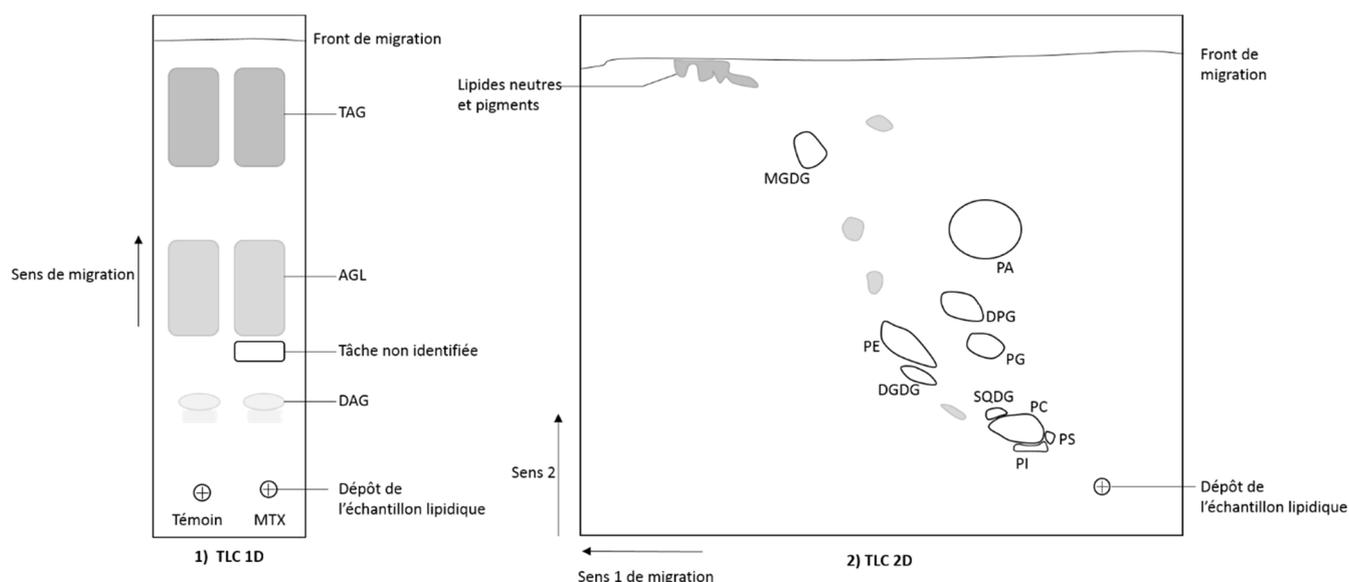


Figure 45 : Migrations des glycérolipides sur les TLC. 1) Migration des lipides neutres d'*A. thaliana* et *P. tricornutum* sur TLC 1D. 2) Migration des lipides polaires d'*A. thaliana* sur TLC 2D. La migration des lipides polaires de *P. tricornutum* est différente de celle des lipides d'*A. thaliana*. Un exemple de migration est présenté Figure 3 de la publication : “Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*” Abida et al, 2015 (p 185). TLC : thin layer chromatography.

2. Dosage des glycérolipides

Les différentes espèces moléculaires révélées sous UV sont identifiées grâce à un profil de migration établi au laboratoire mis au point avec des standards. Les lipides sont récupérés

par grattage des plaques de silice et extraits au cours d'une méthanolyse et quantifiés en GC selon la méthode décrite précédemment (voir p 107).

Pour le besoin de l'article "*Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in Phaeodactylum tricornutum*" des analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées sur le modèle *P. tricornutum* et sont présentées dans le matériel et méthode de l'article.

a. Extraction et analyse des lipides fluorescents (bodipy®)

Après les expériences d'incubation des cellules avec des lipides couplés à des sondes fluorescentes, les lipides sont extraits comme précédemment décrits. Les fluorochromes étant photosensibles, les manipulations sont effectuées en prenant soin de les protéger de la lumière. Après le dosage des acides gras totaux, 100 µg d'échantillon sont mis à migrer sur TLC. Cette quantité est suffisante pour détecter la fluorescence dans les échantillons. Les plaques sont révélées à l'aide d'un ChemiDoc (Bio-Rad) par excitation à 488 nm (filtre Alexa).

i. *Standards fluorescents*

La migration des lipides est affectée par la présence du fluorophore. Afin d'identifier les lipides neutres contenant des acides gras fluorescents sur les TLC, des standards ont également été déposés sur les plaques de silices (Scherer *et al* 2002). Le standard utilisé pour les acides gras libres est le bodipy® commercial FL C₁₆ (ThermoFisher Scientific), dont 20 µL à 250 nM sont déposés sur la plaque de silice. Afin d'obtenir des standards DAG mono et bi-marqué, une digestion enzymatique de phosphatidylcholine est réalisée, en utilisant la TopFluor®PC mono-marquée (Avanti Polar Lipids, Inc.) et la Bis-Bodipy® FC C₁₁-PC, (ThermoFisher Scientific), marquée sur ces deux acides gras. 0.01 µM de ces deux types de PC sont évaporés puis repris et mélangés dans 500 µL de tampon à pH=8 : 80 mM de tris, 10 mM de chlorure de calcium et 0.4 mg.mL⁻¹ d'albumine de sérum bovin (BSA). L'échantillon est ensuite passé sous sonication (sonificateur 500 W 0.5-500 mL, sonde 10 -250 mL, Fisher Scientific) : 1 minute de pulse intensité 30% (programme de 3 minutes comprenant des cycles de 1 seconde de pulse suivi de 2 secondes de pause). La phospholipase C (Sigma, *B. coreux*), responsable de la synthèse de DAG par coupure de la tête polaire de la PC, est ensuite ajoutée (1 µL, 10 unités.µL⁻¹) et laissée agir 1h à 37°C sous faible agitation. Les lipides produits sont ensuite extraits par ajout de 1,875 mL de chloroforme:méthanol 1:2, v/v et de 625 mL d'eau. Après agitation, 625 µL de chloroforme sont ajoutés avant de centrifuger le mélange 10 minutes à 1 500 rpm (alternativement, le mélange est laissé au repos 20 minutes). La phase organique (phase inférieure) est prélevée, évaporée sous argon et stockée à - 20°C. Les DAG simplement et doublement marqués avec des sondes fluorescentes sont repris dans du chloroforme à une concentration d'environ 250 nM et 60 µL sont déposés sur la TLC.

Le standard de TAG marqués avec des sondes fluorescentes sur un acide gras a été synthétisé par le docteur Yung-Sing Wong de l'Université de Pharmacie de Grenoble à partir

d'acide gras libres FL C₁₆ et de 1,2-dioleil sn glycérol. Les standards TAG est ensuite repris à 250 mM et 20 µL sont déposés sur les TLC.

b. Extraction et analyse des lipides radioactifs

Après les expériences d'incubation des cellules avec de l'acétate et du glycérol-3-phosphate marqués au C¹⁴, les lipides sont extraits comme précédemment décrits. Ne disposant pas d'une GC-FID dédiée à la radioactivité, le dosage des acides gras totaux de ces échantillons, ainsi que la quantification des différentes espèces moléculaires après migration sur TLC, n'ont pas été réalisés comme précédemment décrit. A la place, la quantité de cellules pour l'extraction des lipides a été gardée constante (0.3 g.10⁻¹mL) et 30 µL des extraits lipidiques totaux de chaque échantillon ont été déposés sur TLC afin de pouvoir comparer les résultats. Après migration, des standards de radioactivité (provenant de la source d'acétate) sont déposés : 0.05, 0.005 et 0.0005 µCi et les plaques sont exposées 12h (pour l'acétate) et 24h (pour le glycerol-3-phosphate) à un écran sensible aux rayonnements beta (Molecular Dynamics Phosphor Screen, GE Healthcare Life Sciences). Après exposition, l'écran est révélé à 633 nm, avec une précision de 50 microns par pixel (Typhoon 9400, GE Healthcare Life Sciences). La présence de radioactivité incorporée dans les lipides est détectée et analysée grâce au logiciel associé (Image Quant). La mesure du signal radioactif provenant des standards permet d'obtenir une courbe d'étalonnage. L'équation de la droite est utilisée pour convertir l'intensité du signal de chaque espèce moléculaire en µCi. L'écran est ensuite remis à zéro par exposition 20 minutes minimum à la lumière.

D. Dosage du ratio AdoMet/AdoHcy, de la phosphocholine et des Acyl-CoA

Pour les besoins de la publication "*C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation trigger triacylglycerol accumulation in mesophyll cells of Arabidopsis thaliana and highlight a role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway*", le dosage en spectrométrie de masse de l'AdoMet, de l'AdoHcy et de la phosphocholine, a été réalisé au laboratoire par F. Rébeillé. Le dosage des Acyl-CoA a été effectué par nos collaborateurs F. Baudoin et R. Haslam, du centre de recherche Rhotamsted à Harpenden, Royaume-Uni. Le protocole des méthodes utilisées est détaillé dans la partie matériel et méthode de l'article (p 157).

V. **Mesure de l'expression génique chez le modèle *A. thaliana***

Afin de visualiser si les différents traitements affectent les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TAG, des expériences de qPCR ont été effectuées.

La manipulation d'ARN messagers et d'ADN complémentaires doit se faire dans des conditions de stérilité et de propreté soutenues afin d'éviter la dégradation du matériel (l'utilisation de consommables stériles, de traitements anti-RNase, la désinfection de la paillasse à l'éthanol 70% et le passage sous U.V des pipettes est préconisé).

A. Extraction de l'ARN messenger

80 mg d'échantillons de cellules stockées à - 80°C et provenant des expériences d'incubation sont broyées à l'aide d'un piston RNase free dans de l'azote liquide. Les cellules sont ensuite placées sur glace et les ARNm totaux sont extraits à l'aide du kit RNasesy R Plant Mini Kit (Quiagen). La quantité totale d'ARN est dosée au nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), puis 10 µg sont prélevés pour effectuer la digestion de l'ADN génomique, ce qui permet de s'affranchir de contamination d'amplification lors de la qPCR. La digestion est réalisée à 37°C pendant 30 minutes après ajout de 5 µL de turboDNase buffer (Thermo Fisher Scientific) et de 1 µL de d'enzyme turbo DNase (Thermo Fisher Scientific). A température ambiante, 5 µL de DIR (DNase Inactivation Reagent, Thermo Fisher Scientific) sont rajoutés pendant 2 minutes afin de stopper la réaction, puis les échantillons sont centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 1.5 minute. Le surnageant est récupéré (environ 50 µL) et transféré dans un tube RNase free sans toucher au culot. La concentration des ARNm est encore une fois dosée au nanodrop. Afin de contrôler la qualité de ces derniers, 500 ng sont déposés dans un gel d'agarose 1%, dans du tampon TAE 0.5X (tampon tris-acétate-EDTA). Afin de prévenir toute dégradation du matériel, les cuves de migrations sont nettoyées avant usage au GigaPur RNA Off (Shimitek) et la migration est limitée à son minimum (15 minutes). Un échantillon de bonne qualité doit présenter une migration de deux bandes correspondant aux ARNm et ribosomiaux. Durant les temps d'attente, le stock d'ARNm doit être stocké à - 80°C pour éviter sa dégradation.

B. Rétrotranscription

Après décongélation dans la glace, une solution de 100 ng.µL⁻¹ d'ARNm dans 10 µL d'eau ultra pure stérile est préparée pour chaque échantillon. A cela est rajouté 3 µL d'un mix oligo dT comprenant 2 µL d'oligo dT (1 µg.µL⁻¹, Eurofins) et 1 µL d'eau RNase free. Après 5 minutes à 70°C et 5 minutes dans la glace, 7 µL d'un mix RT sont ajoutés, comprenant : 4 µL de Buffer RT (5X, Promega), 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de RNasin (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega) et 1 µL d'enzyme reverse transcriptase (M-MLV Reverse transcriptase RNase (H⁻), Point Mutant, Promega). Les 20 µL de réaction sont incubés 1h à 40°C puis 15 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. En parallèle, des contrôles négatifs pour la qPCR : "NEC" (No Enzyme Control) et "NTC" (No Template Control) sont réalisés suivant les mêmes conditions à l'exception que pour NEC, l'enzyme reverse transcriptase n'est pas ajoutée au mix et pour le contrôle NTC, la réaction se fait sans ajout d'ARNm. Après réaction, les échantillons d'ADN complémentaires (ADNc) et les contrôles négatifs sont placés dans la glace et 180 µL d'eau stérile sont ajoutés (dilution au 1/10^{ème}). Les ADNc sont stockés à - 20°C si pour une courte durée, sinon placés à - 80°C.

Pour juger de la qualité de la rétrotranscription d'ARNm en ADNc, une PCR classique sur des gènes de ménage est réalisée (exemple : *ACTINE 7*). La polymérase Taq fusion est utilisée dans un volume final de 15 µL avec 1 µL d'ADNc comme modèle. Les échantillons sont ensuite mis à migrer sur gel d'agarose 1% dans du TAE 0.5% pour 20 minutes à 75 V.

L'utilisation d'oligonucléotides pour qPCR nous donne un amplicon d'une taille de 200 bp environ.

C. PCR quantitative (qPCR)

1. Préparation des échantillons et des gammes de dilution

Les échantillons d'ADNc sont dilués au 1/25^{ème} dans de l'eau stérile. Une gamme d'ADNc est préparée à partir de quantité équivalente des échantillons témoins et contrôles, puis une dilution en cascade par ajout d'eau stérile est réalisée jusqu'à obtenir 7 points de gamme. La gamme permet de mesurer l'efficacité d'amplification des oligonucléotides, paramètre indispensable à connaître pour l'interprétation des résultats.

2. Réaction de qPCR

Chaque réactions de qPCR comporte 5 µL d'ADNc (ou d'un point de la gamme) et 10 µL du mix qPCR à savoir : 7.5 µL de SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma), 2.125 µL d'eau et de 0.375 µL d'un mix d'oligonucléotides sens + antisens à 10 µM. Les points de la gamme sont réalisés en duplicata techniques et les échantillons en triplicata.

Le système RotorGene 3000 (Corbett Research) et son logiciel associé sont utilisés pour l'amplification des ADNc. Les cycles d'amplification se composent de 3 étapes : une dénaturation de 95°C pendant 15 secondes, une hybridation d'environ 60°C (variable selon les oligonucléotides) durant 15 secondes et une élongation de 72°C pendant 15 secondes.

3. Interprétation des résultats de qPCR

La quantification de l'expression des gènes d'intérêt est réalisée grâce à la méthode de comparaison des Ct. Chaque donnée est normalisée en fonction de trois gènes de ménage, sélectionnés pour leur absence de variations d'expression en condition témoin et MTX : *ACTINE 7* (At5g09810), *UBIQUITINE 5* (At3g62250) et *ARP1* (At1g43170). Un Ct est le nombre de cycles que met un échantillon à atteindre un seuil (déterminé et constant pour toute les qPCR). Ainsi le Ct varie en fonction de la quantité de départ des ARNm : plus un gène est exprimé dans un échantillon, moins celui mettra de cycles d'amplification à atteindre le seuil.

$$\Delta\Delta Ct = \underbrace{[Ct_{Xt} - Ct_{Tt}]}_{\Delta Ct \text{ traitement}} - \underbrace{[Ct_{Xo} - Ct_{To}]}_{\Delta Ct \text{ contrôle}} = \underbrace{[Ct_{Xt} - Ct_{Xo}]}_{\text{Gène cible}} - \underbrace{[Ct_{Tt} - Ct_{To}]}_{\text{Gène rapporteur (référence)}}$$

ΔCt traitement ΔCt contrôle Gène cible Gène rapporteur (référence)

L'efficacité d'amplification de l'ADNc pour un couple d'oligonucléotides est donnée par la gamme de dilution. Si l'efficacité de la qPCR = 1, cela veut dire qu'à chaque cycle, la quantité d'ADNc double.

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} (\text{traitement} - \text{contrôle})$$

$$R = 2^{\Delta\Delta Ct} (\text{contrôle} - \text{traitement})$$

$$R = R \text{ gène cible} / R \text{ gène référence}$$

$$R = 2^{-(Ct_{Xt} - Ct_{Xo})} / 2^{-(Ct_{Tt} - Ct_{To})}$$

$$R = 2^{-(Ct_{Xt} - Ct_{Xo})} \times 2^{+(Ct_{Tt} - Ct_{To})}$$

$$R = 2^{-(\Delta Ct \text{ cible} - \Delta Ct \text{ ref})}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Quand la différence entre l'expression du gène de ménage et l'expression du gène cible dans les conditions contrôle et traitée est nulle, le $\Delta\Delta Ct$ tend vers zéro.

$$R = 2^{-0} = 1$$

Donc un $R = 1$ signifie qu'il n'y a pas de changement d'expression des gènes entre la condition traitée et le contrôle. Si $R > 1$ cela veut dire que le gène cible est plus exprimé vis-à-vis de la condition témoin et si $R < 1$, cela veut dire que le gène cible est moins exprimé, vis-à-vis de la condition témoin (Kocourkova et al 2011). Pour plus de restriction, nos résultats ont été notés comme significatifs quand le R est supérieur à 2 ou inférieur à 0.5.

Pour tous les gènes testés, l'efficacité d'amplification des oligonucléotides était proche de 1 (0.9-1.1) sauf pour le gène pdct, ce dont la formule tient compte : $R = 1.72^{-\Delta\Delta Ct}$.

VI. Mesure de l'expression protéique chez *A. thaliana*

L'expression des gènes n'est pas toujours reflétée par l'expression protéique. Il est donc intéressant de doser les protéines d'intérêt en parallèle d'une stratégie de qPCR. Notre travail s'est focalisé sur l'expression protéique des gènes npc4 et npc5 : des anticorps à façon ont été réalisés par la société Biotem et testés en Western Blot. Afin d'obtenir un contrôle positif sur ces blots de protéines, une production de NPC4 et NPC5 couplées à la MBP (Maltose Binding Protein) a été réalisée par clonage (utilisation d'anticorps anti-MBP). Des Western blot sur les lignées cellulaires KO et OE pour ces protéines ont également été entrepris (pour les lignées OE, les protéines étant couplées à la GFP, un anticorps anti-GFP a également été utilisé).

A. Production des protéines NPC4 et NPC5

1. Clonage dans pMAL-Cx2

Les séquences codantes de *NPC4* et *NPC5* sont amplifiées par PCR à partir d'ADNc. Les séquences sont clonées à la suite de celle de la protéine étiquette MBP, il n'est donc pas nécessaire de conserver le codon start de *NPC4* et *NPC5* (déjà présent sur la séquence de la MBP) mais il est impératif de cloner un codon stop. L'étiquette MBP permet de stabiliser la protéine de fusion ainsi que de la purifier sur résine d'amylose. Pour le mix PCR voir la page 84. Une PCR de 25 cycles est réalisée avec une étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, une étape d'hybridation de 45 secondes à 55°C et une étape d'élongation de 1.5 minute à 72°C. Les séquences amplifiées de *NPC4* et *NPC5* sont purifiées sur gel d'agarose 1% et sur mini-colonnes. La concentration d'ADN est dosée au nanodrop et le vecteur d'expression pMAL-Cx2 (NEB) ainsi que les inserts sont digérés 1.5h à 37°C par les enzymes de restrictions

PstI et Sal I (10 U.µL⁻¹, NEB) dans un mix de 20 µL : 1 µg de plasmide ou d'insert, 1 µL de chaque enzyme et 2 µL de tampon 10X NEB3. Les produits de digestion sont ensuite purifiés sur gel d'agarose 0.8% et sur mini-colonnes. Une ligation de 3h à température ambiante ou sur la nuit dans de la glace est effectuée entre le plasmide digéré et les inserts dans le mix de 10 µL suivant : 1 µL de ligase T4, 1 µL de tampon 1X et la quantité d'insert et de vecteur est ajustée suivant la formule : [quantité de vecteur (ng) x taille de l'insert (Kb) / taille du vecteur (KB)] x 3 = quantité (ng) d'insert à mettre dans la ligation.

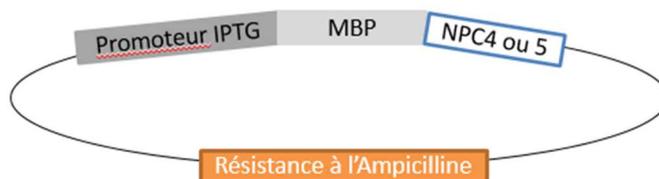


Figure 46 : Construction pMAL-Cx2-NPC4 ou NPC5. La protéine de fusion MBP-NPC4 ou 5 est sous contrôle du promoteur inductible à l'IPTG.

Le produit de ligation est transformé dans des bactéries *E. coli* (DH5α) thermo-compétentes et les clones positifs sélectionnés sur carbénicilline à 100 mg.mL⁻¹ suivant le protocole page 85. Les vecteurs sont amplifiés sur la nuit à 37°C à 135 rpm dans 2 mL de milieu LB et carbénicilline et purifiés sur mini-colonnes avant d'être envoyés au séquençage. Les vecteurs validés sont ensuite transformés dans la souche *E. coli* Rosetta pLysS (DE3) résistante au chloramphénicol (30 mg.mL⁻¹, Roth). Cette souche permet l'expression de protéines recombinantes d'origine eucaryote. Les clones positifs sont sélectionnés sur milieu LB carbénicilline et chloramphénicol.

2. Production des protéines recombinantes NPC4/5-MBP

a. Test de production

Les *E. coli* Rosetta DE3 contenant les constructions pMAL-Cx2-NPC4 et pMAL-Cx2-NPC5 sont placées en pré-culture sur la nuit dans 4 mL de milieu LB carbénicilline et chloramphénicol (37°C, 135 rpm). Les 4 mL de pré-culture sont utilisées comme inoculât pour une culture de LB carbénicilline + chloramphénicol de 50 mL. La DO est suivie jusqu'à que les cultures atteignent une DO égale à 0.5. La surproduction des protéines est induite par l'ajout de 0.4 mM d'IPTG (isopropyl-B-D-1 thiogalactoside, 100% DMSO, Roth) dans 40 mL de culture tandis que 10 mL sont gardés comme contrôle de production des protéines en absence d'induction. Les cultures sont incubées 2h à 37°C et 135 rpm puis centrifugées 20 minutes à 3 000 rpm à 4°C. 1 µL de culot des cultures induites et non induites est prélevé et re-suspendu dans du tampon d'extraction de protéine et du bleu de charge pour Western blot (voir p 116) et incubé 5 minutes à 95°C pour libérer les protéines présentes dans les bactéries. Un western blot est ensuite réalisé pour visualiser si les bactéries ont produit plus de protéines recombinantes en condition d'induction.

b. Production en grand volume

La production en grand volume de protéines recombinantes est identique à la section page 114, mis à part que la pré-culture est de 50 mL et la culture de 800 mL de milieu LB et qu'elles comprennent également de la carbénicilline, du chloramphénicol et 2 g.L⁻¹ de glucose. Quand la culture atteint une DO de 0.5, l'IPTG est ajouté et les bactéries sont laissées 2h à 37°C (ou pour une meilleure production 6h à 23°C). Après centrifugation des bactéries 20 minutes à 3 000 rpm et 4°C, les culots sont lavés dans 50 mL de NaCl à 0.9 g.L⁻¹ et encore une fois centrifugés 10 minutes à 3 000 rpm à 4°C. Les culots sont stockés à - 20°C ou à - 80°C pour du long-terme (*Nakamura et al 2005*).

c. Purification de protéines recombinantes avec une étiquette MBP

Les culots cellulaires sont repris dans 50 mL de tampon de lyse (20 mM de tris-HCL pH8, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA pH8, 1 mM de DTT (dithiothréitol) ainsi qu'un inhibiteur de protéase ajouté au dernier moment (Roche Complete, 1 tablette pour 50 mL)). Les membranes des bactéries sont ensuite détruites par sonication (sonificateur 500 W, Fisher Scientific): 1 minute de pulse intensité 30% (programme de 3 minutes comprenant des cycles de 1 seconde de pulse suivi de 2 secondes de pause). Le surnageant contenant les protéines est récupéré après une centrifugation de 20 minutes à 20 000 rpm à 4°C. En parallèle, la colonne d'élution est préparée : 2 mL de résine amylose sont déposés et équilibrés avec 10 volumes de tampon de lyse (sans ajout de protéase). L'extrait protéique est ensuite déposé sur la colonne à 4°C et la fraction non retenue récoltée. La colonne est rincée avec 12 volumes de tampon de lyse et les premiers 5 mL sont également récupérés : la partie MBP des protéines de fusion doit normalement lier l'amylose et rester sur la colonne mais un pourcentage peut être retrouvé dans la fraction non retenue et/ou les premiers lavages. Puis les protéines de fusion sont éluées avec 5 mL de tampon d'élution (tampon de lyse contenant l'inhibiteur de protéase et 10 mM de Maltose, Sigma) et récoltées par fraction de 500 µL à 1 mL. La concentration protéique de chaque fraction est dosée par la méthode Bradford (voir p 116). Pour déterminer qu'elle fraction contient la protéine d'intérêt, un western blot est réalisé avec un anticorps anti-MBP.

B. Extraction des protéines totales

Environ 200 mg de matériel végétal sont broyés avec un piston (cellules, cals) ou à l'aide d'un agitateur (feuilles) avec 3 à 5 billes de verre pendant 1 minute à 30 rotations.seconde⁻¹ (broyeur MM 300, Retsch). 75 µL de tampon d'extraction de protéine sont ajoutés (50 mM de tris-HCL pH 6.8, urée 8M, EDTA 1 mM et β-mercaptoéthanol 5% v/v) et le mélange agité pendant 30 secondes avant une incubation de 5 minutes à 65°C. Les étapes de mélange et d'incubation sont répétées trois fois, puis les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant contenant la partie protéique est récupéré et la concentration protéique est déterminée par Bradford.

1. Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est basée sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de coomassie G-250 en milieu acide après sa fixation sur les acides aminés.

Une gamme étalon est réalisée comprenant différentes concentrations de BSA (Bovin Serum Albumin, Roth) dans 1 mL de réactif de Bradford (Biorad) dilué au 1/5^{ème} et la DO mesurée l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Le dosage de la concentration protéique des échantillons est effectué selon la même méthode, par ajout de 2 µL d'échantillon à 1 mL de réactif de Bradford 1/5^{ème}. Les DO mesurées sont ensuite reportées sur la gamme étalon afin de déterminer la concentration des échantillons (*Bradford 1976*).

C. Western Blot

Les protéines extraites ou produites sont séparées par leur taille en conditions dénaturantes dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE : sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose, avant d'être révélées par des anticorps spécifiques primaires puis secondaires, ces derniers étant détectés par ECL (enhanced chemoluminescence).

1. Migration des protéines : SDS-PAGE

Pour chaque échantillon, 20 µg de protéines sont placées dans un tampon de charge bleu 1X (bleu 4X : 0.25 M de tris-HCL pH 6.8, 8 M de SDS, 40 M de glycérol, 0.04 M de bleu de bromophénol et 5 M de β-mercaptoéthanol) dans un volume final de 15 µL, complété avec du tampon d'extraction de protéine. Le SDS permet de linéariser les protéines et de les couvrir de charges négatives, tandis que le β-mercaptoéthanol est un agent réducteur qui casse les ponts disulfures. Afin de finir de dénaturer les protéines, ce mélange est incubé 5 minutes à 65°C.

Les protéines sont ensuite chargées dans un gel de polyacrylamide (voir composition **Figure 47**) avec un marqueur de taille Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Biorad). La migration s'effectue dans un tampon de migration (**Figure 47**), à voltage constant 80 V d'abord durant 30 minutes puis 1.5h à 2h à 100 V (ou 30 mA).

Matériel & Méthodes

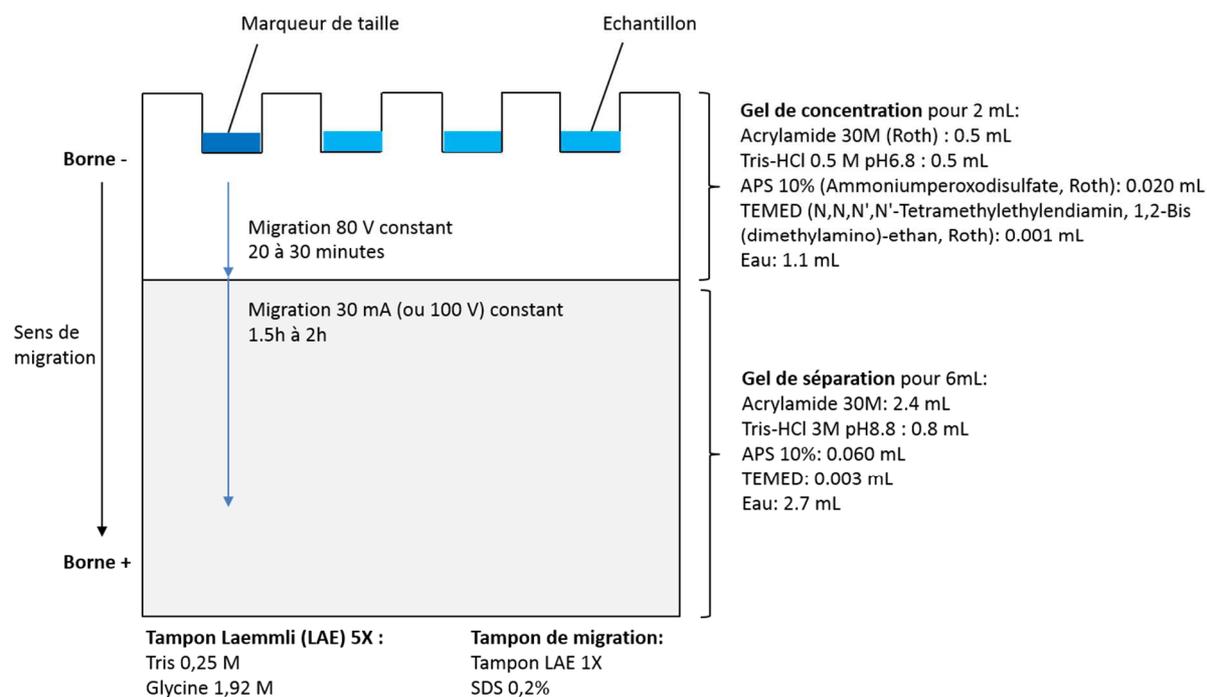


Figure 47 : Composition d'un gel SDS-PAGE.

2. Transfert des protéines

Le gel contenant les protéines est lavé dans du tampon de transfert : 5X Transfert Buffer (Biorad) et déposé sur une membrane de nitrocellulose. Un transfert dit "semi-sec" est effectué avec le Trans-Blot® Turbo™ Transfert System (Biorad), pendant 30 minutes à 1 A et 25 V puis pendant 10 minutes à 1.3 A et 25 V pour favoriser le transfert des protéines à haut poids moléculaires sur la membrane.

La membrane et le gel sont rincés deux fois 5 minutes dans de l'eau. La qualité du transfert des protéines du gel à la membrane est contrôlée par coloration. Le gel est coloré par incubation avec une solution de bleu de coomassie (bleu de coomassie R250 5 g.L⁻¹, 40% d'éthanol, 10% d'acide acétique, à filtrer) 1h avec agitation, puis une décoloration dans de l'eau sur la nuit. La membrane est colorée 2 minutes dans une solution de rouge ponceau (0.2% (p/v) de rouge ponceau et 3% (v/v) de TCA : acide trichloroacétique), puis décolorée par rinçage successif à l'eau pour visualiser les protéines. La membrane est ensuite totalement décolorée dans du TBS (tris-HCL 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM).

3. Incubation avec les anticorps : ECL

La membrane est saturée pour un minimum d'1h dans une solution de TBS-lait 5%. Les anticorps primaires ciblant les protéines NPC4 ou NPC5 (Biotem, respectivement 1/1500^{ème} et 1/500^{ème}), GFP (Living Colors® Full-Lenght GFP-Polyclonal Antibody, Clontech, 1/1000^{ème}) ou MBP (Anti-MBP Monoclonal Ab HRP Conjugated, NEB, 1/2000^{ème}) sont ensuite incubés sur la nuit à 4°C dans du TBS-lait 5%. Après trois rinçages de 5 minutes dans du TBS-lait 5%-

Tween 0.1%, les anticorps secondaires anti-lapin (Peroxidase–conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, 1/10000^{ème}) sont incubés 1.5h à 3h dans du TBS-lait 5%-Tween 0.1% et à température ambiante.

4. Révélation

Avant révélation, la membrane est rincée trois fois 10 minutes dans du TBS-Tween 0.1%. Elle est ensuite plongée 2 minutes dans la solution de révélation Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad). La HRP (Horseradish Peroxydase), couplée à l'anticorps secondaire catalyse la réaction d'oxydation du luminol présent dans la solution de révélation. Le composé oxydé émet de la lumière (428 nm) qui est détectée au ChemiDoc™ HP (Biorad) ou sur films photos sensibles (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare).

VII. Statistiques

Chaque expérience, que ce soit pour le modèle cellulaire *A. thaliana* ou le modèle de diatomée *P. tricornutum* ont été réalisées avec un minimum de 3 répliques biologiques. Excepté pour les expériences d'incubation avec des composés radioactifs qui sont égales respectivement à $n=2$ et $n=1$ pour l'acétate et le glycérol-3-phosphate. Suivant les expériences, des répliques techniques ont également été effectués, comme c'est le cas des analyses qPCR (triplicata) et des mesures au spectrophotomètre (duplicata).

Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel GraphPad Prism en utilisant un test de Student pour données non appariées avec un seuil de signification $\alpha = 5\%$.

Alternativement, pour les données considérées comme "petits échantillons" avec $n < 15$, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé avec le logiciel R ($\alpha = 5\%$). Les mesures sont alors exprimées avec la médiane et les quartiles, plutôt qu'en moyenne et écart-types.

Résultats

I. Induction de la production de TAG dans des cultures cellulaires issues de la plante modèle *A. thaliana*

Afin d'étudier les relations entre lipides membranaires et lipides de stockage chez les plantes, le modèle de culture cellulaire d'*A. thaliana* a été utilisé. Les cellules ont été soumises à un panel de traitements visant des cibles cellulaires différentes selon une stratégie de génétique chimique. Ces traitements ont été évalués pour leur capacité à arrêter la croissance cellulaire et à favoriser la production de TAG. Parmi eux, le méthotrexate s'est révélé être la molécule la plus efficace pour stopper la croissance cellulaire et en même temps promouvoir la production de TAG. En parallèle, une stratégie de limitation en nutriment, en l'occurrence une carence en azote a été testée sur les cellules. Cette condition est connue chez les microalgues où elle favorise une rapide accumulation de TAG. Des études -plus rares- ont également montrées un effet sur les végétaux supérieurs (*Abida et al 2015, Gaude et al 2007, Shimojima et al 2015*). Parce que les deux traitements MTX et carence d'azote impactent fortement les cellules au niveau du métabolisme des TAG, nous avons choisi de les étudier de manière approfondie.

Ces expériences de modulation de la croissance cellulaire ont également mis en évidence une relation entre vitesse de croissance et taux d'insaturations des acides gras chez le modèle cellulaire d'*A. thaliana*. Ces résultats ont fait écho à des données précédemment obtenues au sein de l'équipe et ont permis la publication en 2015 dans la revue *Scientific Reports* de l'article "*Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures.*"

A. Corrélation entre vitesse de croissance cellulaire et insaturations des acides gras

La vitesse de croissance des cultures cellulaires végétales peut varier et ces variations dépendent de plusieurs paramètres. Ainsi, l'inoculât de départ au moment du repiquage peut varier de $\pm 10\%$, ce qui peut occasionner une différence significative de la masse cellulaire produite au cours de la croissance. Les variations dans la composition du milieu, l'éclairage, la température de la pièce de culture peuvent également affecter de manière non maîtrisée la vitesse de croissance, bien que les conditions de cultures standardisées dans lesquelles les expériences sont effectuées tendent à diminuer leur impact.

Au laboratoire, en étudiant le métabolisme des glycérolipides sur ces modèles, nous avons remarqué que quel que soit la culture cellulaire végétale utilisée, la vitesse de croissance des cellules influe sur le taux de désaturation des acides gras.

Les cultures cellulaires provenant du méristème de mésophile d'*Arabidopsis thaliana* sont un système mixotrophe, possédant un chloroplaste dont les thylakoïdes sont peu développés. Les cultures de call provenant du méristème d'*A. thaliana* ainsi que les cultures de cellules souches de l'érable sycomore (*Acer Pseudoplatanus*) sont quant à elles strictement hétérotrophes. Pour cette raison, ces cultures cellulaires possèdent une majorité de phospholipides, représentant 80% des glycérolipides totaux, les galactolipides ne

représentant que 10 à 20% du total. De plus, 70% environ des acides gras totaux sont des espèces C18, les espèces polyinsaturés 18:2 et 18:3 représentant environ 55%. Comme ces systèmes possèdent peu de galactolipides, la majorité des insaturations est effectuée par le couple de désaturases eucaryotes FAD2/3 plutôt que par les désaturases FAD6/7 retrouvées dans les chloroplastes.

Pour mettre en évidence la relation entre vitesse de croissance cellulaire et insaturations des acides gras, nous avons comparé des cultures de cellules d'érable avant et après repiquage et trois ans de données sur les cultures cellulaires d'*A. thaliana*, ces cultures cellulaires présentant un taux de croissance "lent" ou "rapide". Nous avons également placé des cultures de cals d'*Arabidopsis* en carence de phosphate pour ralentir de manière artificielle le taux de croissance de la culture. Dans toutes les cultures où la croissance cellulaire est lente, nous avons observé un enrichissement en acides gras 18:3 au détriment des espèces 18:1. Ces changements sont visibles au niveau de tous les phospholipides et principalement au niveau de la PC et de la PE. Au contraire, le taux d'insaturation des acides gras des molécules de TAG est peu impacté par la vitesse de croissance, ce qui démontre que les PUFAs sont préférentiellement adressés aux TAG. Le profil en acides gras des galactolipides, lipides membranaires mineurs de ces cellules n'est pas non plus affecté ce qui montre que les désaturases FAD6/7 sont peu sensibles aux variations de croissance comparé à FAD2 et FAD3. Ainsi, il semble que les désaturases FAD2/3 aient une activité limitante lorsque l'expansion membranaire est rapide.

Les résultats sont détaillés et commentés dans l'article "*Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures.*" *Scientific Reports*, 2015.

NB : Les figures et les références bibliographiques de cet article sont numérotées et classées de manière indépendante au reste du corps de texte de ce manuscrit.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures

Received: 24 June 2015
Accepted: 21 September 2015
Published: 15 October 2015

Coline Meï*, Morgane Michaud*, Mathilde Cussac, Catherine Albrieux, Valérie Gros, Eric Maréchal, Maryse A. Block, Juliette Jouhet & Fabrice Rébeillé

In higher plants, fatty acids (FAs) with 18 carbons (18C) represent about 70% of total FAs, the most abundant species being 18:2 and 18:3. These two polyunsaturated FAs (PUFAs) represent about 55% of total FAs in *Arabidopsis* cell suspension cultures, whereas 18:1 represents about 10%. The level of PUFAs may vary, depending on ill-defined factors. Here, we compared various sets of plant cell cultures and noticed a correlation between the growth rate of a cell population and the level of unsaturation of 18C FAs. These observations suggest that the final level of PUFAs might depend in part on the rate of cell division, and that FAD2 and FAD3 desaturases, which are respectively responsible for the formation of 18:2 and 18:3 on phospholipids, have limiting activities in fast-growing cultures. In plant cell culture, phosphate (Pi) deprivation is known to impair cell division and to trigger lipid remodeling. We observed that Pi starvation had no effect on the expression of *FAD* genes, and that the level of PUFAs in this situation was also correlated with the growth rate. Thus, the level of PUFAs appears as a hallmark in determining cell maturity and aging.

Glycerolipids are major components of the membrane architecture. These acyl-lipids are diester of fatty acids (FAs) and glycerol, and the FA moieties can be either saturated or unsaturated. In higher plants, the main species of FAs are 16C and 18C, representing respectively about 30 and 70% of total FAs¹. These FAs are present with various saturation levels, generally displaying none (16:0, 18:0) to three (16:3, 18:3) double bonds for the main species. The most abundant FA species are 18:2 and 18:3, representing about 80% of 18C and nearly 55% of total FAs in *Arabidopsis* cell suspension cultures, whereas 18:1 represents about 10% of total FAs¹.

Desaturation of 18:0 to 18:1 is catalysed by a soluble desaturase in the stroma using 18:0-ACP as substrate, and a still poorly characterised membrane bound desaturase in the cytosol using 18:0-CoA as substrate². Desaturations of 18:1 to 18:2 then 18:3 are catalysed by four integral membrane FA desaturases (FAD)^{2,3}. In plastids, these two sequential reactions are catalysed by FAD6 (an ω -6 desaturase) and FAD7 (an ω -3 desaturase) and the desaturation reaction occurs on the acyl linked to the membrane lipid, mono- or digalactosyl diacylglycerol (MGDG or DGDG), phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol⁴. In the endoplasmic reticulum (ER), equivalent reactions are respectively catalysed by FAD2 and FAD3 on phospholipids^{3,5,6}. A recent study has shown that FAD6 and FAD7 on the one hand, and FAD2 and FAD3 on the other hand, can physically associate via protein-protein interactions, providing a metabolic channeling from 18:1 to 18:3⁷. In such a situation 18:2 would not be released as an intermediary product, and therefore should be kept low in the whole FA composition. Since it is apparently not the case, at least in *Arabidopsis*^{8,9}, it is possible that the two desaturases also operate independently, or that FAD2 or FAD6 are in excess compared to FAD3 or FAD7 respectively. In the endoplasmic reticulum, phosphatidylcholine (PC) plays a major role in these reactions because it is the site of 'acyl editing', a

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Unité mixte de recherche 5168 CNRS – CEA – INRA – Université Grenoble Alpes, Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.R. (email: fabrice.rebeille@cea.fr)

process involving desaturation of the acyl groups followed by a rapid deacylation-reacylation cycle that exchanges FAs from PC with FAs from the acyl-CoA pool¹⁰. Through this cycle, 18:1-CoA is attached to PC by a lyso-phosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT), before its conversion to 18:2 and 18:3 by FAD2 and FAD3. These PUFAs are thereafter released from PC in the acyl-CoA pool by phospholipase A cleavage/acyl-CoA synthetase or the reverse action of LPCAT, to be eventually available for additional glycerolipid syntheses. The rate of this cycle has been estimated to be significantly higher than the rate of FA synthesis in developing soybean embryos, which should limit the accumulation of relatively saturated membrane lipid species¹¹.

Unsaturated fatty acids play key roles in membrane structure and function. Indeed, the degree of saturation not only impacts the physicochemical characteristics of the FA, such as the melting point or the viscosity¹², but also the molecular shape of the lipid to which it is attached¹³. This, in turn, influences the membrane lipid behavior and the bilayer packing. For instance, saturated phosphatidylethanolamines (PE) form a lamellar phase whereas unsaturated PE form a hexagonal HII (inverted non lamellar) phase^{14,15}. Consequently, the enzymes involved in the formation of unsaturated fatty acids, play major roles in membrane formation, function and integrity.

In addition, the unsaturated level of FAs in plants may vary, at least in a certain range, in response to different environmental situations. Related to the fact that FAD desaturations are oxygen-dependent reactions, it has been observed that the aeration conditions, i.e. the concentration of dissolved oxygen in the cytosol, affect the FA unsaturation pattern of lipids^{16,17}. From a physiological point of view, desaturases are also important to maintain cellular function and plant viability in specific conditions, such as cold⁹ or salt¹⁸ stresses. Cold-induced change of the FA unsaturation level is well documented and is generally explained by the fact that freezing tolerance requires a higher unsaturation level to keep a correct membrane fluidity^{9,19}. As an example, a *fad2* mutant could not grow, and subsequently died when cultured at a low temperature (6 °C), indicating that PUFAs are essential to maintain cellular viability in cold conditions²⁰. In addition to transcriptional controls^{5,18}, post-translational regulations of these desaturase activities might also contribute to adjust the desaturation level in plants. From this point of view, it was shown that FAD2²¹ and FAD3²² are less subjected to degradation at low temperatures, a process controlled by the proteasomal pathway that might play a role in this adaptative response.

Beside these known environmental effects on the unsaturation level of FAs, other ill-defined factors may alter the level of PUFAs. This is apparent with cell suspension cultures where the extent of PUFAs may vary from one culture to another, making the comparison of results sometimes difficult. In an attempt to better understand what triggers such variations, we measured the impact of growth rate upon the distribution of PUFAs in our plant models. Using cell suspension cultures that mainly contain phospholipids, we observed a correlation between the growth rate and the level of unsaturation of 18C FAs, suggesting that FAD2 and FAD3 desaturases might have limiting activities in fast growing cultures and that the final level of unsaturation might also depend on the rate of division of the plant cell population.

Results

To study lipid metabolism in higher plants, three models of cell suspension cultures were used: stem cells of *Acer pseudoplatanus* (Sycamore), leaf meristem cells of *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) and callus cultures of meristem cells of Arabidopsis. In these cultures, membrane lipids are mainly phospholipids (80 to 90%) with only low amount of galactolipids (10 to 20%)²³. Indeed, these cells are growing either heterotrophically (Sycamore cells, Arabidopsis calli) or mixotrophically (Arabidopsis cells) and display only amyloplasts (Sycamore cells and Arabidopsis calli) or poorly developed thylakoid membranes with low amount of chlorophyll (Arabidopsis cells). This suggests that PUFAs in our plant models are mostly generated by the FAD2/FAD3 system in the ER, with a minor but significant contribution of the FAD6/FAD7 couple in plastids. This composition is highly different in leaves where galactolipids represent more than 60% of glycerolipids²⁴, suggesting that FAD2 and FAD3 might not be the main providers of PUFAs in these tissues.

When using higher plant cell suspension cultures, there are variations in the growth rate, even in standard controlled conditions, which makes it sometimes difficult to compare cultures that grew at different periods. There is no clear explanation to these fluctuations, although it is likely that slight changes in the density of the initial inoculum, which can vary in the range of plus or minus 10%, may impact the growth rate by modulating the length of the initial lag phase of the culture cycle. However, these variations might also be a source of information, and we looked for a possible correlation between the growth rate and the variability of the FA unsaturation level we often observed in these cultures. In the representative experiment shown in Fig. 1, Sycamore cells displayed alternatively slow and rapid periods of growth as estimated through the variations of either the fresh weight or the dry weight. At the beginning of the experiment, just after the transfer in a new medium, cells were dividing rather slowly during the initial lag phase, then more rapidly during the exponential phase of growth, then slowly again during the second lag phase following the second transfer and dilution into a fresh medium (Fig. 1A). During these growth phases, the amount of lipids increased roughly in parallel with the biomass. The profile of FAs was determined along the culture period (Fig. 1B). 18C, but not 16C, FA species displayed significant changes during the exponential phase of growth: 18:3 and to a lower extent 18:2 decreased

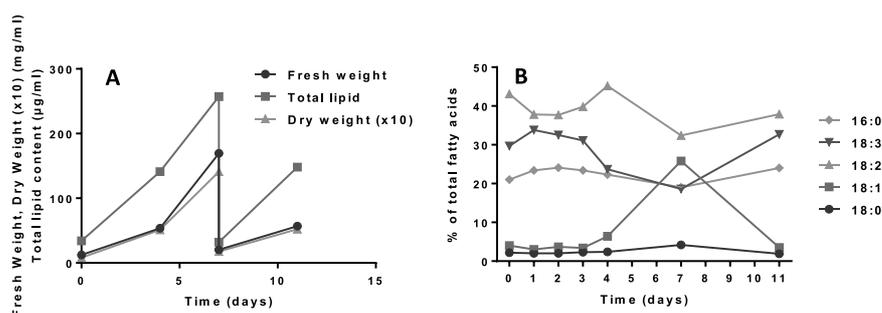


Figure 1. Fresh weight and dry weight evolutions and lipid distribution in Sycamore cells during the course of a culture cycle. (A) representative experiment showing the fresh weight and the lipid content evolutions after the transfer of the cells in a fresh media. At day 7, an aliquot of the cell suspension was transferred in a new fresh media for a new cycle of growth. Each day, an aliquot was withdrawn for fatty acid analyses. (B) main FA distribution in Sycamore cells cultivated as shown in (A).

whereas 18:1 strongly increased, suggesting that the rate of desaturation of 18:1 was reduced during the fast-growing period.

We therefore sought to correlate in *Arabidopsis* the growth rate in standard complete medium with the 18C unsaturation level, exploiting the variability that occurs between different culture cycles. In Fig. 2A,B, we plotted the unsaturated level of 18C versus the growth rate for more than 10 different cultures grown in the same environment and harvested 3 days after renewing the media. We observed a significant correlation between the growth rate and the proportions of 18:1 and 18:2+18:3: with higher growth rates there were higher levels of 18:1 and lower levels of 18:2+18:3. Detailed analyses of the lipid composition in fast growing and slow growing cell cultures show that slow growing cells displayed 25–30% less lipids, but an unchanged distribution of the main glycerolipids (Fig. 2C,D). However, the levels of 18:1 and PUFAs were modified in PC and PE as it was observed in the total FA analysis (Fig. 2E). Diacylglycerols (DAGs) also were affected but not triacylglycerols (TAGs), suggesting that the synthesis of TAGs from DAG backbones favor PUFA rich species. The fact that DAG and PC were similarly affected illustrates the dynamic acyl exchange between these two lipids via the phosphatidylcholine:diacylglycerol choline phosphotransferase (PDCT). Together with acyl editing, this process might also play a central role in the regulation of glycerolipid desaturation²⁵. Interestingly, the PUFA levels in galactolipids (MGDG and DGDG) did not change between the two situations, although the DGDG level of 18:1 was slightly increased in the fast growing condition. This slight increase could result from a eukaryotic origin of the glycerol backbone, since a fraction of the DGDG molecules are formed from ER-derived DAGs²⁶. Altogether, these results suggest that the FAD6/FAD7 system was less impacted in fast growing cells than FAD2/FAD3.

To confirm the relationship between desaturation of 18:1 and growth rate, we compared the FA profile of *Arabidopsis* calli grown in liquid suspension either in the presence or in the absence of Pi (Fig. 3). As previously observed²³, phosphate starvation induced a significant reduction of the growth rate (Fig. 3A,B) associated with lipid remodeling, as shown by a fourfold increase of DGDG and a 20% decrease of phospholipids (Fig. 3D). Indeed, plants adapt to such a situation by replacing part of their phospholipids by galactolipids, mainly DGDG. Despite these changes, phospholipids in Pi-deprived calli still represent more than 60% of all glycerolipids. In our conditions (no more than 8 days of Pi starvation), there was a decrease of the total FAs content and no accumulation of TAG (Fig. 3C,D). TAG accumulation is a late response to strong Pi deprivation in higher plants²⁵ and microalgae²⁷, seen after 13 days or more of Pi starvation. As for *Arabidopsis* cell suspension cultures, there was a significant correlation between the growth rate (limited or not by the absence of Pi) and either the level of 18:1 or the level of PUFAs (18:2+18:3), both levels varying in opposite directions (Fig. 3A,B). Detailed analyses of the lipid composition between control and Pi-starved cultures show that the main phospholipids were affected in their 18:1 and PUFA compositions (Fig. 3E). Here again, low rates of growth (Pi-starvation) induced an increase of PUFAs in phospholipids and DAGs, whereas these effects were attenuated in TAGs (Fig. 3E). The striking difference arises from galactolipids which play a central role in this low-Pi-induced lipid remodeling. Indeed, the synthesis of DGDG during Pi starvation is mainly achieved at the surface of plastids by MGD2/MGD3 and DGD2 enzymes^{26,28}, through a transitory pool of MGDG. MGD2 and MGD3 preferentially use DAG backbones from the ER-derived pathway, probably arising from phospholipid degradation²⁹. Thus, the pool of MGDG in the Pi-limiting situation is a mixture of molecules with glycerol backbones originating from both the prokaryotic and the eukaryotic pathways, which might explain the observed changes in the unsaturation level (decrease of 18:1 and increase of PUFAs, Fig. 3E). Although the unsaturation level of DGDG did not appear to be modified, it must be kept in mind that the FA composition in DGDG is quite different in the two situations²³. In Pi-starved cultures, but not in control cultures, DGDG is mainly built from DAG backbones originating from PC²⁹, and so its FA

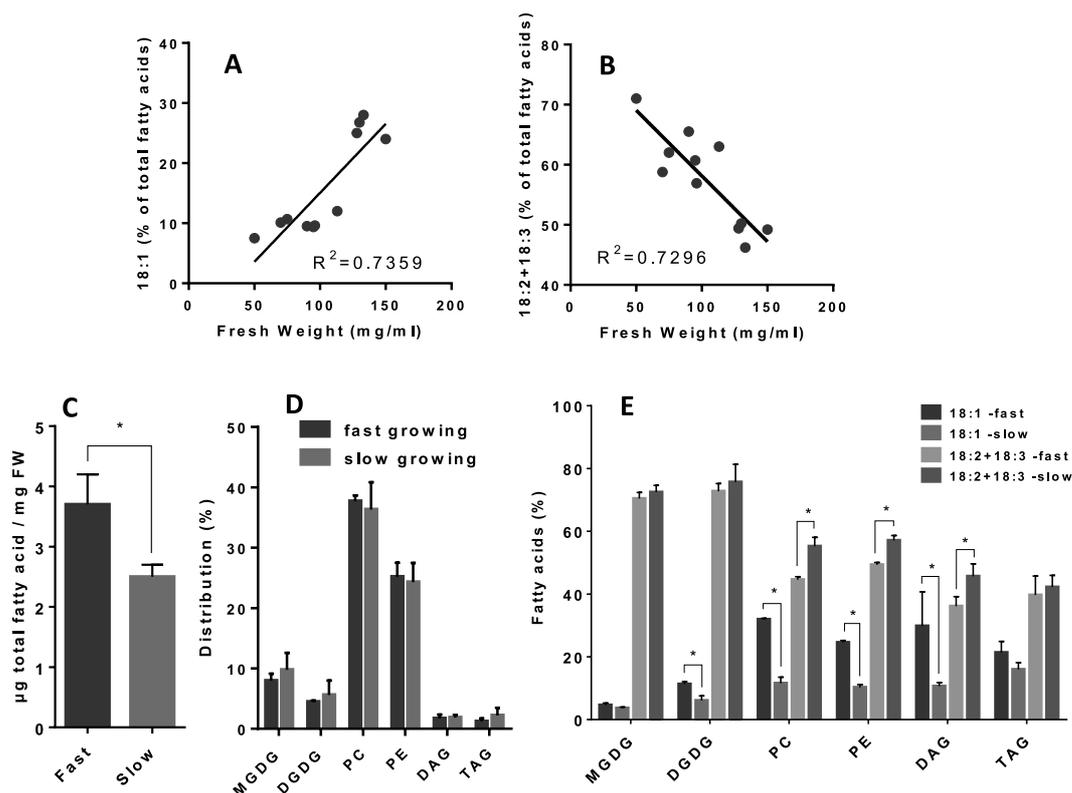


Figure 2. Correlation curves between the growth rate of *Arabidopsis* cells and the unsaturation levels of 18C FA species. (A) correlation curve between the proportion of 18:1 and the fresh weight of cell suspensions measured after 3 days of culture. (B) correlation curve between the proportion of PUFAs (18:2+18:3) and the fresh weight of cell suspensions measured after 3 days of culture. The initial fresh weight at the beginning of the experiment was 30 ± 5 mg/ml for each culture. Correlation factors R^2 were calculated by linear regression using GraphPad Prism software. (C) total amount of FAs in either fast or slow growing cells. (D) distribution of the main polar glycerolipids (MGDG and DGDG for main galactolipids; PC and PE for main phospholipids), and neutral lipids (DAG and TAG) in fast and slow growing cells. (E) proportion of 18:1 and PUFAs in major glycerolipids (MGDG, DGDG, PC and PE) and in neutral lipids (DAG and TAG) from either fast or slow growing cells. The data are means \pm SD of three biological repeats for each condition. Statistical significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by a multiple t test using GraphPad Prism software.

composition resembled much the one of PC (Fig. 4A). This is not the case when fast and slow growing cell suspension cultures are compared (Fig. 4B), indicating that changes in the FA composition in MGDG and DGDG were a direct consequence of Pi deprivation. This is a complex situation, not yet fully understood, and it is still not known how extraplastidial DGDG is metabolized and if it is edited as PC is.

Similar effects of Pi starvation were also seen in cell suspension cultures. Indeed, as shown in Fig. 5A, *Arabidopsis* cells grown in a medium devoid of Pi for 80 h exhibited higher 18:2+18:3 and lower 18:1 contents, supporting the above results. To check whether the increase of PUFAs in Pi-deficient cells could be attributed to an increase of *FAD* expression, we measured the effect of Pi starvation on *FAD2*, *FAD3*, *FAD6* and *FAD7* transcript levels. No difference in *FAD* expression levels could be observed between the two growth conditions (Fig. 5B), indicating that Pi starvation did not impact the expression of these four genes, as previously observed³⁰. These results suggest that the rate at which FAs were desaturated was slower than the rate at which cells divided and lipids were synthesised, at least in fast growing conditions. In other words, desaturase activities (essentially *FAD2* and *FAD3*) leading to 18:3 from 18:1 were probably limiting, and the final level of unsaturation could partly depend on the rate of FA synthesis and membrane turnover.

Discussion

The analyses presented here strongly suggest that a negative correlation occurs between the growth rate of a plant cell culture and the level of PUFA (18:2+18:3). In fast-growing tissues (calli) or in highly dividing cells (cell suspension cultures), the proportion of PUFA is lower than in slow growing ones. It is noteworthy that phospholipids were the main lipids affected by these changes, which points out a particular sensitivity of the *FAD2*/*FAD3* system to the growth condition. It is difficult to draw conclusions about

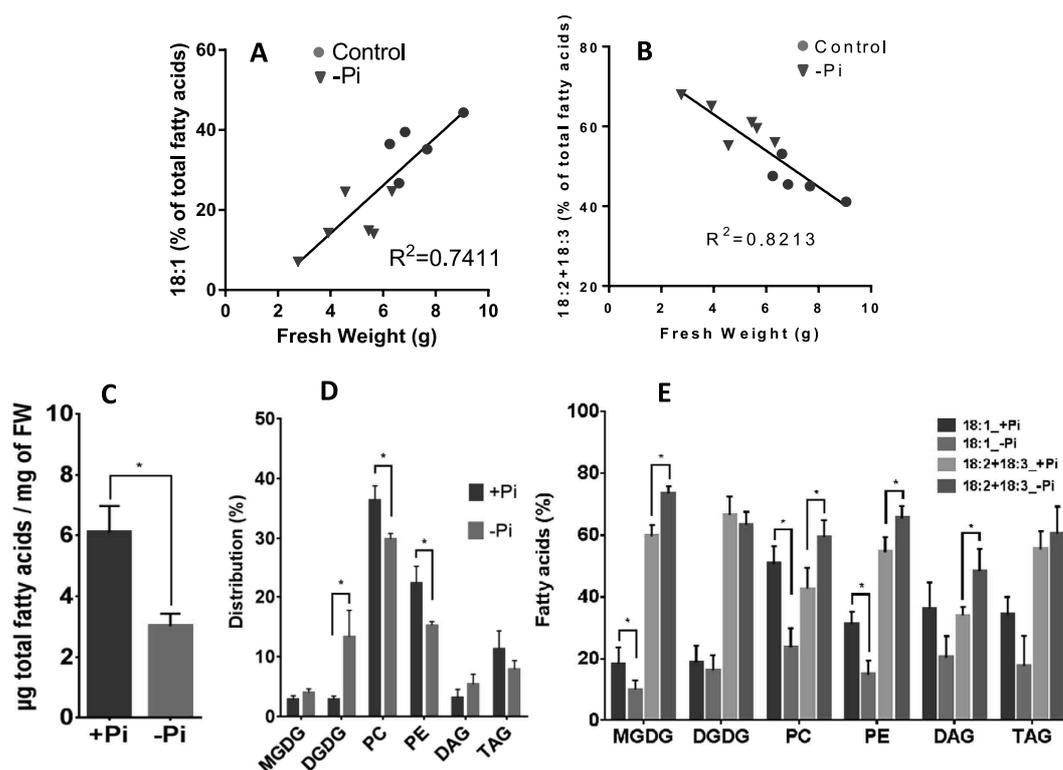


Figure 3. Correlation curves between the growth rate of *Arabidopsis* calli grown in a control medium or in a medium devoid of Pi and the unsaturation levels of 18C FA species. Fresh weight and fatty acid distribution were measured after 8 days of growth. The initial fresh weight was 1.5 ± 0.2 g for each culture. (A) correlation curve between the proportion of 18:1 and the fresh weight of *Arabidopsis* calli. (B) correlation curve between the proportion of PUFAs (18:2+18:3) and the fresh weight of *Arabidopsis* calli. Correlation factors R^2 were calculated by linear regression using GraphPad Prism software. (C) total amount of FAs in cultures grown either in presence or in absence of Pi. (D) distribution of the main polar glycerolipids (MGDG and DGDG for main galactolipids; PC and PE for main phospholipids), and neutral lipids (DAG and TAG) in cultures grown either in presence or in absence of Pi. (E) proportion of 18:1 and PUFAs in major glycerolipids (MGDG, DGDG, PC and PE) and in neutral lipids (DAG and TAG) from cultures grown either in presence or in absence of Pi. The data are means \pm SD of three biological repeats for each condition. Statistical significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by a multiple t test using GraphPad Prism software.

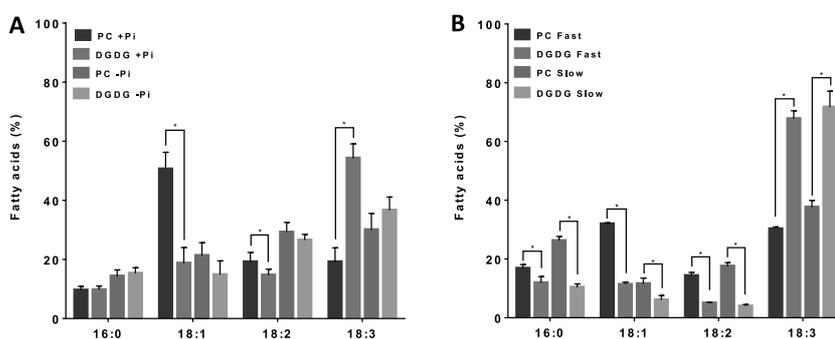


Figure 4. FA distribution in PC and DGDG. Detail distribution of FAs of PC and DGDG in *Arabidopsis* calli grown with (+Pi) or without (-Pi) phosphate (A) or in *Arabidopsis* cell suspension cultures displaying fast or slow growing rates (B). The data are means \pm SD of three biological repeats for each condition. Statistical significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by a multiple t test using GraphPad Prism software.

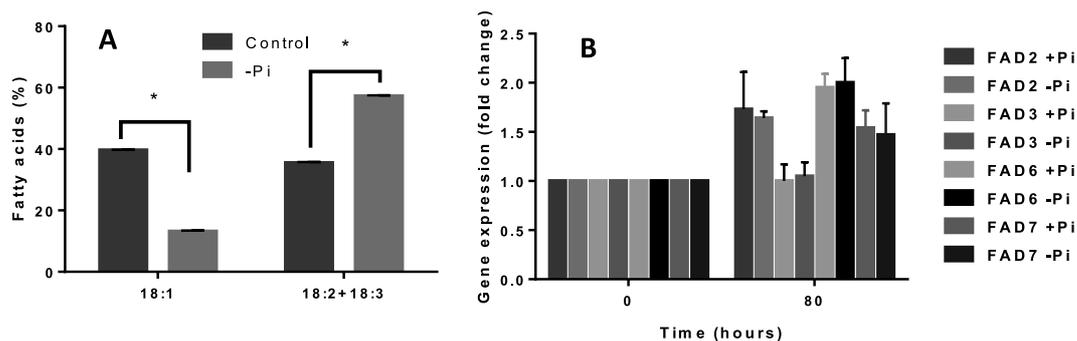


Figure 5. Effect of a Pi deficiency on the expression levels of FAD2, FAD3, FAD6 and FAD7 genes in Arabidopsis cell suspension cultures. (A) 18:1 and PUFA (18:2+18:3) distributions in cells cultivated for 80 h in control medium or in a medium devoid of Pi. (B) qPCR determination of the expression levels of FADs in cells grown for 80 h either in a control medium or in a medium devoid of Pi. Results are expressed as fold changes versus the initial control conditions. The data are means \pm SD of three biological repeats for each condition. Statistical significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by a multiple t test using GraphPad Prism software.

the FAD6/FAD7 system because galactolipid remodeling in the Pi-starved situation is rather complex and involves an increased recruitment of glycerol backbones from an ER origin. However, the experiments with the fast and slow growing cell suspension cultures suggest that FAD6/FAD7 were less affected by the growth rate. Whether this difference results from the low amount of plastidial lipids present in our plant model remains an open question.

It might be possible that in situations where membrane syntheses and/or turnover are fast, the activities of FAD2/FAD3 are not high enough to match phospholipid synthesis and editing, leading to 18:1 accumulation in membrane lipids. In developing soybean embryos it was shown that the rate of PC editing was higher than the rate of FA synthesis¹¹. However the rate of lipid synthesis in soybean is slow compared to other oilseed plants¹¹ and the situation may differ in other plants. When considering a whole plant, the situation may also vary from one tissue to another, depending on the dividing activity of the tissue. In the cell cultures analysed here, the amount of 18:1 dropped when the rate of division decreased (see Fig. 1) indicating that FAD activities were not or less limiting in this condition.

These results also indicate that the level of unsaturation can fluctuate from one culture to another, these variations resulting from even small differences in the growth rate. Thus, every treatment that impacts the growth rate or cell division could affect the unsaturation level, unless it also affects the rate of lipid synthesis and/or the expression or regulation of FADs. In Pi-limited higher plants, growth and FA production are strongly reduced²³. Pi limitation did not affect the gene expression of FAD2, FAD3, FAD6 and FAD7, and the calculated correlation factors between the global unsaturation level and the growth rate were similar to those obtained in complete medium growth conditions (compared Fig. 2 and 3). Thus, this study suggests that the desaturation of lipids by FAD2 and FAD3 in fast dividing systems might not reach a steady state and might be subjected to variations dictated by the growth rate. The *in vivo* correlation between FAD2/FAD3 activities and cell proliferation rates is therefore also defining the level of PUFAs as a hallmark of cell maturity and aging in plants.

The question of how these desaturases are operating and are regulated *in vivo* remains open. Interestingly, in these experiments we often observed less variation with 18:2 than with 18:1 and 18:3 (see Fig. 1B). Indeed, with Arabidopsis calli and cell suspension cultures there was no significant correlation between the proportion of 18:2 and the growth rate, in contrast to what is observed with 18:1 and 18:3 (Fig. 6A,B). The fact that the proportion of 18:2 fluctuates less than the proportions of 18:1 and 18:3 supports either the hypothesis of a channeling from 18:1 to 18:3 where 18:2 is not systematically released in the bulk medium, or the hypothesis of a limiting activity of FAD2 compared to FAD3. In the first hypothesis, if channeling is the major process for 18:1 desaturation, the 18:2 level should remain quite low, unless FAD2 is in excess compared to FAD3. In our models, 18:2 is not maintained at a low level since in non-photosynthetic Sycamore cells and in Arabidopsis cells it represents respectively 40% and 10–15% of total FAs. Otherwise, if the two desaturases operate independently, it is also possible that FAD2 activity is more limiting than FAD3 activity, as it was suggested for Flax³¹. It is clear that a better knowledge of the stoichiometry and the kinetic parameters of these two enzymes would help to better understand how these PUFAs equilibrate and fluctuate in plant cells.

Methods

Cell cultures. *Acer pseudoplatanus* cells were grown as suspension cultures in a medium previously defined³². Cells were maintained as 250 ml cultures on a vertical rotational shaker (125 rpm) at 22 °C.

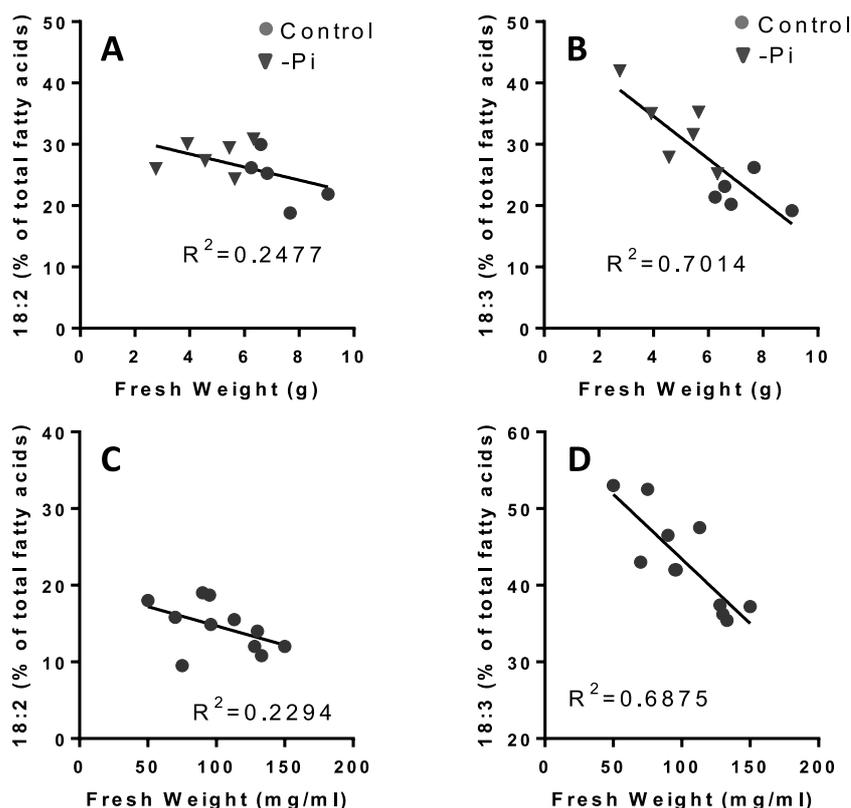


Figure 6. Relationships between the growth rate of *Arabidopsis* calli or *Arabidopsis* cells and the distribution levels of 18:2 and 18:3. (A) correlation curve between 18:2 and fresh weights of calli grown in liquid medium with or without Pi. (B) same as A, but for 18:3. The initial fresh weight was 1.5 ± 0.2 g for each culture and the biomass evolution was measured after 8 days of growth. (C) correlation curve between 18:2 and fresh weights of cell suspension cultures. (D) same as C, but for 18:3. The biomass was measured after 3 days of culture, and the initial fresh weight at the beginning of the experiment was 30 ± 5 mg/ml. Correlation factors R^2 were calculated by linear regression using GraphPad Prism software.

Cells were subcultured every 7 days, as previously described²³. At each time point, about 0.4 g of cells were collected, filtered to remove the medium, weighted and frozen in liquid nitrogen for lipid analyses.

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) cells were grown as suspension cultures (200 mL) in Murashige and Skoog medium (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA) devoid or not of phosphate (Pi), and supplemented with 1.5% (w/v) sucrose, 1.2 mg l^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, potassium phosphate monobasic 50 mg l^{-1} , and potassium phosphate dibasic 39 mg l^{-1} . Cultures were kept under continuous light ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) at 22°C , and agitated with rotary shaking at 125 rpm. Cells were subcultured every 7 days with an initial cell density of 30 mg mL^{-1} . At each time point, about 0.5 g of cells were collected, filtered to remove the medium, weighted and frozen in liquid nitrogen for lipid analyses.

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) calli were obtained from mesophyll tissue of two week old *Arabidopsis* rosette leaves, and grown on agar plates containing Murashige and Skoog medium (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA) supplemented with 3% (w/v) sucrose, 1.2 mg L^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, potassium phosphate monobasic 50 mg l^{-1} , and potassium phosphate dibasic 39 mg l^{-1} . For each experiment, about 1.5 g of calli were withdrawn from the agar plate and suspended in liquid Murashige and Skoog medium devoid or not of Pi (Caisson Laboratories, Inc, USA), supplemented with 1.5% (w/v) sucrose and 1.2 mg l^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. At each time point, aliquots were collected from the callus suspension cultures, filtered to remove the medium, and the calli were weighted and frozen in liquid nitrogen for lipid analyses.

Lipid analyses. Freeze-dried cells were suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 minutes to prevent lipid degradation, and lipids were extracted by addition of 2 mL methanol and 8 mL chloroform at room temperature²⁷. The mixture was then saturated with argon and kept for 1 hour at room temperature. After filtration through glass wool, cell debris were rinsed with 3 mL chloroform/methanol 2:1, v/v, and 5 mL of NaCl 1% were then added to the filtrate to initiate biphasic formation. The chloroform phase was collected and dried under argon before solubilizing the lipid extract in pure chloroform. Total glycerolipids were quantified from their FAs after transformation as methyl esters (FAME), and analysed by a gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) (Perkin Elmer) on a BPX70 (SGE) column, as

thoroughly described elsewhere²⁷. FAME were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma) and quantified by the surface peak method using 15:0 for calibration. Extraction and quantification were performed from at least 3 biological repeats. To quantify the various classes of glycerolipids, lipids were separated by thin layer chromatography (TLC) onto glass-backed silica gel plates (Merck) using two distinct resolving systems for polar and neutral lipids, as previously described²⁷. Lipids were then visualized under UV light, after spraying with 2% 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid in methanol, and scraped off the plate. Lipids were recovered from the silica powder after addition of 1.35 mL chloroform:methanol 1:2 v/v, thorough mixing and addition of 0.45 mL chloroform and 0.8 mL H₂O and collection of the chloroform phase³³. Lipids were then dried under argon and quantified by methanolysis and GC-FID as described above.

qPCR. Real-time quantitative RT-PCR experiments were performed using cDNA synthesised from total RNA isolated from control and treated Arabidopsis cells (Reverse-it first strand synthesis kit, ABgene). Amplification of contaminating DNA was prevented by DNase treatment of RNA samples. Specific primer sequences designed for *FAD2* (At3g12120), *FAD3* (At2g29980), *FAD6* (At4g30950) and *FAD7* (At3g11170) genes were: GCC TTG GTA TAG AGG CAA GGA ATG G (*FAD3*, Fw); TGC TTT CGT GGG GTC GAC CA (*FAD3*, Rv); CAA TGA CCG AGA ACG CCT CC (*FAD2*, Fw); GGC AAC GAG GGA TGA GTG TG (*FAD2*, Rv); TCT GCT ACC GTT GGC TTG GC (*FAD6*, Fw); TTT TGG CGT GAT GGC GGT CGT (*FAD6*, Rv); CGA CCT CTC CCC AGA ATC TAC ACA (*FAD7*, Fw); GGT GTG CTC ACA TTC AAC GCC CA (*FAD7*, Rv). The real-time PCR reactions were carried out on a Rotor-Gene 3000 instrument (Corbett Research) using SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich). Quantification of gene expression was performed using the comparative C_T method with the Rotor-Gene 3000 Software. Each data were normalised with 3 reference genes chosen for their absence of variation in Pi limiting conditions (*ACT8* -At1g49240; *UBQ10* -At4g05320; *TIP41-like* -At4g34270). The amplification efficiencies of these oligo pairs was close to 1 (0.9–1.1). Each value represents the average of three biological repeats, each repeat being analysed in triplicate. Statistical analyses were done using GraphPad Prism software.

References

- Tjellstroem, H., Yang, Z., Allen, D. K. & Ohlrogge, J. B. Rapid kinetic labeling of Arabidopsis cell suspension cultures: implications for models of lipid export from plastids. *Plant Physiology* **158**, 601–611 (2012).
- Shanklin, J. & Cahoon, E. B. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 611–641 (1998).
- Dolch, L. J. & Marechal, E. Inventory of fatty acid desaturases in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Drugs* **13**, 1317–1339 (2015).
- Joyard, J. *et al.* Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **49**, 128–158 (2010).
- Okuley, J. *et al.* Arabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* **6**, 147–158 (1994).
- Aronel, V. *et al.* Map-Based cloning of gene controlling omega-3-fatty-acid desaturation in Arabidopsis. *Science* **258**, 1353–1355 (1992).
- Lou, Y., Schwender, J. & Shanklin, J. *FAD2* and *FAD3* desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 17996–18007 (2014).
- Song, W., Maeda, H. & DellaPenna, D. Mutations of the ER to plastid lipid transporters TGD1, 2, 3 and 4 and the ER oleate desaturase *FAD2* suppress the low temperature-induced phenotype of Arabidopsis tocopherol-deficient mutant *vte2*. *Plant Journal* **62**, 1004–1018 (2010).
- Chen, M. & Thelen, J. J. *ACYL-LIPID DESATURASE2* is required for chilling and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 1430–1444 (2013).
- Bates, P. D. *et al.* Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiology* **160**, 1530–1539 (2012).
- Bates, P. D., Durrett, T. P., Ohlrogge, J. B. & Pollard, M. Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiology* **150**, 55–72 (2009).
- Knothe, G. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy & Fuels* **22**, 1358–1364 (2008).
- Lindblom, G., Oradd, G., Rilfors, L. & Morein, S. Regulation of lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* and *Escherichia coli* membranes: NMR studies of lipid lateral diffusion at different growth temperatures. *Biochemistry* **41**, 11512–11515 (2002).
- Seddon, J. M. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase-transition of lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1031**, 1–69 (1990).
- Jouhet, J. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science* **4** (2013).
- Rebeille, F., Bligny, R. & Douce, R. Oxygen and Temperature effects on the fatty-acid composition in sycamore cells (*Acer-Pseudoplatanus* L.). *Biochimica Et Biophysica Acta* **620**, 1–9 (1980).
- Bligny, R., Rebeille, F. & Douce, R. O-2-Triggered changes of membrane fatty-acid composition have no effect on arrhenius discontinuities of respiration in Sycamore (*Acer-Pseudoplatanus* L.) cells. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 9166–9170 (1985).
- Zhang, J. *et al.* Arabidopsis fatty acid desaturase *FAD2* is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
- Murata, N. & Wada, H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochemical Journal* **308**, 1–8 (1995).
- Miquel, M., James, D., Dooner, H. & Browse, J. Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6208–6212 (1993).
- Tang, G. Q., Novitzky, W. P., Griffin, H. C., Huber, S. C. & Dewey, R. E. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *Plant Journal* **44**, 433–446 (2005).

22. O'Quin, J. B. *et al.* Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 21781–21796 (2010).
23. Jouhet, J., Marechal, E., Bligny, R., Joyard, J. & Block, M. A. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett.* **544**, 63–68 (2003).
24. Li-Beisson, Y. *et al.* Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* **11**, e0161–e0161 (2013).
25. Pant, B. D. *et al.* The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* during phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1907–1918 (2015).
26. Kelly, A. A. & Dormann, P. Green light for galactolipid trafficking. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 262–269 (2004).
27. Abida, H. *et al.* Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* **167**, 118–136 (2015).
28. Hartel, H., Dormann, P. & Benning, C. DGD1-independent biosynthesis of extraplasmidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10649–10654 (2000).
29. Awai, K. *et al.* Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10960–10965 (2001).
30. Morcuende, R. *et al.* Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ.* **30**, 85–112 (2007).
31. Fofana, B., Cloutier, S., Duguid, S., Ching, J. & Rampitsch, C. Gene expression of stearyl-ACP desaturase and Delta 12 fatty acid desaturase 2 is modulated during seed development of flax (*Linum usitatissimum*). *Lipids* **41**, 705–712 (2006).
32. Bligny, R. Growth of suspension-cultured *Acer-Pseudoplatanus* L cells in automatic culture units of large volume. *Plant Physiology* **59**, 502–505 (1977).
33. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).

Acknowledgements

We wish to thank the Région Rhône-Alpes for supporting the PhD fellowship of Coline Meï, and the ChloroMitoLipid ANRJCJC (ANR-12-JSV2-0001) for supporting Morgane Michaud. We are also grateful to Melissa Conte for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

C.M., M.M., E.M., M.A.B., J.J. and F.R. designed, supervised and analysed the experiments; C.M., M.M., M.C., C.A., V.G., M.A.B., J.J. and F.R. performed the experiments; all the authors contributed to the writing of the article.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Meï, C. *et al.* Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures. *Sci. Rep.* **5**, 15207; doi: 10.1038/srep15207 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

B. Suivi de la croissance de cultures d'*A. thaliana*

Les cellules d'*Arabidopsis* sont maintenues en culture en milieu liquide par un repiquage toutes les semaines et la croissance cellulaire est mesurée quotidiennement par le poids frais (**Figure 48. A**). Les cellules contrôles, dont le repiquage a été effectué une semaine avant le début de l'expérience, présentent un profil de croissance d'une phase plateau, avec une concentration cellulaire autour de 1 g de cellules/10 mL de culture. Après un repiquage à 0.3 g de cellules/10 mL de culture, la croissance cellulaire repart plus lentement qu'après deux repiquages effectués à 48h d'intervalle. Les cellules repiquées deux fois atteignent en 72h un poids frais proche des cellules contrôles et la population double environs toutes les 24h. Les cellules étant cultivées en condition mixotrophique, il semble que deux repiquages successifs permettent un apport supplémentaire de saccharose dans le milieu et facilitent ainsi la croissance cellulaire. La présence de sucre dans le milieu est indispensable pour la croissance des cellules : un repiquage dans un milieu MS dépourvu de saccharose n'induit aucune croissance cellulaire (données non montrées).

Pour tester l'effet des inhibiteurs de croissance sur les cultures d'*Arabidopsis* nous avons choisi d'utiliser des cellules en phase de division rapide. Pour cela, les cultures ont été repiquées deux fois à 48h d'intervalle ce qui permet de maintenir un taux de saccharose élevé dans le milieu et d'avoir des cellules qui possèdent un temps de doublement cellulaire plus rapide que des cellules repiquées une seule fois.

En parallèle des mesures de croissance cellulaire, la teneur en lipides neutres (essentiellement des TAG) produits par les cellules a été suivi par coloration au Nile Red. (**Figure 48. B**). Alors que les cellules contrôles présentent un taux basal et constant de TAG, les cellules repiquées produisent des TAG suite au repiquage. L'augmentation du signal Nile Red, environ un facteur 2 par rapport à la mesure initiale, semble s'effectuer uniquement après le premier repiquage, un deuxième repiquage 48h après ne conduisant pas à une plus forte production de TAG. Dans ces conditions, le marquage au Nile Red décroît dès 24h après le deuxième repiquage. De manière intéressante, cette accumulation de lipide de réserve s'effectue durant la phase de croissance exponentielle, alors qu'en condition physiologique, la production de lipides de réserve est classiquement décrite durant la phase stationnaire principalement pour les microalgues et même pour des bactéries cultivées en condition mixotrophiques (*Mata et al 2010, Da Silva et al 2016*). Nous avons aussi observé une production de TAG transitoire chez *P. tricornutum* après repiquage (voir Figure 62, p 179), qui correspond à une phase de latence de la culture durant laquelle les cellules ne se divisent pas, ce qui ne semble pas être le cas des cellules d'*Arabidopsis*. Le repiquage a également été réalisé en accentuant les conditions de manipulation des cultures cellulaires. Par exemple, en lavant plusieurs fois les cellules avec du nouveau milieu ou en les laissant décanter dix minutes, afin de mimer d'éventuels stress liés au repiquage. L'accumulation de TAG est restée inchangée, démontrant que c'est sans doute la transposition des cellules dans un nouveau milieu riche en sucre qui est à l'origine de cette production de TAG.

Deux heures après repiquage, une accumulation d'amidon a également été mise en évidence (**Figure 48. C**). Contrairement au TAG, l'amidon est rapidement mobilisé dans les cellules

contrôles car dès 24h après repiquage, la coloration au lugol est moins intense. Au contraire, les cellules traitées au MTX présentent toujours un taux d'amidon 72h après repiquage. Ce résultat peut indiquer un arrêt du catabolisme de l'amidon ou un turn-over des molécules permettant de conserver la quantité d'amidon synthétisée après repiquage.

Ces résultats montrent que les cellules d'*A. thaliana* ont besoin de saccharose dans le milieu pour leur croissance. Et qu'elles sont capables d'effectuer un stockage transitoire des composés de réserves TAG et amidon, en parallèle de la division cellulaire.

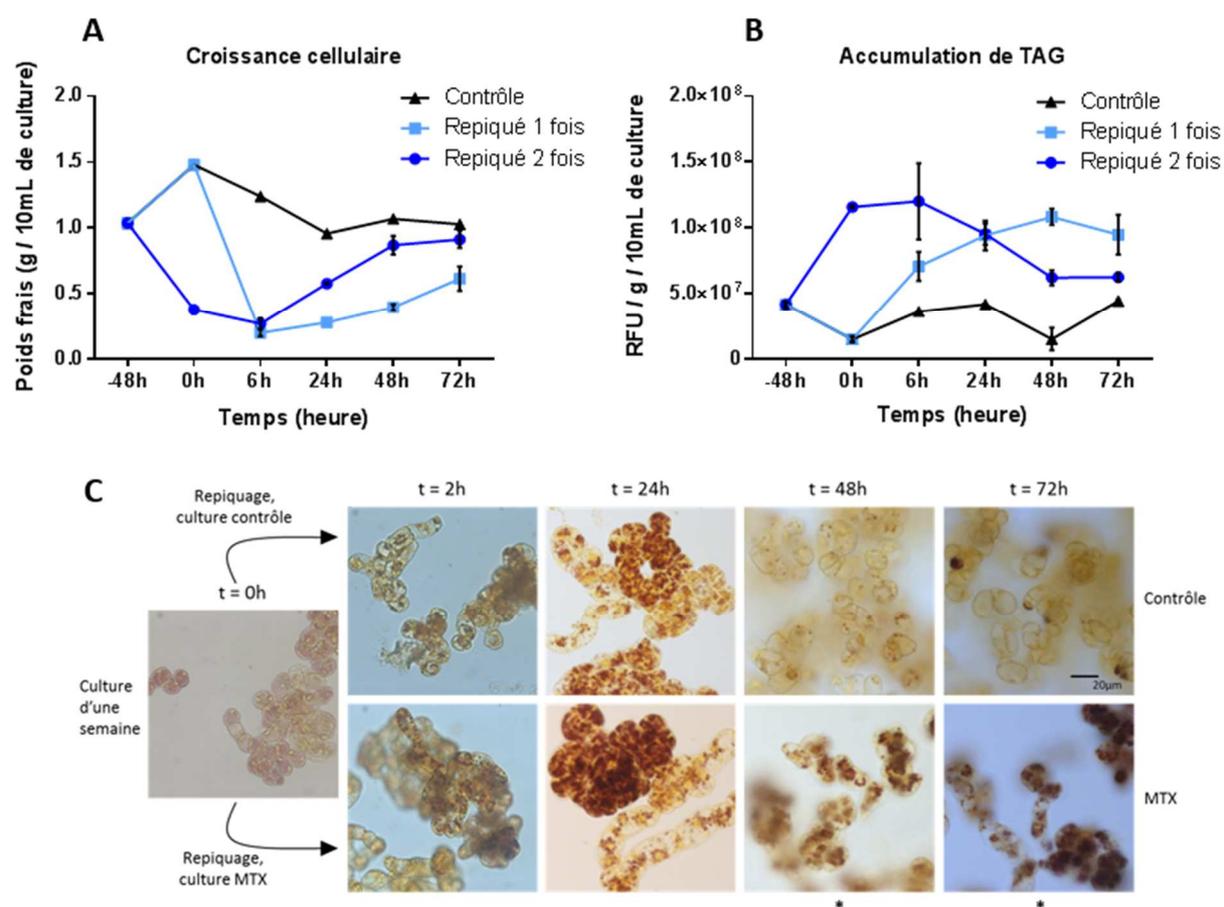


Figure 48 : Suivi de la croissance, de la production de TAG et de la production d'amidon d'une culture cellulaire d'*A. thaliana*. A) Suivi de la croissance cellulaire par mesure du poids frais de cellules contrôles (repiquées une semaine auparavant) et de cellules repiquées une fois (0h) ou deux fois successivement (0h et 48h avant). B) Suivi de l'accumulation de TAG dans les cellules après repiquage par coloration au Nile Red. Valeurs exprimées en RFU/ poids frais. C) Suivi de l'accumulation d'amidon par coloration au lugol après repiquage des cellules témoins et traitées au MTX. MTX : méthotrexate, Poids frais : quantité de cellule (g) en ramené à 10 mL de culture, RFU : relative fluorescent unit.

C. Stratégie de génétique chimique sur les cultures cellulaires d'*A. thaliana*

Pour étudier la relation entre arrêt de la croissance cellulaire et accumulation de TAG, différentes molécules ont été testées sur le modèle de culture cellulaire d'*Arabidopsis*

thaliana. Ces molécules sont des inhibiteurs du cytosquelette : taxol et oryzaline, un inhibiteur de la voie mTOR : rapamycine, un inhibiteur de la voie de synthèse des stérols : simvastatine et des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase-thymidilate synthase : méthotrexate, pyriméthamine, triméthoprim et 5-fluorouracile. Pour permettre la comparaison des résultats, toutes les expériences ont été standardisées avec un temps d'incubation de 72h et un poids frais de départ de 0.3 g/10 mL de culture. Parmi les gammes de concentrations qui ont été testées, les résultats les plus intéressants ont été sélectionnés.

1. Inhibiteurs du cytosquelette

Le taxol et l'oryzaline, deux inhibiteurs du cytosquelette ont été testés sur les cultures de cellules d'*A. thaliana*. Après 72h de traitement, le taxol provoque un retard de croissance de 33% vis-à-vis des cellules contrôles, ainsi qu'une augmentation de TAG d'un facteur 4. Le taxol, habituellement utilisé dans les traitements anticancéreux, est capable d'affecter la croissance des cellules de plantes. Ces résultats sont décrits dans la section page 138.

L'oryzaline est un herbicide qui agit sur les cellules en dépolymérisant les microtubules. De fortes concentrations d'inhibiteur sont nécessaires pour obtenir une inhibition significative de la croissance, qui est complètement bloquée suite à un traitement à 100 μ M (**Figure 49. A**). Dans cette conditions, les cellules traitées avec l'oryzaline affichent une teneur en TAG environ 12 fois celle des cellules témoins (**Figure 49. B**). Cependant les résultats obtenus avec cet inhibiteur sont variables, rendant la reproductibilité des expériences difficiles.

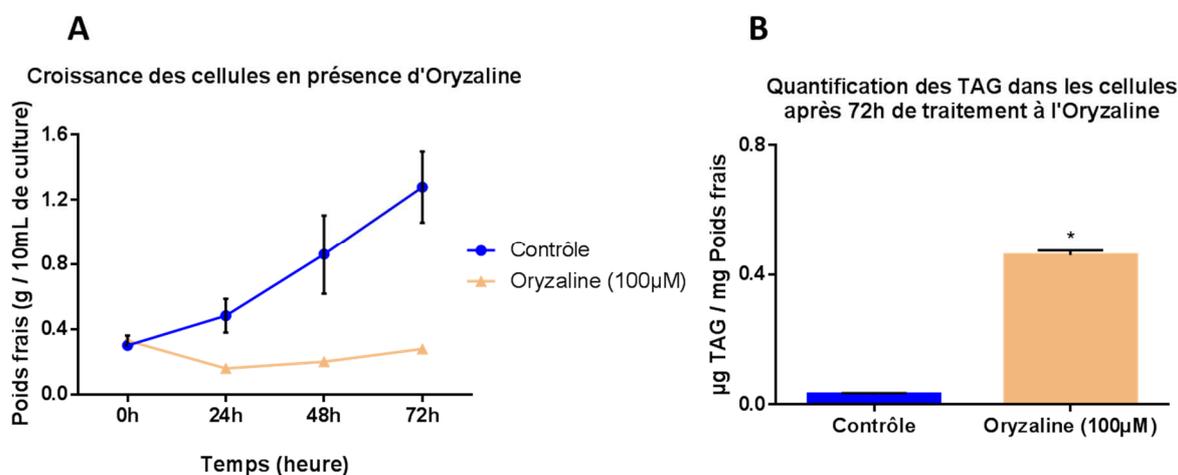


Figure 49 : Effet de l'oryzaline sur la croissance des cellules et l'accumulation de TAG. A) Suivi de la croissance cellulaire des cellules témoins et des cellules traitées pendant 72h. La croissance cellulaire est exprimée en fonction du poids frais. B) Suivi de l'accumulation de TAG, 72h après traitement et comparaison aux cellules témoins. La quantité de TAG est exprimée en μ g ramené en mg de poids frais. Poids frais : quantité de cellule (g) pour 10 mL de culture.

2. Inhibiteurs de la voie mTOR et des stérols

Les deux molécules rapamycine et simvastatine, respectivement inhibitrice de la voie mTOR et de la synthèse des stérols, ont toutes les deux un impact sur la croissance des cellules d'*A. thaliana* (**Figure 50. A**). Le ralentissement de la croissance semble dépendant de la dose d'inhibiteur utilisé. Ainsi 50 μM de rapamycine engendre une diminution de la croissance cellulaire d'environ 33%, alors que 16 μM ont un effet négligeable. Ce constat est aussi valable pour la simvastatine, qui réduit d'environ de 66% la croissance cellulaire comparé au témoin à 50 μM alors qu'à 100 μM la division cellulaire est totalement inhibée. Dans cette situation, la masse de cellules est même 3 fois inférieure après 72h à celle de départ, ce qui suggère une forte mort cellulaire.

De manière non surprenante, ce sont les concentrations les plus fortes des deux inhibiteurs qui conduisent aux plus fortes accumulations de TAG dans les cellules (**Figure 50. B**). Ainsi, les cellules traitées à la rapamycine (50 μM) comportent 15 fois plus de TAG comparé aux cellules contrôles et les cellules incubées avec la simvastatine 40 fois plus. Bien que l'accumulation de TAG soit importante en présence de simvastatine, l'effet cytotoxique de la molécule rend difficile l'interprétation des résultats. Le faible impact de la rapamycine sur la croissance des cellules végétales comparé aux cellules animales a déjà été décrit précédemment. Les auteurs préconisent d'augmenter les doses de l'inhibiteur, habituellement utilisées chez les mammifères pour visualiser un effet chez les plantes (*Xiong et Sheen 2012, Caldana et al 2013*). Des tests avec des concentrations plus élevées pourraient permettre de visualiser une meilleure inhibition de la croissance cellulaire couplée à une plus forte augmentation de TAG. De plus, la rapamycine est une molécule intéressante car elle agit sur la voie de signalisation mTOR qui chez la levure est connectée au métabolisme des glycérolipides via le contrôle indirect de l'enzyme PAH1 (*Dubots et al 2014*). Dans ce contexte, la rapamycine pourrait être un outil intéressant pour identifier des systèmes de régulations similaires chez les végétaux.

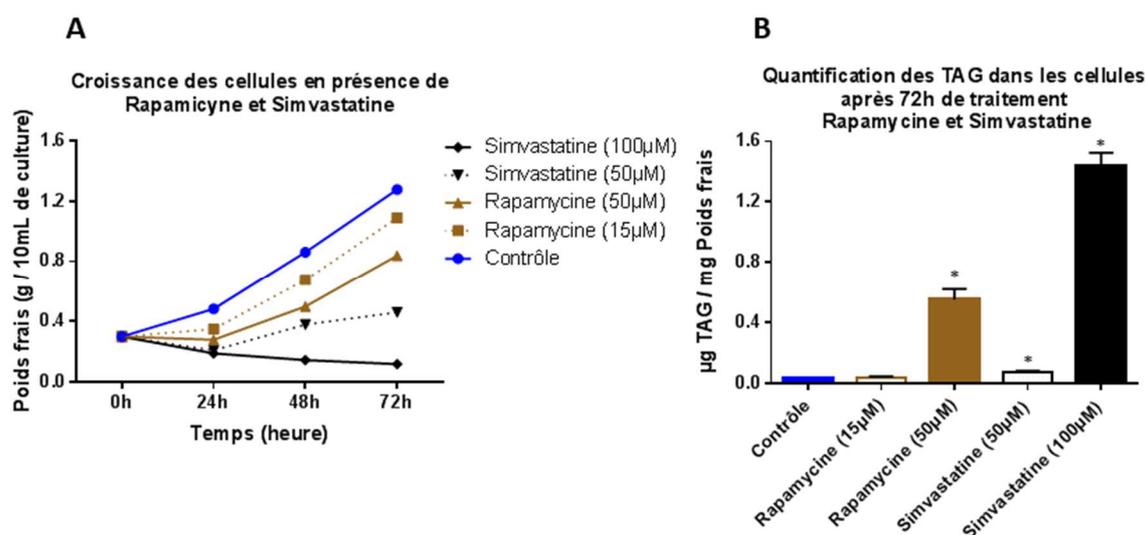


Figure 50 : Effet des inhibiteurs rapamycine et simvastatine sur la croissance des cellules et l'accumulation de TAG. A) Suivi de la croissance cellulaire exprimée en fonction du poids frais, des cellules contrôles et des cellules traitées pendant 72h. Par soucis de clarté, les barres

d'erreurs n'ont pas été représentées. B) Suivi de l'accumulation de TAG, 72h après traitement et comparaison aux cellules témoins. B) Suivi de l'accumulation de TAG. La quantité de TAG est exprimée en μg ramené en mg de poids frais. Poids frais : quantité de cellule (g) en ramené à 10 mL de culture.

3. Inhibiteurs de la voie de synthèse des folates

Le méthotrexate, est la molécule ciblant l'enzyme DHFR (DIHYDROFOLATE REDUCTASE) qui a le plus d'impact en termes de croissance cellulaire et d'accumulation de TAG sur les cultures cellulaires d'*A. thaliana*. La division cellulaire est stoppée car aucune croissance n'est enregistrée après repiquage (poids frais autour de 0.3 g/10 mL de culture) et la production de TAG est jusqu'à 15 fois supérieure à celle des cellules témoins. Les résultats obtenus avec cette molécule, sont présentés dans la publication page 143. Parce que cet inhibiteur a un effet intéressant sur les cellules, nous avons voulu tester ses analogues. La pyriméthamine et le triméthoprimé ciblent également la DHFR. De nombreuses concentrations ont été testées et ce n'est qu'à 200 μM que les molécules ont révélé avoir un impact sur la croissance cellulaire, impact discret en ce qui concerne le triméthoprimé. La pyriméthamine présente une légère croissance à 72h avec un poids frais de 0.4 g/10 mL de culture, tandis que le triméthoprimé présente 33% de réduction de croissance comparé au témoin (**Figure 51. A**).

Concernant l'accumulation de TAG, c'est encore une fois le traitement qui inhibe le plus la croissance qui provoque l'accumulation de TAG la plus élevée (**Figure 51. B**). Les cellules traitées à la pyriméthamine présentent ainsi 4 fois plus de TAG que dans les cellules témoins. Au contraire, la production de TAG dans les cellules traitées au triméthoprimé est équivalente aux cellules contrôles.

Le méthotrexate induit une forte hausse de la teneur en TAG des cellules végétales à une concentration de 3 μM . Pour les autres inhibiteurs ciblant la DHFR, malgré les doses élevées et une inhibition de la croissance quasiment complète pour la pyriméthamine, l'accumulation de TAG est plus faible. Il est possible que l'absence d'impact du triméthoprimé provienne du fait qu'il ne pénètre pas dans les cellules. Ces résultats montrent qu'il peut exister une variabilité de réponse des cellules et ce, pour une même cible cellulaire inhibée. Des dosages de l'activité DHFR des cellules en présence de ces deux molécules, pourraient permettre de mettre en évidence d'éventuelles différences de spécificité entre ces traitements.

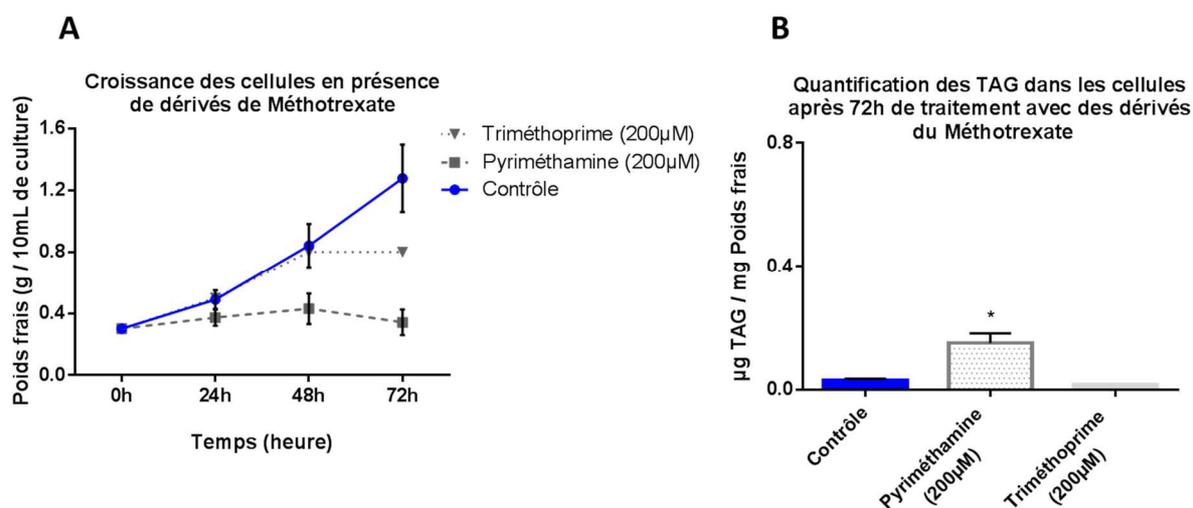


Figure 51 : Effet des inhibiteurs pyriméthamine et triméthoprimine sur la croissance des cellules et l'accumulation de TAG. A) Suivi de la croissance cellulaire exprimée en fonction du poids frais, des cellules contrôles et des cellules traitées pendant 72h. B) Suivi de l'accumulation de TAG, 72h après traitement et comparaison aux cellules témoins. La quantité de TAG est exprimée en µg ramené en mg de poids frais. Poids frais : quantité de cellule (g) en ramené à 10 mL de culture.

4. Discussion

D'après les résultats présentés ci-dessus, il semble exister une relation entre arrêt de la croissance cellulaire et accumulation de lipides de réserve, une forte inhibition de la croissance des cellules étant associée dans la majorité des cas à une forte accumulation de TAG. Au contraire, une inhibition modérée de la croissance comme c'est le cas pour le triméthoprimine, ne produit pas ou peu de TAG. Cependant, une forte inhibition de la croissance n'est pas forcément corrélée à une forte accumulation de TAG, puisque le traitement à la pyriméthamine ne présente qu'une faible augmentation de TAG en comparaison avec le traitement au MTX.

Ces données mettent en évidence l'importance de nombreux paramètres à prendre en compte. Pour la plupart des molécules utilisées, l'effet dose-dépendant est visible et il est donc primordial de se placer dans une gamme de concentration qui permet de visualiser l'impact de la molécule sur le métabolisme des TAG, tout en évitant les effets cytotoxiques. De ce point de vue, il serait aussi intéressant de mesurer des paramètres vitaux comme l'activité photosynthétique, la respiration ou des marqueurs de mort cellulaire pour vérifier que le traitement n'entraîne pas une mort cellulaire.

Les différents traitements réalisés agissent sur des cibles cellulaires différentes. On peut donc s'attendre, comme les résultats l'ont montré, à une réponse différente suivant la voie de signalisation ciblée. Or, même au sein d'une famille de molécule comme les inhibiteurs du cytosquelette ou des folates, des inhibiteurs ciblant la même protéine ou enzyme peuvent avoir des effets différents sur les cellules. Cette différence pourrait venir de l'affinité de la

molécule pour sa cible. Cette hypothèse est très bien illustrée par les inhibiteurs des folates ou le méthotrexate agit dès 3 μ M et la pyriméthamine à 200 μ M. Par exemple, le taxol a été étudié pour ses propriétés anticancéreuses chez les mammifères, tandis que l'oryzoline a été développée pour servir d'herbicide, ce qui peut expliquer l'effet modéré du taxol chez les plantes.

La dilution des molécules dans le milieu et leur pénétration dans les cellules sont également des facteurs à prendre en compte pour conclure sur l'effet d'une molécule. Nous avons optimisé la dilution des molécules dans différents solvant mais le pourcentage de molécules réellement incorporées dans les cellules est un paramètre inconnu, de même que le temps nécessaire pour que la molécule pénètre et agisse. Dans ces expériences, nous avons standardisé le temps d'incubation à 3 jours afin de faciliter les comparaisons entre les traitements mais ce temps nécessite sans doute d'être optimisé pour chaque molécule.

D. Effets du traitement méthotrexate et de la carence d'azote sur le métabolisme des TAG

1. Données principales

Suite au criblage des petites molécules inhibitrices sur le modèle cellulaire d'*Arabidopsis*, nous nous sommes focalisés sur l'effet du traitement méthotrexate. Cette molécule inhibe à faible dose la croissance cellulaire et provoque une forte accumulation de TAG. De plus, des études précédentes effectuées au sein du laboratoire ont montré que les paramètres vitaux des cellules sont maintenus en condition MTX, en dépit de l'arrêt de la croissance des cultures (Loizeau *et al* 2007 et 2008). Ces résultats ont été comparés à l'effet d'une carence en azote dans les cultures de cellules d'*A. thaliana*. La production de TAG provoquée par une carence en azote est très bien décrite chez les microalgues (Boyle *et al* 2012, Simionato *et al* 2013, Abida *et al* 2015, Paranjapea *et al* 2016). Chez les plantes, l'accumulation de TAG dans les tissus végétatifs suite à une carence en azote a aussi été reportée (Gaude *et al* 2007, Yang *et al* 2011, Shimojima *et al* 2015). Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur un modèle de culture cellulaire et aucun profil glycérolipide complet n'a été effectué suite à une carence en azote.

Dans le chapitre suivant, nous avons comparés le traitement MTX et la carence d'azote, deux conditions qui ralentissent la croissance cellulaire et engendrent une production de TAG dans les cultures cellulaires d'*A. thaliana*, pour essayer de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la formation de ces lipides de stockage. Les profils en glycérolipides ont révélé des mécanismes différents entre les deux situations. Parmi les résultats obtenus il est intéressant de souligner que le MTX abaisse le taux de méthylation dans les cellules ce qui impacte la synthèse de la phosphocholine, précurseur de la tête polaire de la PC. Or, le taux de PC durant le traitement est peu affecté, ce qui révèle que l'homéostasie de ce phospholipide est finement régulée. Au contraire, la carence d'azote engendre une consommation de tous les glycérolipides membranaires au profit de la production de TAG. Des similitudes existent aussi entre les deux traitements, notamment au niveau de la composition en acides gras des pools

de PC, TAG et acyl-CoA. Pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces variations de profil lipidique, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des glycérolipides et dans la synthèse des lipides de réserves a été étudiée. Ensemble, ces résultats ont mis en évidence une forte stimulation des gènes codant pour des phospholipases NPC, qui pourraient être à l'origine d'un fort turn-over de la PC et de l'accumulation de TAG. Ces données ont été confirmées par une expérience d'incubation de PC marquée avec une sonde fluorescente : la PC est métabolisée plus rapidement dans les cellules traitées que dans les cellules témoins. Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de soumission, présentée dans la section suivante: "C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation trigger triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and highlight a role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway."

NB : Les figures et les références bibliographiques de cet article sont numérotées et classées de manière indépendante au reste du corps de texte de ce manuscrit.

“C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation trigger triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and highlight a role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway.”

Coline Meï¹, Mathilde Cussac¹, Richard Haslam², Frédéric Beaudoin², Yung-Sing Wong³, Eric Maréchal¹ and Fabrice Rébeillé¹

¹ Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Unité mixte de recherche 5168 CNRS - CEA - INRA - Université Grenoble Alpes, Biosciences and Biotechnologies Institute of Grenoble, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9, France.

² Biological Chemistry, Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, U.K.

³ Département de Pharmacochimie Moléculaire, Unité mixte de recherche 5063 CNRS - Université Grenoble Alpes, Grenoble Cedex 9, France.

SUMMARY

Triacylglycerol (TAG) accumulation often occurs in growth limiting conditions such as nutrient deprivations. We analysed lipid contents of *Arabidopsis* cells grown in two different limiting situations in order to highlight common answers about TAG accumulation and to study the relationships between membrane lipids and storage lipids. A first situation was triggered by methotrexate (MTX), a drug that inhibits methyl transfer reactions and potentially reduces Pi-choline synthesis, the polar head of phosphatidylcholine (PC). A second situation was nitrogen deprivation. MTX-treated cells displayed 10-15 times more TAG than control, a net increase of lipids since the total amount of membrane glycerolipids was almost not affected. In this situation, PC homeostasis appeared tightly regulated and not strictly dependent on the rate of Pi-choline synthesis. In the nitrogen deficient situation, we observed a 60 times increase of TAG. In these cells, the overall lipid content remained unchanged, but membrane lipids decreased by a factor of two suggesting a reduction of the membrane network and a rerouting of membrane lipids to storage lipids. Fatty acid (FA) analyses showed that the FA composition of TAG was always similar to that in PC, but different from that in acyl-CoA, suggesting that TAG accumulation in all conditions involved PC-derived DAG moieties. In agreement, analyses by qPCR of genes coding for TAG synthesis showed a strong increase of phospholipase C (*NPC*) expressions, and experiments using labeled (fluorescent) PC indicated higher rates of PC-to-TAG conversion in both situations. These results highlight a role for NPC in plant cell oil production.

Key words: C1 metabolism; methylation index; nitrogen deficiency; triacylglycerol synthesis; phosphatidylcholine synthesis; nonspecific phospholipase C; *Arabidopsis*.

INTRODUCTION

In all organisms glycerolipids are essential components of the membrane architecture and the main form of storage lipids. Membrane glycerolipids are diesters of fatty acids (FA) and glycerol, the third hydroxyl function of the glycerol backbone being linked with a polar group, whereas storage glycerolipids are triesters of FA, *i.e.* triacylglycerol (TAG). These storage lipids represent a highly reduced form of carbon that serves as an energy reserve, and constitute an important resource to meet the demands for food, biofuel, green chemistry or many other industrial applications (Lu *et al.*, 2011).

The balance between the various species of membrane glycerolipids and the relationships between membrane and storage glycerolipids are complex and not fully understood. Diacylglycerol (DAG) and phosphatidic acid (PA) are the precursors of all glycerolipids. Neosynthesis of DAG occurs either in the endoplasmic reticulum (ER) or in plastids. It involves the sequential addition of two acyl chains from the acyl-ACP in plastids or from the acyl-CoA pool in the ER to the *sn*-1 and *sn*-2 positions of glycerol-3-Pi to form PA (Kim *et al.*, 2005; Joyard *et al.*, 2010; Shockey *et al.*, 2016). PA is then dephosphorylated generating DAG (Nakamura *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2009). Alternatively, DAG can also be produced from a phospholipid (e.g. phosphatidylcholine (PC)) by the removal of its polar head (Pi-choline) (Bates, 2016). Polar-head removal can occur via multiple reactions (Fig. 1A): i) the reverse action of a DAG:CDP-choline phosphotransferase (AAPT), the enzyme involved in PC synthesis (Slack *et al.*, 1983); ii) a phosphatidylcholine:diacylglycerol choline-phosphotransferase (PDCT), an enzyme that can reversibly transfer a Pi-choline from PC to DAG (Lu *et al.*, 2009); or, iii) a non-specific phospholipase C (NPC) that can remove the Pi-choline head from PC (Nakamura *et al.*, 2005). Then, from DAG or PA, it is possible to synthesize all the different glycerolipids through specific routes (Li-Beisson *et al.*, 2013).

Several pathways can be involved for the synthesis of storage lipids, *i.e.* TAG which are assembled/produced in the endoplasmic reticulum by acylation of DAG at the *sn*-3 position (see Fig. 1A). The first route is referred to as the Kennedy pathway and requires three sequential acylations of the glycerol backbone from the acyl-CoA pool. The last acylation is catalyzed by an acyl-CoA dependent diacylglycerol acyltransferase (DGAT), which adds a third fatty acid from the acyl-CoA pool to DAG.

Although there are at least four different genes related to DGAT in higher plants (Lu *et al.*, 2011), only type 1 and type 2 functions have been studied. Whereas DGAT1 plays a major role controlling TAG accumulation in seeds, DGAT2 appears to prefer substrates with unusual FA (hydroxy-, epoxy- or conjugated fatty acids) (Burgal *et al.*, 2008; Chen and Smith, 2012; Li *et al.*, 2012). Another route to produce TAG involves a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) activity (Bates and Browse, 2011), where the FA moiety added at the *sn*-3 position of the glycerol backbone originates from a phospholipid (mostly PC), and not from the acyl-CoA pool (Dahlqvist *et al.*, 2000) (Fig. 1A). The resulting lyso-PC is then recycled back into PC by a lyso-phosphatidylcholine:acyltransferase (LPCAT1, LPCAT2) (Xu *et al.*, 2012; Lager *et al.*, 2013).

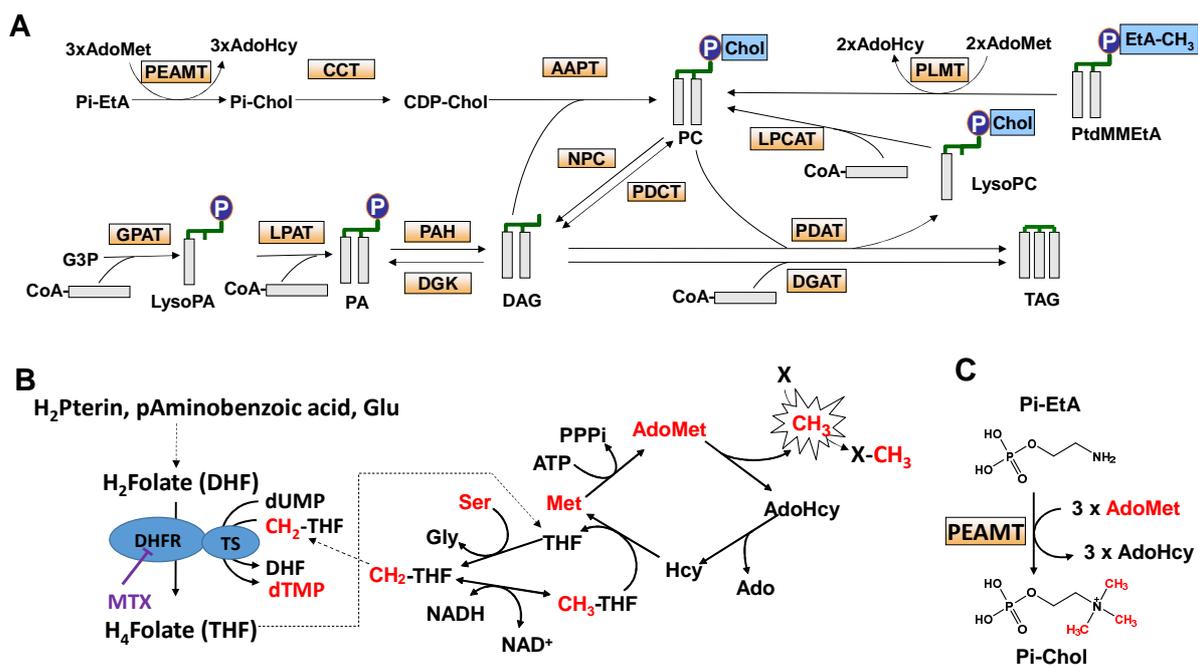


Figure 1: THF synthesis, C1 metabolism and TAG biosynthesis in plant cells. A, Scheme representing PC and TAG biosynthesis pathways, and the interconversion between PC and TAG. CDP-Chol, CDP-choline; LysoPC, lyso-phosphatidylcholine; PtdMMEtA, phosphatidylmonomethylethanolamine; G3P, glycerol-3-Pi. PEAMT, phosphoethanolamine N-methyltransferase; CCT, CTP:Pi-choline cytidyltransferase; AAPT, DAG:CDP-choline phosphotransferase; GPAT, glycerol-3-Pi acyltransferase; LPAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; PAH, phosphatidic acid hydrolase; DGK, diacylglycerol kinase; NPC, non-specific phospholipase C; PDCT, phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; PDAT, phospholipid diacylglycerol acyltransferase; LPCAT, lyso-phosphatidylcholine acyltransferase; PLMT, phospholipid N-methyltransferase. B, The pathway of THF synthesis and the methyl cycle. In bikont organisms (such as plants) DHFR is a bifunctional enzyme, supporting both DHFR and thymidylate synthase (TS) activity, whereas in unikont organisms (such as animals) DHFR is monofunctional. MTX is a structural analog of DHF that specifically inhibits the DHFR domain. Inhibition of the DHR domain impairs cell division and the methyl cycle activity (methylation reactions). Methyl groups are transferred from Met to an acceptor X *via* AdoMet, the universal methyl donor, and then Met is regenerated from serine and THF. H₂Pterin, dihydropterin; Glu, glutamate; H₂Folate or DHF, dihydrofolate; H₄Folate or THF, tetrahydrofolate; CH₂-THF, methylenetetrahydrofolate. CH₃-THF, methyltetrahydrofolate; AdoMet, S-adenosylmethionine; AdoHcy, S-adenosylhomocysteine; Ado, adenosine; Ser, serine; Gly, glycine. C, The synthesis of Pi-choline from Pi-ethanolamine. Pi-choline is the precursor of PC. Methyltransferases such as PEAMT are controlled by the AdoMet/AdoHcy ratio. Pi-Chol, Pi-choline; Pi-EtA, Pi-ethanolamine.

PC is known to be the major site of 'acyl editing'. In this process, FA from PC are exchanged with FA from the acyl-CoA pool through a rapid deacylation-reacylation cycle (Bates *et al.*, 2012; Bates, 2016). Through this cycle, oleic acid (18:1) synthesized in plastids and transferred in the cytosol as oleyl-CoA is attached to lyso-PC, and then converted to polyunsaturated FA (PUFA) by FA desaturases. PUFA are thereafter released from PC in the acyl-CoA pool by a phospholipase A cleavage or the reverse action of LPCAT, to be eventually available for other glycerolipid syntheses, including TAG (Li-Beisson *et al.*, 2013; Bates, 2016). Kinetic labeling experiments suggest a channeling of newly synthesized acyl chains towards PC, and indicate that PC acyl editing is the main pathway for the initial incorporation of FA into glycerolipids (Bates and Browse, 2012; Tjellstroem *et al.*, 2012). In other words, the newly synthesized acyl chains are first addressed to PC, desaturated and then released back from PC into the acyl-CoA pool. Thus, the FA composition of DAG and its downstream product TAG, may differ depending on the metabolic route followed to produce DAG: i) de novo synthesis using newly synthesized 18:1-CoA; ii) de novo synthesis using PC-edited acyl-CoA; or iii) PC-derived DAG (Bates and Browse, 2012). In addition, as described above, the third FA present at the *sn*-3 position of the glycerol backbone may also have different origins, i.e. the acyl-CoA pool or PC. Thus, PC appears as a metabolic platform in the general scheme of glycerolipid syntheses, draining most of the acyl fluxes for their maturation by addition of double bonds and their redistribution toward the various glycerolipids. The main route for the biosynthesis of PC occurs in the endoplasmic reticulum (ER) and involves the condensation of DAG and CDP-choline, a reaction catalyzed by AAPT (also called DAG-CPT). CDP-choline is synthesized from Pi-choline by a CTP:Pi-choline cytidyltransferase (CCT) (Inatsugi *et al.*, 2009; Li-Beisson *et al.*, 2013), and Pi-choline, in turn, is formed by three sequential methylations of phosphoethanolamine (**Fig. 1A, 1C**). These methylations are catalyzed by a phosphoethanolamine N-methyltransferase (PEAMT) and require S-adenosylmethionine (AdoMet) as methyl donor. AdoMet, in turn, relies on methionine (Met) and on the tetrahydrofolate (THF) cofactor for its synthesis (**Fig. 1B**). In Arabidopsis, three separate genes for PEAMT can be found. PEAMT1 and 3 catalyze the three methylation steps, whereas PEAMT2 catalyzes only the last two (BeGora *et al.*, 2010). Several studies indicate that PC synthesis is tightly controlled at the level of PEAMT, either through feed-back inhibition by Pi-choline (Witola and Ben Mamoun, 2007) or by PA (Carman and Henry, 2007; Jost *et al.*, 2009; Eastmond *et al.*, 2010). Another metabolic route which potentially involves PC synthesis is the AdoMet-dependent methylation of phosphatidylmonomethylethanolamine, a reaction catalyzed by a phospholipid N-methyltransferase (PLMT). This second route, however, appears to have only minor contribution to PC synthesis in plants (McNeil *et al.*, 2000; Keogh *et al.*, 2009).

TAG content may fluctuate widely depending on the growth conditions or the specificity of the tissue. Oilseeds generally contain large amount of storage lipids, and the reactions involved in TAG synthesis have been mostly studied in these tissues (for a recent review, see (Bates, 2016)). In non-seed tissues, such as mesophyll cells or microalgae, the amount of TAG is generally low but can increase as part of a response to particular situations. The best

documented situations concern nutrient deficiencies in microalgae. Indeed, it was shown that nitrogen and phosphate deficiencies, the most often limiting or co-limiting nutrients in oceans, trigger important lipid remodeling associated with strong accumulations of TAG (*Abida et al 2014*). These observations are at the basis of numerous strategies to produce third generation biofuels. These effects have been less studied in higher plants, but it was observed in *Arabidopsis* seedlings that the amount of TAG increased during nitrogen deprivation (*Gaude et al., 2007; Shimojima et al., 2015*), and that such increase was also significantly enhanced in the presence of sugar (*Yang et al., 2011*). The reasons why nutrient deficiencies induce TAG accumulation are not clear. It is possible that in the absence of cell division the carbon precursors normally used for protein synthesis or energy metabolism are partly redirected toward TAG production (*Singh et al., 2011; Simionato et al., 2013; Yang et al., 2013*). From this point of view, it could be possible that any situation that affects growth rate and cell division triggers TAG accumulation. In support to this hypothesis, it was shown in yeast that TAG synthesis and degradation fluctuate according to the cell division cycle (*Kurat et al., 2006; Zanghellini et al., 2008; Kohlwein, 2010*). However, the impact of growth limiting conditions upon the expression of genes involved in lipid synthesis remains to be investigated, together with the pathway involved in the production of storage lipids.

In the present article, we evaluated the glycerolipid composition and the expression of genes related to TAG synthesis in suspension cultures of *Arabidopsis* mesophyll cells in two different situations that affect growth and cell division. The first situation is triggered by methotrexate (MTX), an anti-folate drug that blocks nucleotide synthesis and also inhibits the methyl transfer reactions such as those involved in Pi-choline synthesis. Such a 'chemogenomic' approach has proven successful in several studies aimed to better understand lipid metabolism in plants and microalgae (*Botte et al., 2011; Boudiere et al., 2012; Franz et al., 2013*). The second one is a nitrogen deficient situation, a condition often encountered by plants and algae and known to induce large amounts of TAG in microalgae.

RESULTS

Growth inhibition and TAG accumulation

Cell suspension cultures of *Arabidopsis* are useful tools to study the effects of nutrients or drugs on cell physiology because their concentrations in the external medium can be easily controlled. It must be noted that, even if the glycerolipid composition (distribution) is relatively robust in these cells, variations in the total amount of lipids can be observed from one culture to another (*Mei et al., 2015*). Thus, data from each assay were always referred to a control that was issued from the same batch culture as the treated cells. The idea that growth rate and TAG accumulation are connected processes is often encountered in the literature (*Tsai et al., 2014*), but there is no case study analysing in details lipid composition and remodeling in higher plants. We tested the effects of 5-fluorouracyl (5-FU) an inhibitor of thymidylate synthesis (*Neuburger et al., 1996*), methotrexate (MTX) an inhibitor of tetrahydrofolate (THF) synthesis (*Ravanel et al., 2011*), taxol an inhibitor of microtubule disassembly (*Kudo et al., 2014*) and nitrogen deficiency. As shown in **Figure 2A**, all these

treatments resulted in a significant inhibition of growth after three days, MTX being the strongest inhibitor (see also the supplementary **Fig. S1** for the corresponding growth curves). In all these experiments TAG accumulated (**Fig. 2B**), suggesting some pleiotropic effect associated with these stress conditions. However, TAG did not accumulate to the same extent in all situations, also suggesting some specific effects on lipid metabolism. Indeed, whereas TAG contents increased only 3 to 4 times in the presence of 5-FU or taxol, MTX-treated cells and cells grown in the absence of nitrogen displayed respectively 13 and 60 times more TAG than in control cells.

MTX is a specific inhibitor of dihydrofolate reductase (DHFR), a key enzyme in THF synthesis (*Ravanel et al., 2011*). THF is the central cofactor of C1 metabolism, which is involved in nucleotide and methionine (Met) syntheses (**Fig. 1B**). Met, in turn, is the precursor of S-adenosylmethionine (AdoMet), the universal methyl donor. Consequently, the S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio (AdoMet/AdoHcy; also called methyl index) decreases (*Loizeau et al., 2007; Van Wilder et al., 2009*), and most of the methyl transfer reactions such as those involved in Pi-choline and PC syntheses are strongly lowered (**Fig. 1B, 1C**). When Met was provided together with MTX in order to reactivate the methyl cycle activity, some growth was restored (**Fig. 2A**) and the observed TAG accumulation reached approximately the level recorded with 5-FU or taxol (**Fig. 2B**), thus suggesting that the accumulation recorded with MTX alone was at least partly due to the inactivation of methyl transfer reactions.

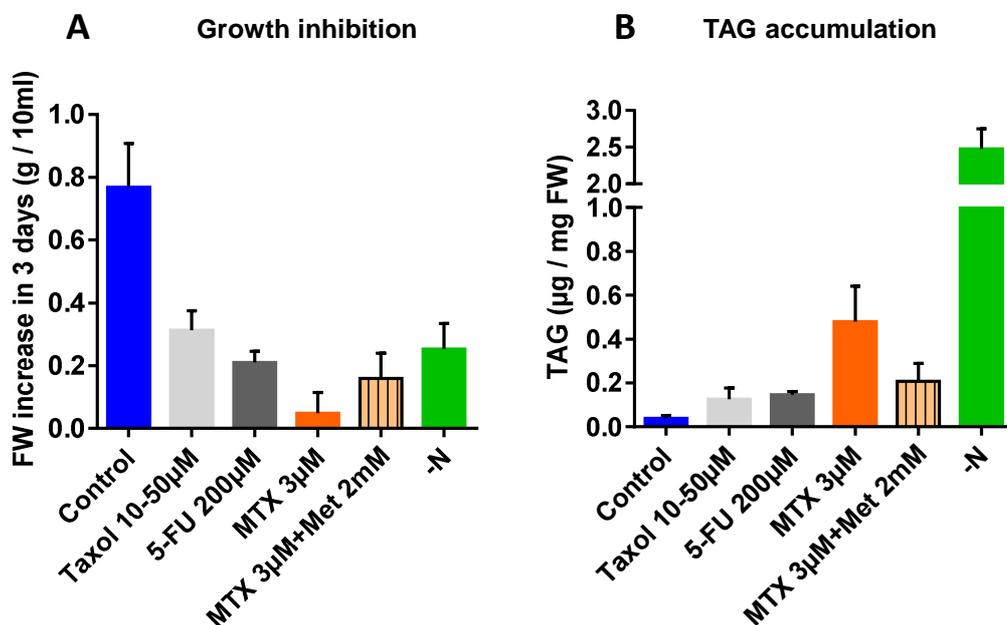


Figure 2 : Growth and TAG content of *A. thaliana* cell cultures incubated 72 h in the presence of taxol, 5-FU, MTX, MTX+Met or grown in a nitrogen deficient medium. A, Fresh weight after 72h of treatments. The initial cell concentrations at t=0h were 0.3 g per 10mL of culture in each conditions. B, TAG content expressed as µg of FA per mg of fresh weight. All the measurements were made after 72h of treatment. The data are means ± SD of five (MTX and MTX+Met) or three (Taxol, 5-FU and –N) independent biological repeats.

The relationship between nitrogen and lipid metabolisms is not fully understood. In contrast with the MTX condition, nitrogen deficiency is a physiological situation often encountered and to which plants have adapted. One of the adaptive answers is to accumulate TAG, possibly to dispose of a source of energy readily available when the growth conditions subsequently gets better.

To better understand the mechanisms underlying TAG accumulation we analysed in details the lipid composition and the expression of related genes in these two case studies.

Lipid composition and PC homeostasis in MTX treated cells, blocking C1 metabolism

As a first case study, MTX-treated cells displayed an AdoMet/AdoHcy ratio that was strongly reduced compared to control cells (from 40 to 0.4; **Fig. 3A**), illustrating the blocking of C1 metabolism. As a result, the Pi-choline content was lowered by about a factor of two (**Fig. 3B**), an effect relatively moderate. The total lipid content was also affected. Indeed, we observed a 45% increase of the total amount of glycerolipids (estimated through the total FA content; **Fig. 3C**), which essentially resulted from a 10-15 times increase of the TAG content (**Fig. 3D**). In accordance with this, appearance of lipid droplets was clearly visible using LSC microscopy (**Fig. 3E**). The levels of phospholipids showed a tendency to increase, whereas plastidial glycerolipids, i.e. galactolipids and phosphatidylglycerol, were almost not affected (**Fig. 3D**).

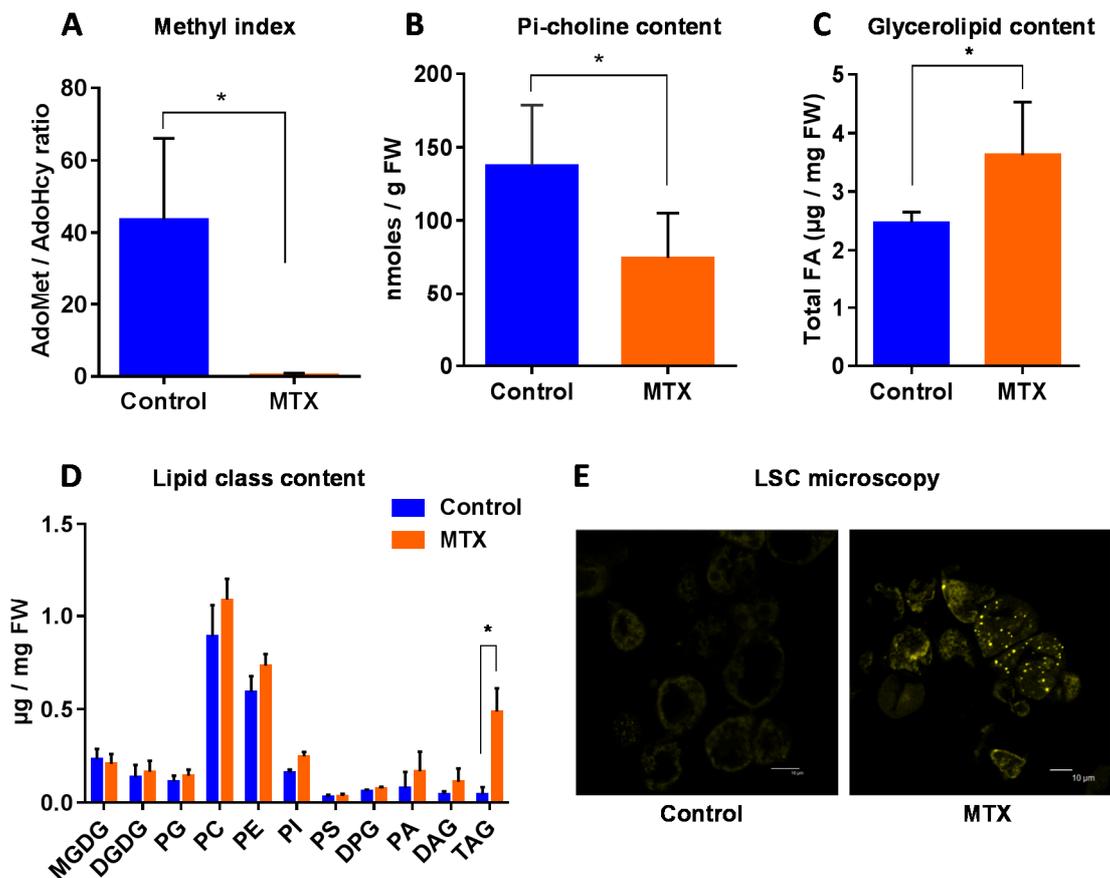


Figure 3 : Pi-choline content, methyl index and lipid analysis of *A. thaliana* cells incubated 72 h in the presence of MTX. A, AdoMet/AdoHcy ratio. B, Pi-choline concentration. C, Total

glycerolipid content expressed as μg of FA per mg of fresh weight. D, Quantitative analysis of the various glycerolipids (expressed as μg of FA per mg of fresh weight). E, Nile-Red staining and LSC microscopy imaging showing an accumulation of lipid droplets in MTX treated cells. All the measurements were made after 72h of treatment. The data are means \pm SD of five independent biological repeats for each condition. Significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by an unpaired multiple t test using GraphPad Prism software.

Surprisingly, we did not observe any decline of the amount of PC despite the nearly two fold decrease of the Pi-choline concentration. On the contrary, like most phospholipids, PC showed a tendency to increase. These results indicate that the arrest of cell division following MTX treatment was not accompanied by a significant membrane breakdown, and that the resulting increase in lipid content was largely due to TAG synthesis. It is likely that in such a situation where the expansion of membranes was strongly reduced, the remaining level of Pi-choline was sufficient to supply the required PC turnover. Alternatively, it is also possible that the down-regulation of the PC turnover due to the MTX treatment was partly responsible for the growth limitation, thus balancing PC turnover, growth and membrane expansion.

In separate control experiments we confirmed that these MTX effects specifically resulted from the decline of THF production (Loizeau *et al.*, 2007; Loizeau *et al.*, 2008) since addition of a folate derivative, 5-formyl-THF (5-FTHF), together with MTX, almost completely reversed the effects observed with MTX (**Supplemental Fig. S2**). It is interesting to note that despite the presence of 5-FTHF, the methyl index (AdoMet/AdoHcy ratio) remained low compared to the control (5.6 versus 40, **Fig. S2B**). This result indicates that an AdoMet/AdoHcy ratio of 5.6 is high enough to sustain the methylation reactions required for normal growth. From this point of view, methyl index values of 5 to 10 have already been reported as control values for Arabidopsis cells (Loizeau *et al.*, 2008) and pea leaves (Van Wilder *et al.*, 2009).

To counterbalance the decrease of Pi-Choline resulting from MTX treatment, we supplied the cells with Pi-choline. In separate experiments, we verified that the addition of Pi-choline alone did not affect the glycerolipid composition (**Supplemental Fig. S3A**). Then, comparing MTX and MTX + Pi-choline conditions, we observed that growth was still completely blocked (**Fig. 4A**). Despite a higher intracellular Pi-choline concentration (about 5 times more than in the presence of MTX alone; **Fig. 4B**), the level of PC remained roughly constant and TAG still accumulated (**Fig. 4C**). These results indicate that the presence of Pi-choline cannot reverse the MTX-induced accumulation of TAG in Arabidopsis cells, and that varying the Pi-choline concentration by a factor of five did not significantly affect PC homeostasis.

To explore the possible role of the methyl index in the process of PC synthesis and TAG accumulation, we supplied MTX-treated cells with Met in an attempt to avoid the decrease of the AdoMet/AdoHcy ratio. In separate experiments (**Supplemental Fig. S3B**), we verified that the addition of Met alone did not affect the glycerolipid composition. The presence of Met during the MTX treatment partly restored the methyl index (**Fig. 4D**), but not at the same level as that in the control (dotted line). Indeed, the AdoMet/AdoHcy ratio shifted from 0.4 (MTX

alone) to 5.4 (MTX + Met), a value similar to the one observed in the presence of MTX + 5-FTHF (see Fig. S2B). In the MTX + Met situation, the level of PC displayed a tendency to increase compared to the level measured in the presence of MTX alone, although this difference was not statistically significant (Fig. 4E). TAG still accumulated in the presence of MTX + Met, but the final concentration measured after three days of experiment was significantly reduced compared to MTX alone. Thus, the presence of Met was able to partly reduce the MTX-induced accumulation of TAG, in contrast to what was observed in the presence of Pi-choline, suggesting that the methyl index, but not the amount of Pi-choline, was a factor influencing TAG accumulation in these experiments. *PEAMT1* was reported to control the level of PC through transcriptional and posttranscriptional regulations (Eastmond et al., 2010). *PEAMT1* expression (Fig. 4F) was down-regulated in the presence of MTX or MTX + Pi-choline but up-regulated in the presence of MTX + Met, indicating that the expression of this gene was impacted by the methyl index ratio. However, *PEAMT1* expression was also up-regulated in nitrogen deficient cells, a situation where TAG accumulation was the highest, showing that the expression of this gene depends on several factors (Eastmond et al., 2010). Altogether, these results indicate that PC homeostasis is tightly controlled in these cells and point out that altering the methyl index in plants can affect TAG accumulation. Although MTX appeared to target not yet identified pathways that are contributing more to the phenotype than the pathways initially thought, MTX-treated cells remains an interesting tool to study the relationships between membrane and storage lipids.

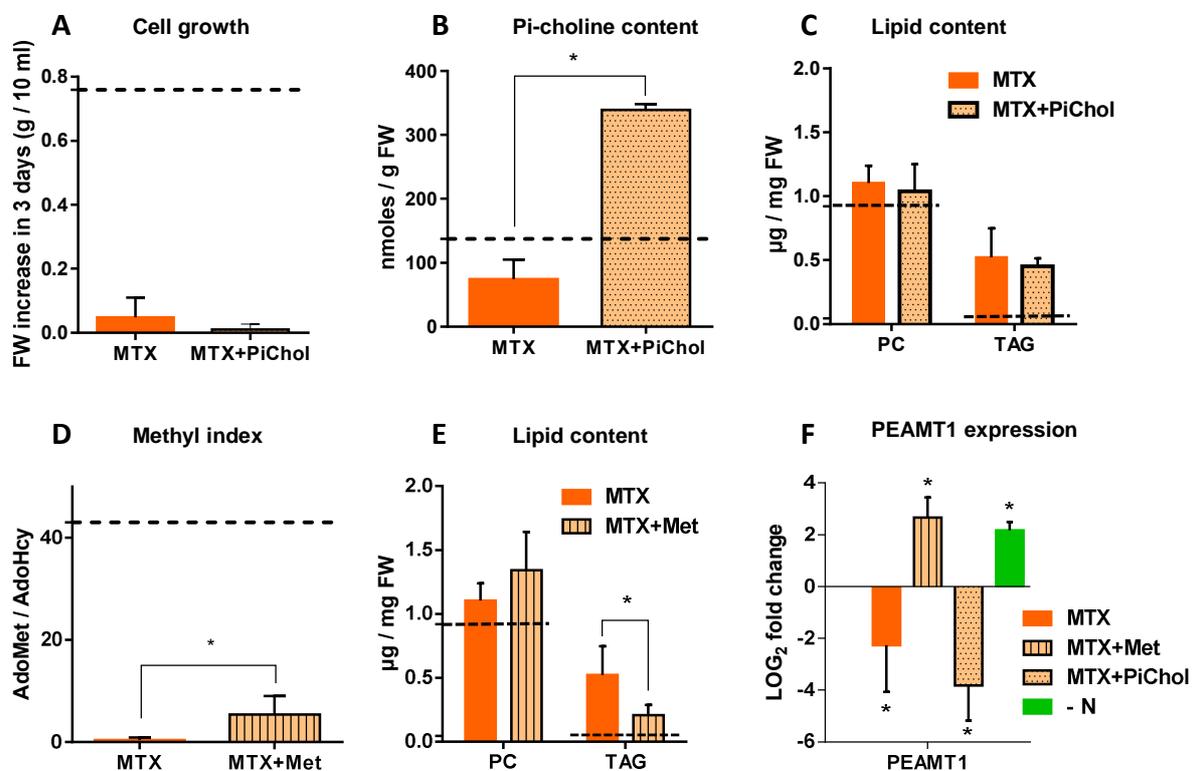


Figure 4 : Attempts to reverse the MTX effects by addition of Pi-choline or Met. Cells were collected and analysed after 72 h of treatment. A, Comparison of the fresh weight at 72h

when cells were grown in the presence of MTX or MTX + Pi-choline. The initial cell concentrations at t=0h were 0.3 g per 10 mL of culture in all conditions. B, Intracellular concentration of Pi-choline. C, PC and TAG content in MTX and MTX + Pi-choline treated cells. D, AdoMet/AdoHcy ratio. E, PC and TAG content in MTX and MTX + Met treated cells. F, Effects of MTX, MTX+Met, MTX+Picholine and nitrogen deficiency on the relative expression of *PEAMT1*; results are expressed as LOG2 fold change versus the control conditions. The dotted lines (A to E) represent the values recorded in control cells. For all data, the values are means \pm SD of 4 (MTX) and 3 (all the other conditions) independent biological repeats, except for the measurements of TAG in MTX and MTX+Met where there were five biological repeats. Significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by an unpaired multiple t test using GraphPad Prism software.

Lipid composition in nitrogen deficient cells

In the second case study, and in contrast with what was observed in the presence of MTX, the total amount of glycerolipids (estimated by the total amount of FA) was not significantly affected (**Fig. 5A**), but there was a strong remodeling concerning the relative proportions of each glycerolipid class. Indeed, the global content of membrane glycerolipids, phospholipids and galactolipids, decreased by a factor of two (**Fig. 5B**), a decrease seen in all species except DAG. At the opposite, TAG increased 60 times, an accumulation confirmed by the apparition of lipid droplets (**Fig. 5D**). Thus, DAG was the only glycerolipid whose concentration remained constant, indicating that this important metabolic hub was tightly regulated. These data strongly suggest that nitrogen-starved cells had a membrane network markedly reduced compared to control cells. However, the distribution of the various membrane lipids (all glycerolipids except TAG) appeared quite robust (**Fig. 5C**) and did not differ much from the control, except for a slight decrease of MGDG and a slight increase of DGDG and PC that were already observed in leaves from Arabidopsis seedlings grown in a nitrogen deficient medium (*Gaude et al., 2007*). They also raise, as for the first case study, the question of the origin of TAG. Indeed, were TAG produced either *de novo* from three sequential acylation reactions combining glycerol-3-Pi and FA from the acyl-CoA pool (Kennedy pathway), or at the expense of membrane lipids using DAG skeletons issued from phospholipid turnover/breakdown? To further examine this process, we compared in the two case studies the FA composition of the acyl-CoA pool with those of TAG and PC, we measured the expression levels of genes potentially involved in the interconversion of PC, DAG and TAG, and we undertook PC feeding experiments.

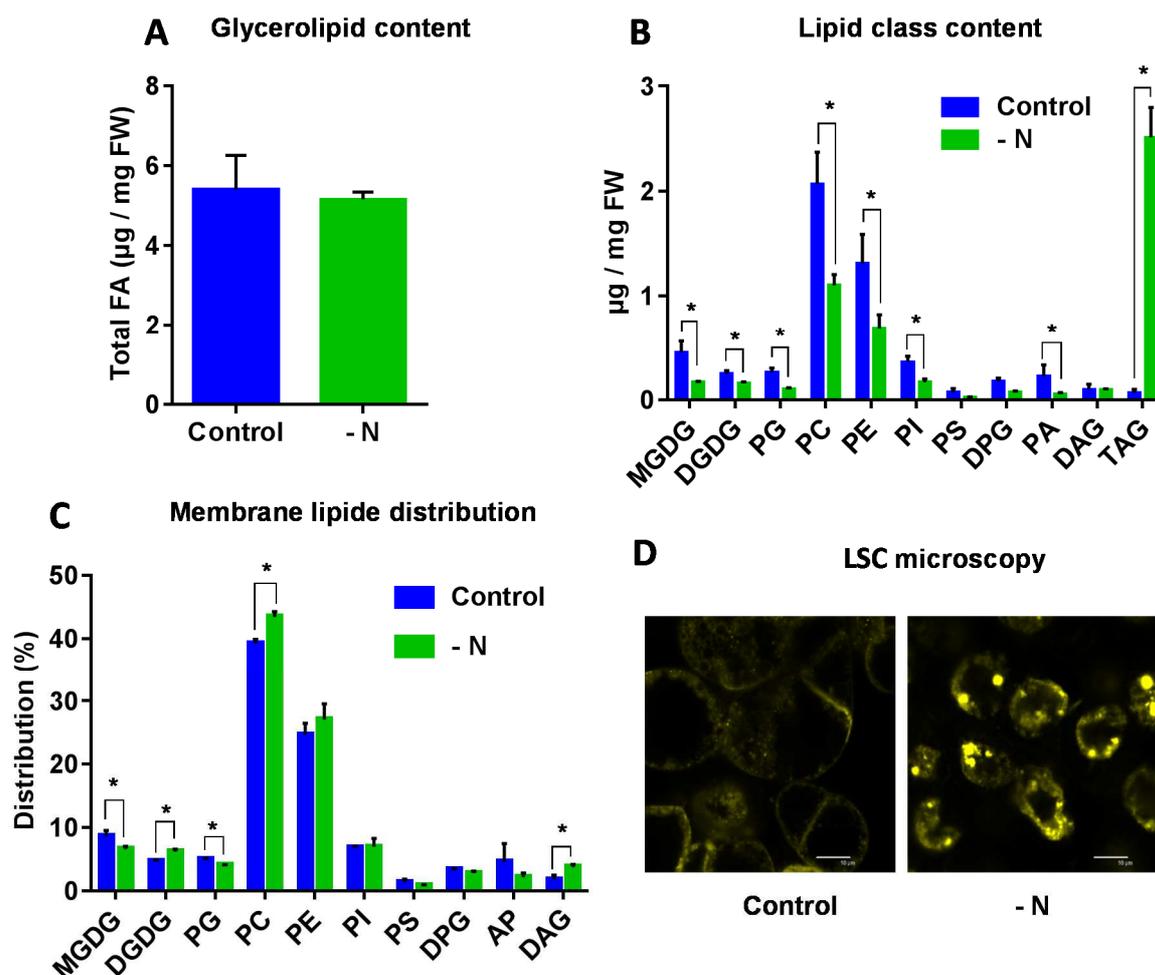


Figure 5 : Lipid analysis of *A. thaliana* cells grown under nitrogen limiting conditions for 72h. A, Total glycerolipid content expressed as μg of FA per mg of fresh weight. B, Quantitative analysis of the various glycerolipids (expressed as μg of FA per mg of fresh weight). C, Membrane lipid distribution: all glycerolipids except TAG. D, Nile-Red staining and LSC microscopy imaging showing an accumulation of lipid droplets in MTX treated cells. The data are means \pm SD of three independent biological repeats. Significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by an unpaired multiple t test using GraphPad Prism software.

What is the origin of TAG in MTX-treated and nitrogen-deprived cells?

FA composition

As shown (Fig. 6A), the acyl-CoA pool was modified by the MTX treatment and increased by nearly a factor of two compared to control cells, reflecting the overall increase of FA previously observed (see Fig. 3C). However, the acyl-CoA pool composition in MTX-treated and control cells were quite different from the one observed in TAG (Fig. 6C, 6D). The dominant FA species within the acyl-CoA pool were 16C, whereas 18C represented less than 50 % of the total, with 18:1 being the most abundant. In contrast, the dominant FA species in TAG were 18C, representing about 70% of the total, with a marked predominance of 18:3, as it was observed

in PC. Noticeably, TAG and PC displayed similar FA compositions, supporting the idea that even in the MTX-induced hyper accumulation of TAG, the PC-DAG pathway could be prevailing over the Kennedy Pathway.

In the nitrogen-deficient situation, the total acyl-CoA content remained roughly similar to the control (Fig. 6B), here again reflecting the measurements performed on total FA (see Fig. 5A). As for the MTX treatment, the FA composition in TAG did not reflect the acyl-CoA pool, but appeared similar to that of PC (Fig. 6E). In other words, the FA composition in TAG initially recorded (Fig. 6C, control cells) never shifted toward the one found in the acyl-CoA pool even after a 60 times increase of the TAG content. This suggests that the large and rapid accumulation of TAG involved mainly DAG skeleton originating from membrane lipids (PC), rather than the sequential addition on glycerol-3-Pi of three FA directly withdrawn from the acyl-CoA pool (Kennedy pathway).

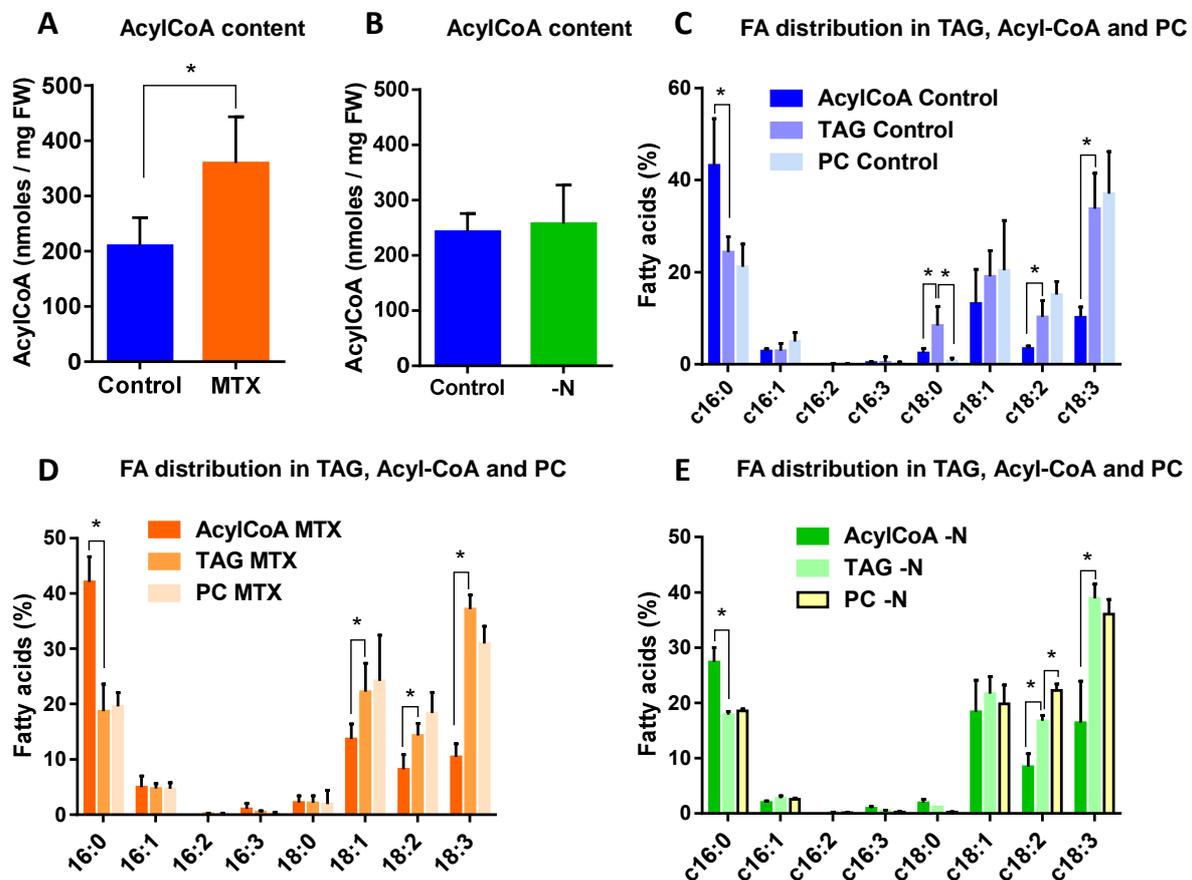


Figure 6 : FA distribution in acyl-CoA, TAG and PC pools in MTX-treated and nitrogen-starved cells of Arabidopsis. A, Impact of the MTX treatment on the total content of the acyl-CoA pool. B, Impact of the nitrogen deficiency on the total content of the acyl-CoA pool. C, FA distribution in acyl-CoA, TAG and PC in control cells. D, FA distribution in acyl-CoA, TAG and PC in MTX-treated cells. E, FA distribution in acyl-CoA, TAG and PC in nitrogen-starved cells. The data are means \pm SD of respectively five and three independent biological repeats for MTX

and –N conditions. Significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk and were calculated by an unpaired multiple t test using GraphPad Prism software.

Transcriptomic analyses of genes involved in TAG synthesis

To further confirm this hypothesis, we looked for the effects of MTX and nitrogen starvation on the expression levels of genes involved in PC-DAG interconversion and TAG synthesis (**Fig. 7 and Supplementary Table 1**). In nitrogen deficient cells, the most induced genes were *NPC4*, *NPC5* and *DGAT1*, which might link membrane lipid turnover with TAG synthesis, as suggested by the above results. Interestingly, the expression of the two first acyltransferases required for the *de novo* synthesis of DAG in the endoplasmic reticulum, *GAPT9* and *LPAT2*, did not appear to be enhanced in the nitrogen deficient situation. On the contrary, *GAPT9* displayed a tendency to decrease, although it was by less than a factor of two. Since *GAPT9* was shown to be an essential gene involved in TAG synthesis in oilseeds (*Shockey et al., 2016*), this observation further supports the hypothesis of a recycling of lipids rather than only a *de novo* synthesis through the Kennedy pathway. Interestingly, the other genes involved in PC-to-TAG conversion such as *PDCT*, *PDAT* and *LPCAT* were not significantly impacted.

In the MTX-treated cells, only *NPC4* and *NPC5* were significantly enhanced. *DGAT1* showed a tendency to increase but varied by less than a factor of two. Since MTX-treated cells accumulated less TAG than nitrogen-deficient ones, it is possible that the initial level of *DGAT1* expression was sufficient to sustain the flux of carbon toward TAG synthesis. Finally, *GAPT9* and *LPCAT2* were repressed, as observed in the nitrogen depletion.

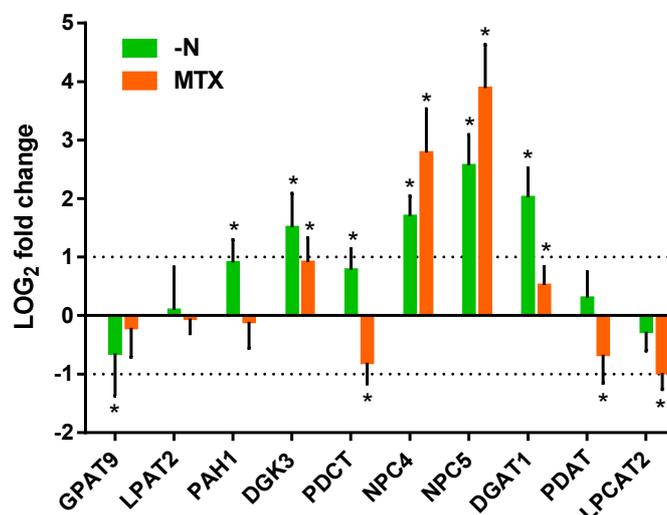


Figure 7 : Effects of MTX and nitrogen deficiency on the relative expression of genes involved in TAG synthesis. Analyses were made after 72h of treatment. Results are expressed as LOG2 fold changes versus the control conditions. See Fig. 2 for gene abbreviations. The values between the dotted lines correspond to less than a twofold change. The data are means \pm SD of three independent biological repeats. Significant differences ($P < 0.05$) are shown by an asterisk. Statistical analyses were done with GraphPad Prism software using the Holm-Sidak method with $\alpha = 5\%$.

PC feeding experiments in MTX-treated and N-deprived cells

The strong increase of *NPC4* and *NPC5* expressions in MTX-treated cells suggests a high rate of PC-to-DAG conversion, although there was no apparent decrease of the membrane networks in this condition. To verify this point, control, MTX-treated and nitrogen-deprived cells were incubated for three days in the presence of PC having a FA labeled with a fluorescent dye located at its *sn*-2. As shown in **Figure 8A and 8C**, control cells mainly displayed a uniform fluorescence pattern presumably representing the membrane network where PC was incorporated. In MTX-treated cells, however, there was a high number of fluorescent dots not seen in control cells, suggesting fluorescent lipid droplet formation. Similar results were observed in cells grown in nitrogen-deficient media. To confirm this assumption, we extracted lipids from these cells and ran a TLC to separate neutral lipids (**Fig. 8B and 8D**). Fluorescent standards were synthesized to identify the lipids present in the extract (see the Materials and Methods section). In each condition, the fluorescence present in the extract was quantified and its distribution in the different classes was calculated (**Fig. 8E**). In control cells, fluorescent PC represented 80% of the fluorescent lipids indicating that it was very little metabolized. However, it represented only 60% and 30% in the nitrogen-deprived and MTX-treated cells, respectively, suggesting that labeled PC was metabolized more quickly in these two conditions. In cells grown in a media devoid of nitrogen where there is a strong membrane remodeling, it is likely that the externally added PC was in competition for its catabolism with the endogenous PC initially present in membranes (at least in the early hours of starvation). This is a different situation in MTX-treated cells where the production of TAG was not associated with such a membrane breakdown. The fluorescent DAG pool remained almost the same in all situations which might indicate that this pool has reached a steady-state with regard to labeling after three days. Although this fluorescent PC was probably not a good substrate for PC metabolizing enzymes, some labeling could also be observed in TAG. Labeled TAG were respectively 5 and 4 times higher in MTX-treated and nitrogen-deprived cells compared to their respective controls. In both situations, fluorescent free FA were also released from the fluorescent PC, suggesting phospholipase activities. Although previously reported genome-scale transcriptomic studies have shown that most phospholipase A (*PLA1* and *PLA2*) expressions were not significantly affected by a MTX treatment (Loizeau et al., 2008), it remains possible that phospholipases A contributed with NPC to the production of the FA used in TAG formation. Since the fluorescent FA was located at the *sn*-2 position of the glycerol backbone, its accumulation as free FA could also be representative of the editing process. Taken as a whole, these results are in line with the other data reported here and support a higher rate of PC turnover/breakdown in MTX-treated and nitrogen-starved cells, leading to DAG then TAG. Whether TAG were being derived from DAG skeleton issued from PC, as suggested by the increased expression of NPC, or through a specific acyl-CoA pool which had been filled with the acyl editing of PC, or both, remained an open question.

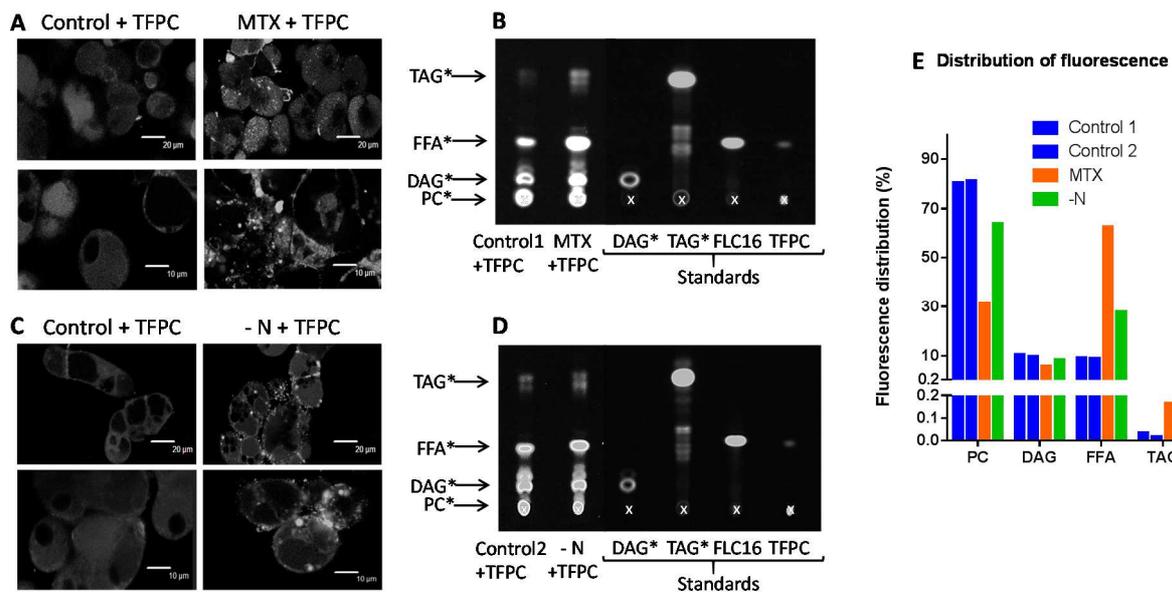


Figure 8 : Fluorescent PC catabolism in control, MTX-treated and nitrogen-deprived cells. A, C, Confocal microscopy of cells incubated for three days in the presence of TFPC. Two magnification are shown for both types of cells: 20 μm (upper images) and 10 μm (lower images). The fluorescence of the chromophore was measured at 503 nm following excitation at 488 nm. B, D, Thin layer chromatography (TLC) of neutral lipids showing the effects of MTX and nitrogen starvation on PC to TAG conversion. Control, MTX-treated and nitrogen deprived cells, were incubated for 3 days in the presence of 20 nM TopFluor[®] PC, as described in the material and methods section. Then, cells were rinsed to remove the labeled PC before collection and lipid extraction. 100 μg lipids were deposited on the TLC and run with various standards. Fluorescence was measured at 503 nm following excitation at 488 nm. The standards BODIPY[®] FL C16 (FLC16), TopFluor[®] PC (TFPC), Mono-labeled DAG (DAG*), monolabeled TAG (TAG*) were prepared as described in the material and methods section. The cross indicates the initial deposit. E, Distribution of the fluorescence in the different classes of lipids. Quantification were made from the TLC shown in B and D, using the ImageJ software.

DISCUSSION

In the present work, two different situations leading to TAG accumulation were compared and analysed for their glycerolipid contents and transcriptomic profiles. In the first one we used the antifolate drug MTX. In the second one we used nitrogen deprivation, a more physiological situation known to trigger TAG accumulation in plants and microalgae. Although it is not clear about how MTX treatment and nitrogen deprivation result in TAG accumulation, these two different conditions provide useful tools to eventually highlight common answers and to study the relationships between membrane lipids and storage lipids.

PC homeostasis

An important observation from our comparative studies lies in the fact that the presence of MTX impaired Pi-choline biosynthesis. This result is supported by a decreased level of *PEAMT* expression, and a decrease by a factor of two of the intracellular Pi-choline concentration. In spite of these, the PC steady-state level remained constant. Similar results were obtained in rat in which MTX treatments induced an increase of TAG in the liver without affecting the PC content (*Pomfret et al., 1990*). It is clear that in our experimental conditions the membrane expansion is blocked and the need for new PC molecules is limited. However, PC generally displays a dynamic turnover, exchanging acyl chains with DAG and TAG. In particular, several reactions such as those catalyzed by PDCT and NPC involve the interconversion of PC and DAG with the removal or addition of the polar head group. In the presence of MTX, NPC4 and NPC5 (coding for enzymes respectively localized in the plasma membrane and in the cytosol (*Gaude et al., 2008*)) were highly expressed and the rate of PC-to-DAG conversion was enhanced, strongly supporting the idea of a high turnover between PC and DAG. To maintain PC homeostasis in such circumstances it is likely that a very efficient recycling of the small pool of Pi-choline is required to compensate its reduced rate of production. In all the conditions we have tested, PC homeostasis was maintained, even in situations which would *a priori* have favored its synthesis, such as in the presence of Pi-choline or Met. Taken together, these results support that the amount of PC was tightly regulated in our experimental conditions and could not fluctuate easily. In other words, the proportion of PC required in the membrane architecture appeared quite robust, representing in all our experimental conditions about $40 \pm 5\%$ of the membrane glycerolipids. Even in nitrogen-deficient cells where the PC concentration decreased two times, it represented about 40 % of the membrane lipids since all membrane lipids decreased. How PC synthesis and turnover were coordinated with membrane expansion and cell division remains unclear. It was shown that phosphatidic acid phosphohydrolase (PAH), the enzyme involved in the conversion of PA to DAG, regulates PC synthesis in the ER, and that *pah* mutants displayed a higher expression of *PEAMT1* and a higher rate of PC synthesis (*Eastmond et al., 2010*). In our MTX condition, however, the expression of *PAH1* remained unchanged, suggesting that at least the expression of this gene was not a key component in the regulation of MTX-mediated TAG accumulation in Arabidopsis cell cultures.

TAG accumulation in non-seed organs.

Most of the studies leading to our current understanding of TAG synthesis in higher plants were conducted in oilseeds that are specialized organs genetically programmed to accumulate TAG. Mesophyll cell suspension cultures are not known for accumulating oil in standard conditions, and the data described here were metabolic answers to stress situations. The most striking effect observed after MTX addition was a 10-15 fold increase in the amount of TAG. This is a specific effect resulting from the blocking of THF synthesis since it was largely reversed by the addition of 5-FTHF, a folate compound often considered as an antidote of MTX. The associated decline of the C1 metabolism has broad effects on cell physiology, including growth

arrest due to the impairment of DNA synthesis and perturbation of the methylation reactions, which in turn may affect the regulation of metabolism and gene expressions. Other growth inhibitors such as 5-FU and taxol also triggered TAG accumulation, although not at the same level, indicating some pleiotropic effects. From this point of view, a phenotypic screening with oleaginous microalgae (of the *Nannochloropsis* and *Phaeodactylum* genus) has been recently published (Franz *et al.*, 2013) indicating that a number of very efficient molecules triggering TAG production are primarily growth inhibitors. However, the level of the accumulation is likely linked to the pathway that is targeted. The reversal of MTX-dependent TAG accumulation by the presence of Met suggests, indeed, that part of this accumulation was connected to methyl transfer reactions. The connection between lipids and C1 metabolism is, *a priori*, at the level of PC synthesis which requires several methylation reactions catalyzed by PEAMT or PLMT. Our attempts to alleviate or bypass the MTX-induced bottleneck of Pi-choline synthesis did not succeed in restoring a normal situation regarding TAG accumulation. As a matter of fact, addition of Pi-choline, the direct product of PEAMT, resulted in a level of TAG accumulation close to that observed with MTX alone. Collectively, our data suggest that, in contrast to what is observed in animals, the MTX-dependent accumulation of TAG in higher plants is not directly linked to the inhibition of Pi-choline synthesis. The regulatory mechanisms that direct carbon fluxes towards either membrane or storage lipids remain to be understood. These two fluxes are probably in competition, the synthesis of membrane lipids (which is connected with cell division) having priority over the synthesis of storage lipids. To date the relationship between cell division and TAG metabolism has been mostly studied in yeast. On nutrient rich media, when yeast cells are actively proliferating, there is a rapid turnover of TAG to release fatty acids to sustain membrane growth and cell surface expansion (Kurat *et al.*, 2006; Zanghellini *et al.*, 2008; Kohlwein, 2010). In these organisms, TAG synthesis and degradation fluctuate according to the cell division cycle. Inhibiting nucleotide synthesis with MTX should irreversibly block cell division at the G1/S interphase.

The MTX-dependent TAG accumulation observed here corresponded to a net increase of lipids, with little change in the membrane glycerolipid composition. The situation was the opposite in nitrogen deficient cells where membrane glycerolipids dropped by a factor of two, whereas the total lipid content did not change much. Thus, TAG represented about 50% of total lipids in these nitrogen-deprived cells. It is likely that in the absence of protein synthesis, cells could not maintain their membrane networks, and that FA normally stored into phospho- and galactolipids were redirected toward storage lipids. It is interesting to note that the FA composition in TAG was always similar to the one found in PC and quite different from the one in the acyl-CoA pool. Indeed, in all conditions the acyl-CoA pool contained more 16:0 and less 18:2 and 18:3 than TAG or PC. Even in situations where TAG were accumulating, the TAG composition remained closer to the one of PC than to the one of acyl-CoA. This strongly supports the idea that TAG synthesis in these cells preferentially used FA previously edited at the level of phospholipids (PC). From this point of view, we observed in the MTX and nitrogen deficient conditions a strong increase of *NPC* expressions suggesting a higher activity of nonspecific phospholipase C that could provide, together with PDCT activity (Lu *et al.*, 2009),

the DAG skeletons required for this synthesis. The marked increase of *DGAT1* expression in the case of nitrogen deficiency also supports the idea that, at least in this situation, the third FA originated from the acyl-CoA pool. Alternatively, TAG might be produced from a small and specific pool of edited acyl-CoA, not in equilibrium with the main pool.

In conclusion, these results show differences but also similarities between the two TAG accumulating situations. In the MTX condition, the membrane network was maintained and TAG accumulation corresponded to a net increase of lipids. In the nitrogen deficient situation, the strong TAG accumulation was associated with a decrease of the membrane networks without marked increase of the overall lipid content. In the two situations, the FA composition in TAG and the high *NPC* expressions highlight a route implying PC-DAG conversion, as it is also the case in *Arabidopsis* seeds (*Bates and Browse, 2011; Shockey et al., 2016*). A future challenge will be to clarify the role of NPC in the dynamic exchange between PC and DAG during the course of TAG formation in plant cells and to determine whether this role could be generic or specific to a series of metabolic reprogramming in response to environmental stresses or cell division effectors.

CONCLUSION

The overall goal of this work was to compare two situations limiting the growth of higher plants and triggering the accumulation of storage lipids. In the first situation we used MTX, a chemical drug that inhibits C1 metabolism, whereas the second situation resulted from nitrogen deficiency. We observed differences and similarities in the metabolic responses to these two conditions. Associated with nitrogen deficiency there was a strong decrease of the membrane network, which was not observed in the presence of MTX, possibly resulting from the decline of protein syntheses. In the two situations, the distribution of polar lipids in membranes remained roughly constant. In particular, PC homeostasis appeared quite robust even when the rate of Pi-choline synthesis was affected (MTX). The FA composition in TAG was in both situations similar to the one found in PC suggesting a PC-to-TAG pathway. This hypothesis is also supported by a higher rate of PC catabolism associated with these two growth limiting conditions. This pathway could involve nonspecific phospholipase C, as *NPC* gene expressions were strongly enhanced in the two situations.

MATERIAL AND METHODS

Culture conditions

Arabidopsis thaliana cells (ecotype Columbia) were grown as suspension cultures in 200 mL Murashige and Skoog medium (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA) or in Murashige and Skoog medium devoid of nitrogen (MSP07-10LT, Caisson Laboratories, Inc, USA) and supplemented with 1.5% (w/v) sucrose, 1.2 mg l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 50 mg.l⁻¹ of potassium phosphate monobasic and 39 mg.l⁻¹ of sodium phosphate dibasic. Cultures were kept under continuous light (100 μE m⁻² s⁻¹) at 22°C and agitated with rotary shaking at 125 rpm. Cells were maintained by a 1:9 (culture:fresh media) split every 7 days. Cell growth

was monitored by measuring the fresh weight: 5mL of the culture were removed, filtered on glass microfiber filters (Whatman) and weighted.

Incubation experiments

Arabidopsis thaliana cells were subcultured as described above 48h prior starting the incubation experiment. After 48h, the cells were subcultured again at a concentration of 3 g of cells per 100 mL in fresh MS medium containing or not nitrogen, and let to recover for 5 h. This procedure allows the culture to be in exponential growth phase at the beginning of the experiment. Then, for the nitrogen deficiency experiment, the cells were washed 3 times in a MS medium deprived of nitrogen (MSP09-50LT, Caisson Laboratories, Inc, USA) and let to grow in the same nitrogen-deprived medium for 72h. For the experiments using inhibitors, chemicals (all from Sigma-Aldrich) were then added to the cell culture: Methotrexate 3 μ M, in 100% Tris 50 mM (final Tris concentration in cell culture: 0.6%), 5-formyltetrahydrofolate, 50 μ M, Methionine 2 mM, Pi-Choline 500 μ M, 5-fluorouracil 200 μ M in ultra-pure water and taxol (Paclitaxel) 10 to 50 μ M in DMSO (final DMSO concentration in cell culture: less than 0.1%). Control cells received the equivalent volume of Tris 50 mM or DMSO. Cell growth was monitored every day. After 72 h of incubation, cells were filtered, weighed and frozen in liquid nitrogen for lipid and gene expression analyses. Experiments were performed 3 to 5 times for each condition.

Lipid analysis

Lipid extraction and analysis were performed as previously described (Simionato et al., 2013; Abida et al., 2015). Briefly, 0.5 g of freeze-dried cells were suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 minutes to prevent lipid degradation, and lipids were extracted by addition of 2 mL methanol and 8 mL chloroform at room temperature. After filtration through glass wool, cell debris were rinsed with 3 mL chloroform/methanol 2:1 (v/v) and 5 mL of 1% NaCl were then added to the filtrate to initiate biphasic formation. The chloroform phase was collected and dried under argon before solubilizing the lipid extract in pure chloroform. Total glycerolipids were quantified from their FAs after transformation as methyl esters (FAME), and analysed by a gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) (Perkin Elmer) on a BPX70 (SGE) column, as thoroughly described elsewhere (Jouhet et al., 2003). FAME were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma) and quantified by the surface peak method using 15:0 or 21:0 for calibration. To quantify the various classes of glycerolipids, lipids were separated by thin layer chromatography (TLC) onto glass-backed silica gel plates (Merck) using two distinct resolving systems for polar and neutral lipids, as previously described (Jouhet et al., 2003). Then, they were visualized under UV light, after spraying with 2% 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid in methanol, and scraped off the plate. Lipids were recovered from the silica powder after addition of 4 mL chloroform:methanol 1:2 v/v, thorough mixing and addition of 8 mL chloroform and 3.2 mL H₂O and collection of the chloroform phase (Bligh, 1959). Lipids were then dried under argon and quantified by methanolysis and GC-FID as described above.

Extraction and quantification were performed from 4 to 5 independent biological repeats for the MTX condition, 3 to 5 independent biological repeats for MTX + Met and 3 independent biological repeats for MTX + Pi-choline conditions. To correct inherent variations from one culture to another (Mei *et al.*, 2015), a control was systematically run for each experiment and data were analysed as fold change versus the corresponding controls. Quantifications were normalized by multiplying the experiment / control ratio by the average value of the control. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software using unpaired t test with $\alpha = 5\%$.

Acyl-CoA analysis

Acyl-CoAs were extracted as previously described (Larson and Graham, 2001) from frozen freeze-dried cell culture samples (10 mg d.wt) and analysed using LC-MS/MS + MRM in positive ion mode. The LC-MS/MS + MRM analysis (using an ABSciex 4000 QTRAP Framingham, MA) was performed as described (Haynes *et al.*, 2008) (Agilent 1200 LC system; Gemini C18 column (Phenomenex, Torrance, CA), 2 mm inner diameter, 150 mm length, particle size 5 μm). For the identification and calibration, standard acyl-CoA esters with acyl chain lengths from C14 to C20 were purchased from Sigma as free acids or lithium salts.

AdoMet, AdoHcy and Pi-Choline determinations

Cells, about 0.2 – 0.5 g were frozen and ground in liquid nitrogen using a mortar and a pestle. Grinded cells were allowed to thaw in the presence of 300 μl of acetonitrile / acetic acid 0.5% (50:50, v/v). The cell suspension was centrifuged for 10 min at 14000 rpm (Eppendorf) to remove cell debris, and the pellet was extracted a second time with the acetonitrile / acetic acid mixture. The metabolites were quantified using a LC (Agilent 1100 series) / MS (LTO, Thermofisher) device. The reverse phase chromatographic conditions were: column (Kinetex C18, 2.6 μm , 100x3 mm, Phenomenex); isocratic elution with methanol 20% in acetic acid 0.5%, flow rate 0.2 ml / min. Pi-choline was identified from its retention time (2.2 min) and by the MS2 signal corresponding to the loss of the Pi group (parent ion m/z 184.1, product ion m/z 86.1). AdoMet was identified from its retention time (3 min) and by the MS2 signal corresponding to the loss of the Met group (parent ion m/z 399.1, product ion m/z 250.1). AdoHcy was identified from its retention time (2.7 min) and by the MS2 signal corresponding to the loss of the Hcy group (parent ion m/z 385.4, product ion m/z 250.1). Quantification were performed from at least 3 independent biological repeats for each condition. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software using unpaired t test with $\alpha = 5\%$.

Quantitative RT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR experiments were performed using cDNA synthesized from total RNA isolated from control and treated Arabidopsis cells, according to the manufacturer instructions (RNeasy Plant Mini Kit, Quiagen). Amplification of contaminating DNA was prevented by DNase treatment of RNA samples. Specific primer sequences were designed for each tested gene (Supplemental Table 2). The real-time PCR reactions were carried out on a

Rotor-Gene 3000 instrument (Corbett Research) using SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich). Quantification of gene expression was performed using the comparative Ct method within the Rotor-Gene 3000 Software. Each data were normalized with 3 reference genes chosen for their absence of variation in the MTX condition (*ACT7* -At5g09810; *UBQ5* -At3g62250; *ARP1* -At1g43170). Each value represents the average of three independent biological repeats, each repeat being analysed in triplicates. Statistical analyses were done with GraphPad Prism software using unpaired t test and the Holm-Sidak method with $\alpha = 5\%$.

Laser Scanning Confocal Microscope

Cells, 120 μL , were diluted 2 times in MS media. Image acquisitions were performed on a LSCM (Leica, TCS SP2) and an Apo 45x \ 1.25-0.75 oil immersion objective lens. For Nile red staining, cells were incubated for 20 min with 80 μL of Nile Red staining solution (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in DMSO, Sigma-Aldrich). Light emission corresponding to the Nile red signal was collected from 559 to 603 nm after excitation at 543 nm. Light emission corresponding to the Bodipy[®] signal was collected from 500 to 535 nm after excitation at 488 nm Images were pseudo-coloured.

Fluorescent dye-labeled PC experiments

Fluorescent labeled PC (TopFluor[®] PC, 1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneboron difluoride)undecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) was purchased from Aventi Polar Lipids, Inc. Fluorescent FA (Bodipy[®]FL C16, 4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Hexadecanoic Acid) was purchased from ThermoFisher Scientific. Labeled standard DAG was obtained from digestion of TopFluor PC by phospholipase C (Sigma). 500 μl buffer (50 mM Tris pH 8, 10 mM CaCl_2 , 0.4 mg ml^{-1} BSA) containing 10 μM TopFluor PC were incubated 2h at 37°C in the presence of 10 units of phospholipase C. Then, DAG was recovered by the successive addition of 875 μl of chloroform:methanol 1:2 v/v, 625 μl H_2O , 625 μl CHCl_3 . After centrifugation, the lower organic phase is collected and dried. Labeled standard TAG were obtained following a reaction of esterification between the fluorescent FA and (*S*)-1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol (Sigma). (*S*)-1,2-Dioleoyl-*sn*-glycerol and fluorescent FA were dissolved in dichloromethane and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDCI) was added with a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (DMAP). The mixture was stirred overnight at room temperature. Fluorescent TAG was isolated by flash chromatography (silica gel, 20% cyclohexane/dichloromethane). For cell labeling experiments, cells were grown in the presence of 500 nM TopFluor[®] PC dissolved in pure ethanol (final concentration of ethanol 0.05%) for 3 days with or without MTX or nitrogen as described above. Then, cells were rinsed 3 times with fresh media to remove the extra TopFluor[®] PC before collection for confocal microscopy and lipid extraction. Neutral lipids were separated by TLC, as described above, and compared for their migration with labeled standards. Fluorescence of labeled lipids was measured at 503 nm following excitation at 488 nm (ChemiDoc imaging system, Biorad). Pixels were quantified using the ImageLab software (Biorad).

Author Contribution

CM, MC, RH, FB and FR performed the experiments. CM, EM and FR designed, supervised and analysed the experiments. All authors contributed to the writing of the article.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Valérie Gros for her skill technical assistance and the Région Rhône-Alpes for supporting this work and the PhD fellowship of Coline Meï. We particularly thank Morgane Michaud, Juliette Jouhet and Maryse Block for their attentive reviewing of the manuscript.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Protein	Atg number	MTX		MTX + Met		MTX + Pi-chol		- N	
		Avg.	StD.	Avg.	StD.	Avg.	StD.	Avg.	StD.
NPC4	AT3G03530	7.77*	3.84	56.54*	51.41	5.77*	2.49	3.33	0.77
NPC5	AT3G03540	16.69*	9.20	48.31*	26.41	5.72*	2.69	5.83	2.60
PDAT	AT5G13640	0.66*	0.22	0.48*	0.24	nd		1.28	0.37
DGAT1	AT2G19450	1.47*	0.38	0.82	0.32	0.72	0.65	4.01	1.63
DGAT2	AT3G51520	0.42*	0.31	nd		nd		2.19	0.71
LPCAT1	AT1G12640	1.45	0.86	nd		nd		1.18	0.33
LPCAT2	AT1G63050	0.52*	0.10	0.52	0.28	nd		0.84	0.17
PDCT	AT3G15820	0.59*	0.14	1.27	1.02	nd		1.76	0.37
PEAMT1	AT3G18000	0.35*	0.28	7.15*	3.50	0.09*	0.08	4.59	0.99
PEAMT2	AT1G48600	0.48	0.36	1.89	0.97	nd		nd	
PEAMT3	AT1G73600	0.45*	0.25	2.30*	0.55	0.44*	0.38	0.29	0.11
AAPT1	AT1G13560	0.74	0.46	0.59*	0.29	0.50	0.44	nd	
CCT1	AT2G32260	0.70	0.35	0.83	0.36	0.18*	0.16	nd	
PLMT	AT1G80860	1.19	0.72	0.73	0.38	0.30*	0.26	nd	
GPAT9	AT5G60620	0.91	0.32	nd		nd		0.71	0.33
LPAT2	AT3G57650	0.98	0.18	nd		nd		1.18	0.55
PAH1	AT3G09560	0.97	0.27	0.64*	0.25	nd		1.92	0.49
DGK1	AT5G07920	1.1	0.6	0.61	0.22	nd		nd	
DGK3	AT2G18730	1.95*	0.5	0.72*	0.22	nd		3.1	1.3
DGK7	AT4G30340	1.49	1.3	1.82*	0.38	nd		nd	

Table S1 : Expression of genes involved in TAG and PC syntheses in cells cultivated in presence of MTX, MTX + Met and MTX + Pi-choline. Analyses were performed after 72h of treatment. RT-qPCR data in each condition are expressed as fold change versus the respective controls (no MTX). The values showing more than a twofold change versus controls are in bold. nd=not determined. The data are means \pm SD of five biological repeats for the MTX condition and three for the other conditions. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software using unpaired t test and the Holm-Sidak method with $\alpha = 5\%$.

Gene name	Atg number	Primer sequence 5' - 3'	
		Forward	Reverse
<i>PEAMT1</i>	AT3G18000	TGAGCACTGGTGGACTTGAGACAA	GCTGAGTCCAATAGCACGTTCCA
<i>PEAMT2</i>	AT2G44170	ATG GGT CAA GCC AGG GGG AT	GCC CCA ATG CAT TTG CAG CCA
<i>PEAMT3</i>	At1G73600	CTTTGACGTGGATGTTGTGG	TGGTGCAATCAGCTACTTCG
<i>CCT1</i>	AT2G32260	ATGCTGCGCAACGAGTGGGT	TCTCCAGCCTCTCTGCCGACTT
<i>AAPT1</i>	AT1G13560	TTTACCGCCACCGGACCATCTG	GCGTTATCATGTTTGGTGGCATCC
<i>PLMT</i>	AT1G80860	AATGCTCGTGCCAAATCCATCTCA	TCCAGTTGGTTCTTTGCAGCAGATG
<i>NPC4</i>	AT3G03530	GTGATAGGTGGTTTGCCTCGGT	AAGAGAGTGAAGGAGGGAATTGGT
<i>NPC5</i>	AT3G03540	GCCTGGCACAGTTCTTCATGGG	CCGATTTGACAATGTTTCAGGGCA
<i>PDCT</i>	AT3G15820	TCGCGTATTAGCATCTTCACCGGA	GAAAGTCCTGAGGGAGAGGAAGCTG
<i>DGAT1</i>	AT2G19450	AGTCCACTTAGCTCCGACGCA	TGAAAAGCGGCCAATCTCGCA
<i>PDAT</i>	AT5G13640	GCGTGGTGCCGCTCATTCT	TGCAACTGTCGGGAGACTGGT
<i>LPCAT2</i>	AT1G63050	ACTCATCCGTCGGTTTCATGGTTTT	AGTAGCTGAGAAGAAGCACAGCGA
<i>GPAT9</i>	AT5G60620	CCACAAACCATAAGGCCCGGTG	TGCGAAACTCTGTTGCTTGCGT
<i>LPAT2</i>	AT3G57650	AGTTGACTGGTGGGCTGGAGTT	GCAACCTGACCGCTGAGCC
House keeping genes			
<i>ACTINE 7</i>	AT5G09810	ATGGAACTGGAATGGTGAAGGC	GGACGACCAACAATACTTGGGAAC
<i>ARP1</i>	AT1G43170	AGGTTGGTACTGAGGCACACAC	AGTCACATCCTTCTCAGTCCTGTC
<i>UBIQUITINE 5</i>	AT3G62250	ATAATCTTCAGCAGCCGTTGCC	ACCTCAAGGGTTATGGTCTTCCC

Table S2 : Primer sequences used for RT-qPCR analysis of the genes involved in PC and TAG syntheses in Arabidopsis cells.

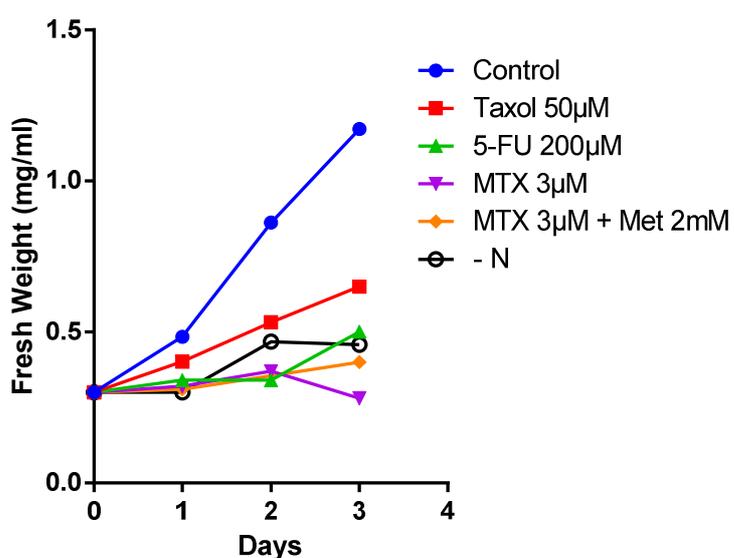


Figure S1: Representative growth curves showing the effect of the various inhibitors used in Fig2. Arabidopsis cells were cultured in 100 ml flasks and the growth of the population was followed for 3 days through the increase of the fresh weight. After 3 days (end of the exponential phase of growth for control cells), cells were collected for analyses.

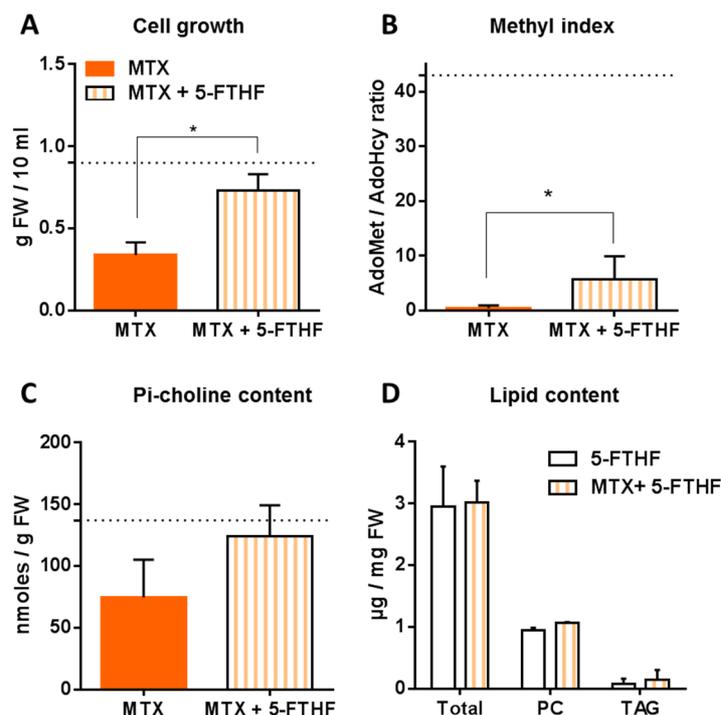


Figure S2 : Attempts to reverse the MTX effects by 5-Formyltetrahydrofolate (5-FTHF). Cells were collected and analysed after 72h of treatment. A, Fresh weight at 72h. The initial cell concentrations at t=0h were 0.3 g per 10mL of culture in all conditions. The upper dotted line represents the fresh weight of the control condition after 72h. B, AdoMet / AdoHcy ratio. C, Pi-choline concentration. D, Total glycerolipid, PC and TAG contents expressed as µg of FA per mg of fresh weight. The data are means ± SD of three different biological repeats.

Statistical analyses were done with GraphPad Prism software.

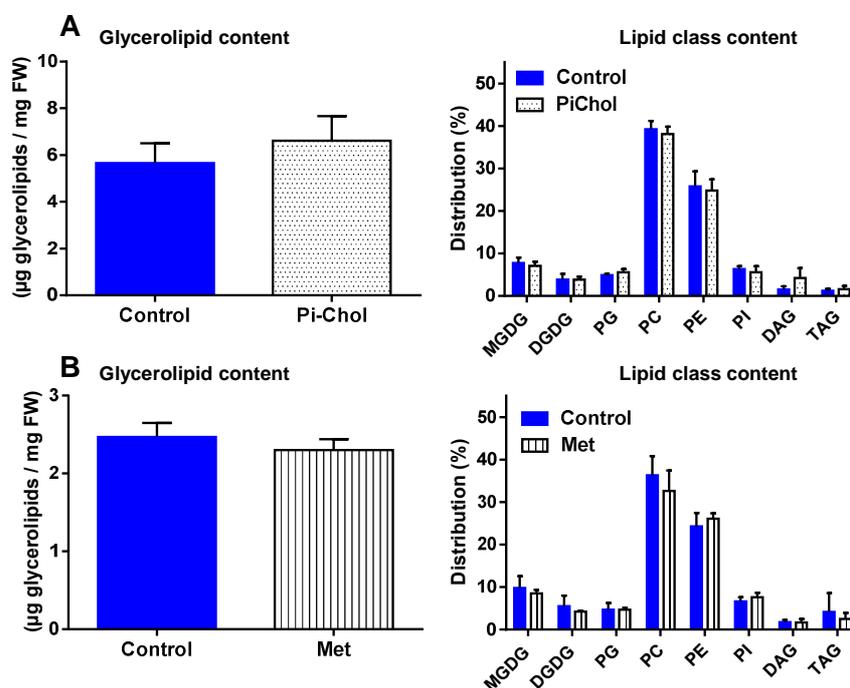


Figure S3 : Effect of Pi-choline (A) and Met (B) on the glycerolipid distribution in Arabidopsis cells. Cells were collected and analysed after 72h of treatment. Each result is the average of at three biological repeats ± SD.

REFERENCES

- Abida H, Dolch L-J, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rebeille F, Petroutsos D, Jouhet J, Marechal E** (2015) Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* **167**: 118-136
- Bates PD** (2016) Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*
- Bates PD, Browse J** (2011) The pathway of triacylglycerol synthesis through phosphatidylcholine in *Arabidopsis* produces a bottleneck for the accumulation of unusual fatty acids in transgenic seeds. *Plant Journal* **68**: 387-399
- Bates PD, Browse J** (2012) The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Frontiers in Plant Science* **3**
- Bates PD, Fatihi A, Snapp AR, Carlsson AS, Browse J, Lu C** (2012) Acyl Editing and Headgroup Exchange Are the Major Mechanisms That Direct Polyunsaturated Fatty Acid Flux into Triacylglycerols. *Plant Physiology* **160**: 1530-1539
- BeGora MD, Macleod MJR, McCarry BE, Summers PS, Weretilnyk EA** (2010) Identification of Phosphomethylethanolamine N-Methyltransferase from *Arabidopsis* and Its Role in Choline and Phospholipid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 29147-29155
- Bligh EG, and Dyer, W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917
- Botte CY, Deligny M, Rocca A, Bonneau A-L, Saidani N, Hardre H, Aci S, Yamaryo-Botte Y, Jouhet J, Dubots E, Loizeau K, Bastien O, Brehelin L, Joyard J, Cintrat J-C, Falconet D, Block MA, Rousseau B, Lopez R, Marechal E** (2011) Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology* **7**: 834-842
- Boudiere L, Botte CY, Saidani N, Lajoie M, Marion J, Brehelin L, Yamaryo-Botte Y, Satiat-Jeunemaitre B, Breton C, Girard-Egrot A, Bastien O, Jouhet J, Falconet D, Block MA, Marechal E** (2012) Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Molecular Biosystems* **8**: 2023-2035
- Burgal J, Shockey J, Lu C, Dyer J, Larson T, Graham I, Browse J** (2008) Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 819-831
- Carman GM, Henry SA** (2007) Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37293-37297
- Chen JE, Smith AG** (2012) A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. *Journal of Biotechnology* **162**: 28-39

- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne H** (2000) Phospholipid : diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6487-6492
- Eastmond PJ, Quettier AL, Kroon JT, Craddock C, Adams N, Slabas AR** (2010) Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 2796-2811
- Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, Anderson LA, Boothe JR** (2013) Phenotypic Screening with Oleaginous Microalgae Reveals Modulators of Lipid Productivity. *Acs Chemical Biology* **8**: 1053-1062
- Gaude N, Brehelin C, Tischendorf G, Kessler F, Doermann P** (2007) Nitrogen deficiency in Arabidopsis affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant Journal* **49**: 729-739
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible W-R, Ohta H, Doermann P** (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis. *Plant Journal* **56**: 28-39
- Haynes CA, Allegood JC, Sims K, Wang EW, Sullards MC, Merrill AH, Jr.** (2008) Quantitation of fatty acyl-coenzyme As in mammalian cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* **49**: 1113-1125
- Inatsugi R, Kawai H, Yamaoka Y, Yu Y, Sekiguchi A, Nakamura M, Nishida I** (2009) Isozyme-Specific Modes of Activation of CTP:Phosphorylcholine Cytidylyltransferase in Arabidopsis thaliana at Low Temperature. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1727-1735
- Jost R, Berkowitz O, Shaw J, Masle J** (2009) Biochemical characterization of two wheat phosphoethanolamine N-methyltransferase isoforms with different sensitivities to inhibition by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **284**: 31962-31971
- Jouhet J, Marechal E, Bligny R, Joyard J, Block MA** (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett.* **544**: 63-68
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N** (2010) Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res* **49**: 128-158
- Keogh MR, Courtney PD, Kinney AJ, Dewey RE** (2009) Functional Characterization of Phospholipid N-Methyltransferases from Arabidopsis and Soybean. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 15439-15447
- Kim HU, Li Y, Huang AH** (2005) Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1073-1089
- Kohlwein SD** (2010) Triacylglycerol Homeostasis: Insights from Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 15663-15667
- Kudo Y, Abe A, Ito K, Cho Y, Yotsu-Yamashita M, Konoki K** (2014) Expression of recombinant alpha and beta tubulins from the yew *Taxus cuspidata* and analysis of the microtubule

- assembly in the presence of taxol. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **78**: 1887-1894
- Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Scholz H, Zimmermann R, Leber R, Zechner R, Kohlwein SD** (2006) Obese yeast: Triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 491-500
- Lager I, Yilmaz JL, Zhou X-R, Jasieniecka K, Kazachkov M, Wang P, Zou J, Weselake R, Smith MA, Bayon S, Dyer JM, Shockey JM, Heinz E, Green A, Banas A, Stymne S** (2013) Plant Acyl-CoA: Lysophosphatidylcholine Acyltransferases (LPCATs) Have Different Specificities in Their Forward and Reverse Reactions. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 36902-36914
- Larson TR, Graham IA** (2001) A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant Journal* **25**: 115-125
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welte R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J** (2013) Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **11**: e0161-e0161
- Li R, Yu K, Wu Y, Tateno M, Hatanaka T, Hildebrand DF** (2012) *Vernonia* DGATs can complement the disrupted oil and protein metabolism in epoxygenase-expressing soybean seeds. *Metabolic Engineering* **14**: 29-38
- Loizeau K, De Brouwer V, Gambonnet B, Yu A, Renou JP, Van Der Straeten D, Lambert WE, Rebeille F, Ravanel S** (2008) A Genome-Wide and Metabolic Analysis Determined the Adaptive Response of Arabidopsis Cells to Folate Depletion Induced by Methotrexate. *Plant Physiology* **148**: 2083-2095
- Loizeau K, Gambonnet B, Zhang GF, Curien G, Jabrin S, Van der Straeten D, Lambert WE, Rebeille F, Ravanel S** (2007) Regulation of one-carbon metabolism in arabidopsis: The N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation. *Plant Physiol* **145**: 491-503
- Lu C, Napier JA, Clemente TE, Cahoon EB** (2011) New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 252-259
- Lu C, Xin Z, Ren Z, Miquel M, Browse J** (2009) An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 18837-18842
- McNeil SD, Nuccio ML, Rhodes D, Shachar-Hill Y, Hanson AD** (2000) Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. *Plant Physiology* **123**: 371-380
- Mei C, Michaud M, Cussac M, Albrieux C, Gros V, Maréchal E, Block MA, Jouhet J, Rébeillé F** (2015) Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures. *Scientific Reports* **5**: 15207

- Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K, Ohta H** (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in Arabidopsis. *J Biol Chem* **280**: 7469-7476
- Nakamura Y, Koizumi R, Shui G, Shimojima M, Wenk MR, Ito T, Ohta H** (2009) Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20978-20983
- Nakamura Y, Tsuchiya M, Ohta H** (2007) Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 29013-29021
- Neuburger M, Rebeille F, Jourdain A, Nakamura S, Douce R** (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *J Biol Chem* **271**: 9466-9472
- Pomfret EA, Dacosta KA, Zeisel SH** (1990) Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon rat-liver. *Journal of Nutritional Biochemistry* **1**: 533-541
- Ravanel S, Douce R, Rebeille F** (2011) Metabolism of Foliates in Plants. *In F Rebeille, R Douce*, eds, *Biosynthesis of Vitamins in Plants: Vitamins B6, B8, B9, C, E, K - Pt B*, *Advances in Botanical Research*, Vol 59. Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London, pp 67-106
- Shimojima M, Madoka Y, Fujiwara R, Murakawa M, Yoshitake Y, Ikeda K, Koizumi R, Endo K, Ozaki K, Ohta H** (2015) An engineered lipid remodeling system using a galactolipid synthase promoter during phosphate starvation enhances oil accumulation in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**
- Shockey J, Regmi A, Cotton K, Adhikari N, Browse J, Bates PD** (2016) Identification of Arabidopsis GPAT9 (At5g60620) as an Essential Gene Involved in Triacylglycerol Biosynthesis. *Plant Physiology* **170**: 163-179
- Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Marechal E, Finazzi G, Morosinotto T** (2013) The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* **12**: 665-676
- Singh A, Nigam PS, Murphy JD** (2011) Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology* **102**: 26-34
- Slack CR, Campbell LC, Browse JA, Roughan PG** (1983) Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons *in vivo*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **754**: 10-20
- Tjellstroem H, Yang Z, Allen DK, Ohlrogge JB** (2012) Rapid Kinetic Labeling of Arabidopsis Cell Suspension Cultures: Implications for Models of Lipid Export from Plastids. *Plant Physiology* **158**: 601-611
- Tsai C-H, Warakanont J, Takeuchi T, Sears BB, Moellering ER, Benning C** (2014) The protein Compromised Hydrolysis of Triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 15833-15838

- Van Wilder V, De Brouwer V, Loizeau K, Gambonnet B, Albrieux C, Van Der Straeten D, Lambert WE, Douce R, Block MA, Rebeille F, Ravanel S** (2009) C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytologist* **182**: 137-145
- Witola WH, Ben Mamoun C** (2007) Choline induces transcriptional repression and proteasomal degradation of the malarial phosphoethanolamine methyltransferase. *Eukaryotic Cell* **6**: 1618-1624
- Xu J, Carlsson AS, Francis T, Zhang M, Hoffman T, Giblin ME, Taylor DC** (2012) Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2. *Bmc Plant Biology* **12**
- Yang Y, Yu X, Song L, An C** (2011) ABI4 Activates DGAT1 Expression in Arabidopsis Seedlings during Nitrogen Deficiency. *Plant Physiology* **156**: 873-883
- Yang Z-K, Niu Y-F, Ma Y-H, Xue J, Zhang M-H, Yang W-D, Liu J-S, Lu S-H, Guan Y, Li H-Y** (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnology for Biofuels* **6**
- Zanghellini J, Natter K, Jungreuthmayer C, Thalhammer A, Kurat CF, Gogg-Fassolter G, Kohlwein SD, von Gruenberg H-H** (2008) Quantitative modeling of triacylglycerol homeostasis in yeast - metabolic requirement for lipolysis to promote membrane lipid synthesis and cellular growth. *Febs Journal* **275**: 5552-5563

2. Données complémentaires

L'étude de la condition MTX et de la carence en azote nous a conduit à explorer différentes pistes de recherche, qui, par souci de clarté n'ont pas toutes été intégrées dans la publication précédente. Par exemple, ces deux traitements modifient le taux d'insaturation des acides gras et l'expression des gènes des désaturases. Nous avons également cherché à comprendre les mécanismes de régulation de la forte accumulation de TAG en mesurant l'expression du gène régulateur maître ("master regulator") LEC2 et du facteur de transcription WRI1. Enfin, des analyses supplémentaires ont été réalisées pour tenter de décrypter les mécanismes à l'origine de l'homéostasie de la PC durant le traitement au MTX. Ainsi, nous avons tenté de relier la forte stimulation de l'expression des gènes *NPC4* et *NPC5* avec la présence de ces enzymes au niveau protéique.

a. Variation du profil d'insaturation des acides gras au cours des deux traitements

Comme évoqué précédemment, le traitement MTX et la carence d'azote sont responsables de changements majeurs dans le métabolisme des glycérolipides des cellules d'*A. thaliana*. De manière intéressante, ils engendrent aussi des modifications du niveau de d'insaturation des acides gras.

Dans la condition MTX, l'analyse des acides gras totaux a révélé une augmentation significative des espèces 18:1 corrélée à une baisse des espèces 18:3 (**Figure 52. A**). Une analyse de la distribution des acides gras 18:3 dans les différentes classes de glycérolipides montre que cet acide gras diminue dans les principaux galactolipides et phospholipides ainsi que dans les DAG (**Figure 52. B**). Seuls les TAG conservent un pourcentage d'acide gras 18:3 comparable aux cellules témoins. Ce phénotype interroge sur la sélectivité pour le 18:3 des enzymes DGAT ou PDAT, qui ajoutent le troisième acide gras en position *sn*-3 du glycérol.

L'expression des gènes des désaturases corrèle parfaitement avec le profil lipidique des cellules traitées au MTX. Ainsi, les désaturases d'origine eucaryotes (FAD2/3), respectivement responsables de la désaturation de l'espèce 18:1 en 18:2 et 18:2 en 18:3 et FAD7, désaturase procaryote utilisant le 18:2 comme substrat pour former du 18:3, voient leurs expressions géniques significativement inhibées durant le traitement (**Figure 53**). Sachant que dans le modèle de culture cellulaire utilisé, les phospholipides représentent 70 à 80% des glycérolipides totaux, la forte inhibition de FAD2 et FAD3 joue un rôle prépondérant dans la baisse des PUFAs au sein des cellules. L'ajout de phosphocholine dans le milieu ne change pas le profil d'expression des gènes des désaturases par rapport à la condition MTX. Au contraire, l'apport de méthionine durant un traitement au MTX renverse le processus, le gène de la désaturase FAD3 étant alors surexprimé (**Figure 53**). Le taux d'acide gras 18:3 augmente alors dans la PC, les DAG et les TAG, au détriment de l'espèce 18:2 (**Figure 54**). Aucun effet n'est visible sur les galactolipides, ce qui est en accord avec le profil d'expression de FAD7 qui reste sous exprimé (**Figures 52 et 53**). Ce résultat met peut être en évidence une régulation de FAD3 par le taux de groupements méthyls disponible au sein des cellules.

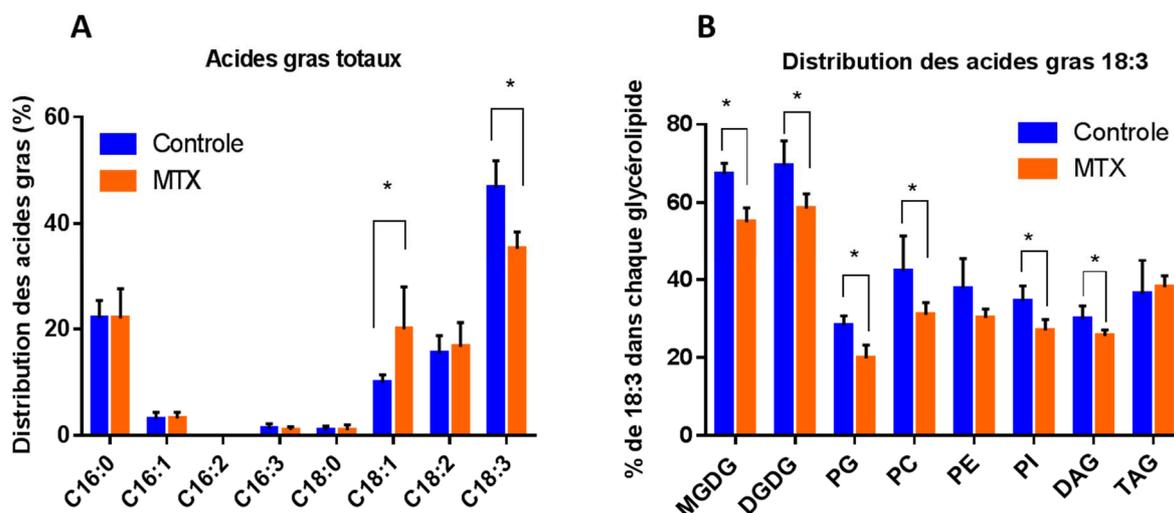


Figure 52 : Profil des acides gras lors du traitement au méthotrexate. A) Profil des acides gras totaux, exprimé en pourcentage. B) Répartition des acides gras 18:3 dans les différentes classes de glycérolipides, exprimé en pourcentage. MTX: méthotrexate, MGDG: monogalactosyldiacylglycérol, DGDG: digalactosyldiacylglycérol, PG: phosphatidylglycérol, PC: phosphatidylcholine, PE: phosphatidyléthanolamine, PI: phosphatidylinositol, DAG: diacylglycérol, TAG: triacylglycérol.

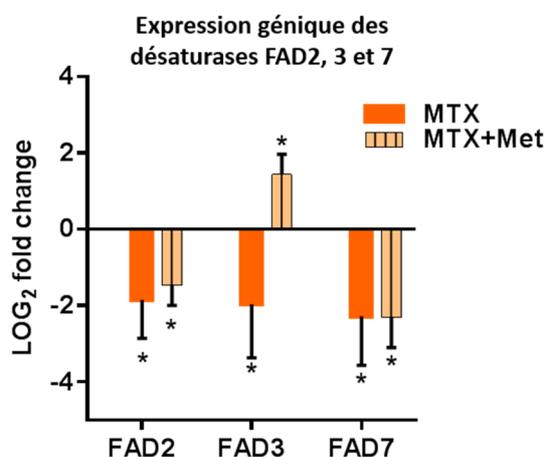


Figure 53 : Expression des gènes codant pour les désaturases FAD2, FAD3 et FAD7, durant les traitements MTX et MTX + Méthionine. Les désaturases eucaryotes (FAD2/3) et procaryote (FAD7) catalysent les deux dernières étapes de formation des acides gras polyinsaturés 18:3. L'expression des gènes codant pour les enzymes en condition traitée est exprimée en LOG₂ fold change en fonction de la condition témoin. MTX: méthotrexate, Met: méthionine, FAD: fatty acid desaturase.

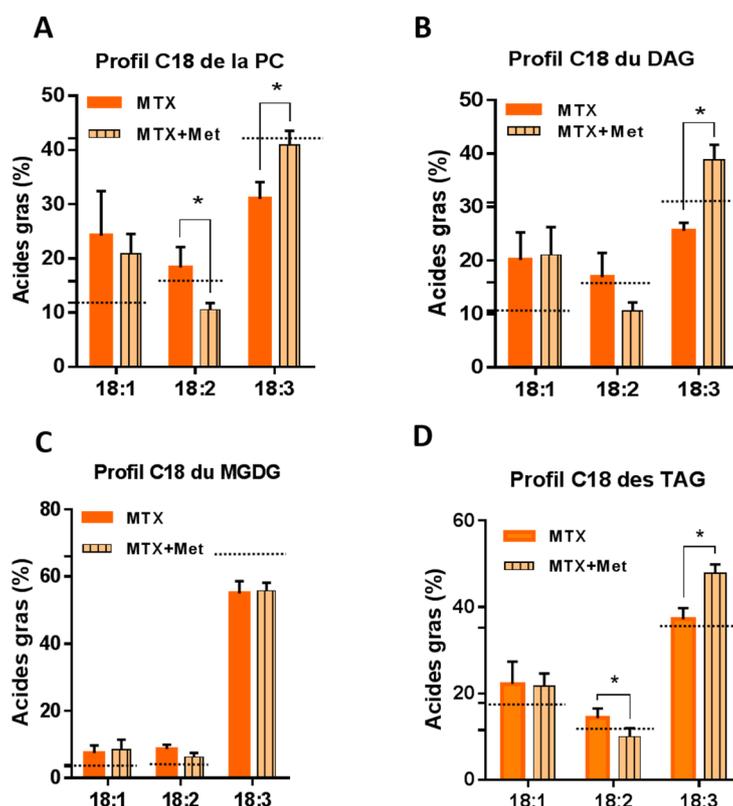


Figure 54 : Profil des acides gras en C18 des espèces : A) PC, B) DAG, C) MGDG et D) TAG, durant les traitements MTX et MTX + Méthionine. A) Profil des acides gras C18 de la PC. B) Profil des acides gras C18 des DAG. C) Profil des acides gras C18 du MGDG. D) Profil des acides gras C18 des TAG. Les profils des acides gras sont exprimés en pourcentage. Les lignes pointillées représentent la valeur des cellules témoins. MTX: méthotrexate, Met: méthionine, PC: phosphatidylcholine, DAG: diacylglycérol, TAG: triacylglycérol, MGDG: monogalactosyldiacylglycérol, FAD: fatty acid desaturase.

La carence en azote influe également sur le profil d'insaturation des acides gras mais de façon plus discrète que le traitement au MTX. Les pools de TAG et de PC présentent une hausse du pourcentage d'acides gras 18:3 et le MGDG présente au contraire une baisse du taux de PUFAs (**Figure 55. A**). Ces profils sont plus difficilement corrélables avec l'expression des gènes des désaturases qu'en condition MTX. Les désaturases FAD2 et FAD6 semblent réprimées tandis que l'impact sur l'expression de FAD3, FAD7 et FAD8 est négligeable (**Figure 55. B**). Comme pour le traitement MTX, l'apport d'acides gras polyinsaturés au pool de TAG est un mécanisme conservé ce qui suggère peut être une édition des acides gras favorisée en condition de carence en azote. Les acides gras désaturés seraient alors transférés aux TAG via le pool d'acyl-CoA. A priori, le transfert des PUFAs de la PC au TAG n'implique pas uniquement les enzymes PDAT et LPCAT car leur expression n'est pas stimulée par le traitement (voir données de l'article : Figure 7, p 150 et Table S1 p 159). Au contraire, les gènes codant pour les isoformes DGAT1 et 2 sont surexprimés. Des analyses de l'expression des gènes codant pour des phospholipases A2 pourraient permettre d'affiner nos connaissances sur le processus.

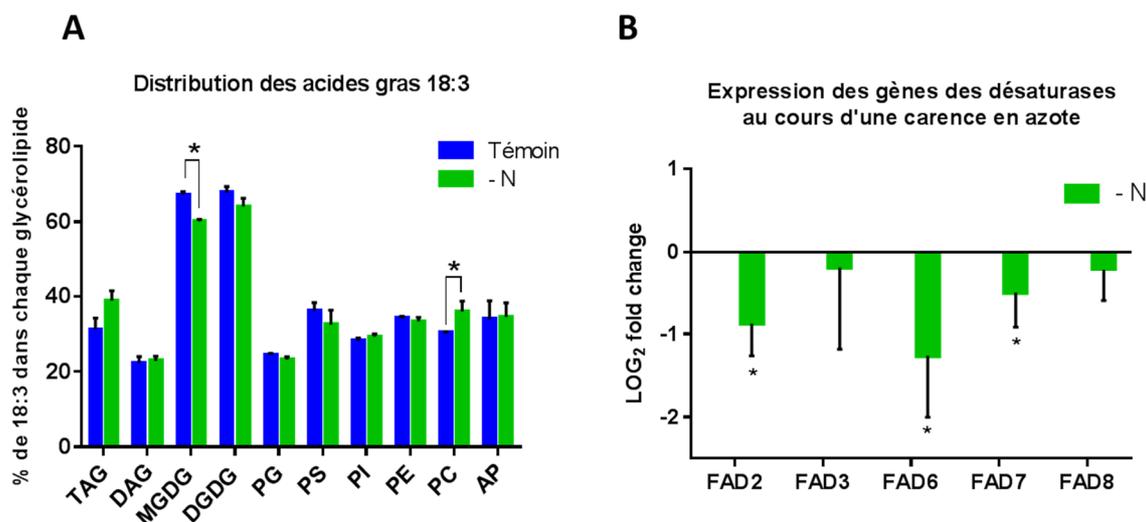


Figure 55 : Impact de la carence d'azote sur le profil des acides gras dans les différentes classes de glycérolipides et sur l'expression des désaturases.

A) Répartition des acides gras 18:3 dans les différentes classes de glycérolipides, exprimé en pourcentage. B) Expressions géniques des désaturases eucaryotes (FAD2/3) et procaryote (FAD6/7/8) qui catalysent les deux dernières étapes de formation des acides gras polyinsaturés 18:3. L'expression des gènes codant pour les enzymes en condition traitée est exprimée LOG₂ fold change, la condition témoin étant ramenée à zéro. -N : carence d'azote, TAG : triacylglycérol, DAG : diacylglycérol, MGDG : monogalactosyldiacylglycérol, DGDG : digalactosyldiacylglycérol, PG : phosphatidylglycérol, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, AP : acide phosphatidique, FAD : fatty acid desaturase.

Le traitement en présence de MTX et la carence d'azote ralentissent très fortement la croissance cellulaire. Selon nos travaux reliant la vitesse de croissance et le taux d'insaturations, on pourrait s'attendre ici à une augmentation des PUFAs dans les lipides membranaires car les désaturases ne sont pas limitantes au vu de la faible croissance cellulaire dans les deux conditions. Cependant, ces traitements influent aussi sur l'expression des gènes des désaturases, changeant le profil lipidique. Dans la littérature, il a été décrit que les désaturases peuvent être régulées de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle pour permettre l'adaptation de la plante lors de changement de salinité et de température (Zhang *et al* 2012, O'Quin *et al* 2010). Ici nous montrons qu'un stress d'origine chimique entraînant une baisse des méthylations de la cellule et une carence en azote sont aussi capables d'influer sur l'expression de ces gènes.

b. Facteurs de transcription régulant la production de TAG au cours des deux traitements

Le traitement MTX et la carence en azote provoquent chez les cultures cellulaires d'*Arabidopsis* une très forte augmentation de TAG comparée à la condition contrôle. Pour expliquer une telle production de lipides de réserve, nous nous sommes intéressés à

l'expression du facteur de transcription "master régulateur" LEC2 et de WRI1, qui jouent un rôle important dans l'accumulation des lipides de réserve dans les graines. Ces deux gènes s'avèrent être stimulés dans le cas d'un traitement au MTX et ils sont fortement exprimés durant une carence en azote (**Figure 56**).

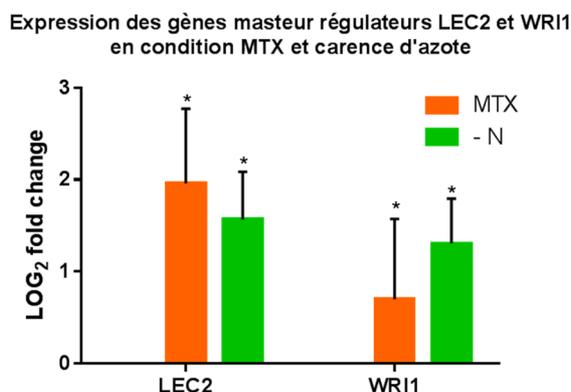


Figure 56 : Expressions géniques des masters régulateurs LEC2 et WRI1 durant un traitement au MTX et en carence d'azote. L'expression des gènes codant pour les enzymes en condition traitée est exprimée LOG₂ fold change, la condition témoin étant ramenée à zéro. LEC2 : LEAFY COTYLEDON 2, WRI1 : WRINKLED 1, MTX : méthotrexate, – N : carence en azote.

Ces facteurs de transcriptions sont décrits dans la littérature comme intervenant dans les processus d'accumulation de réserve dans les graines uniquement, leur expression étant réprimée dans les tissus végétatifs (*Baud et al 2009*). Ces résultats suggèrent que dans des conditions particulières, ces gènes peuvent être réactivés. Alternativement, d'autres isoformes de WRI exprimés dans les tissus végétatifs pourraient être détectés par les couples d'oligonucléotides que nous avons utilisés (*To et al 2012*).

c. Homéostasie de la PC au cours du traitement au MTX

Au cours du traitement au MTX, la quantité de PC dans les cellules est finement régulée. En effet, comme abordé dans la Figure 4, p 146 de l'article, malgré l'inhibition des enzymes PEAMT -impliquées dans la voie de synthèse principale du précurseur de la tête polaire de la PC- le taux de PC reste stable, voire augmente légèrement de façon non-significative. A cela s'ajoute sûrement la consommation du squelette diacylglycérol de la PC pour produire du DAG et à *fortiori* des TAG, comme le laisse à penser la forte surexpression des gènes *NPC4* et *NPC5*. Pour ces raisons, des mécanismes de régulations doivent avoir été mis en place par les cellules pour pouvoir maintenir le pool de PC.

Arabidopsis thaliana possède 4 gènes codant pour des choline-kinases, qui phosphorylent une molécule de choline pour former de la phosphocholine (**Figure 15**). Deux de ces gènes sont identifiés comme des choline-kinases, At1g71697 codant pour la CK1 et At1g74320 pour une CK. Les deux autres gènes encodent pour des "choline-synthases" putatives : At1g34100 et At4g09760. Ces enzymes pourraient participer au recyclage de la tête polaire de la PC quand celle-ci est utilisée pour former du DAG. L'expression de ces gènes n'a pas été mesurée par

qPCR mais une puce à ADN de la condition MTX obtenue par l'équipe, indique que leur expression n'est pas affectée par le traitement. L'activité CK doit aussi être couplée à une activité phospholipase D qui permet la libération du phospholipide AP et de la choline à partir de la molécule de PC. Les phospholipases D sont décrites comme intervenant lors de stress, comme les enzymes PLD ζ 1 et PLD ζ 2 qui ciblent principalement la PC et sont exprimées en carence de phosphate pour approvisionner la synthèse de galactolipides à partir du squelette glycérol des phospholipides (*Li et al 2006*) ou PLD α 1 qui produit de l'AP, impliqué dans la signalisation cellulaire de la réponse à l'acide abscissique lors d'une blessure ou durant un stress hydrique (*Mane et al 2007*). Des expériences préliminaires de qPCR pour évaluer l'expression des gènes codant pour PLD ζ 2 et PLD α 1 en condition MTX, se sont avérées non concluantes au regard des fortes variations enregistrées (résultats non montrés). Basé sur des analyses d'expressions géniques, il semble que le recyclage de la PC passe prioritairement par les enzymes NPC plutôt que par un couplage de l'activité PLD et CK, durant un traitement au MTX. L'augmentation d'acide phosphatidique visible sur les profils lipidiques seraient aussi plutôt dû aux enzymes DGK1/3/4 et 7 qui phosphorylent le DAG et dont l'expression des gènes est stimulée, plutôt que par les PLD (Table S1, p 159 de l'article). Synthétisé à partir de DAG et des échanges DGK/PAH, l'AP pourrait venir stimuler la production de phosphocholine en venant contrebalancer les effets de la molécule AdoHcy (*Eastmond et al 2010, Craddock et al 2015*).

Les tentatives de réversion de l'effet MTX, par ajout de la méthionine et de la phosphocholine ont également montré que la PC est un phospholipide dont la teneur est régulée dans les cellules d'*Arabidopsis*. Comme vu dans l'article (Figure 4, p 146), l'apport de méthionine permet de rendre disponible des groupements méthyls au sein des cellules. Cela a pour effet de relancer l'expression des gènes codant pour les enzymes PEAMT1 et 3, permettant la production de phosphocholine. Le taux de PC est alors légèrement accru, bien que les autres gènes codant pour les enzymes impliquées dans sa synthèse (CCT1 et AAPT1) semblent toujours réprimés, comme en condition méthotrexate. L'expression des gènes de la néosynthèse de PC n'est donc pas représentative de l'activité enzymatique ou de la quantité de PC au sein des cellules. D'autres paramètres sont sûrement à prendre en compte, comme les échanges de têtes polaires entre phospholipides qui pourraient participer à la production de PC.

Cette constatation est également appuyée par les résultats provenant des expériences d'incubation avec la phosphocholine. En agissant sur le métabolisme C1, le méthotrexate inhibe divers mécanismes cellulaires, dont la production de phosphocholine, qui est spécifique du métabolisme des lipides car nécessaire à la production de PC.

L'apport de phosphocholine dans les cellules témoins, permet d'augmenter la quantité de la molécule d'environ 1.5 fois et les cellules traitées au MTX + phosphocholine ont une teneur 4 fois supérieure en phosphocholine que les cellules de la condition MTX (données de l'article, Figure S3, p 161). Cependant, les cellules traitées avec de la phosphocholine ou avec du MTX + phosphocholine ne présentent qu'une teneur en PC légèrement accrue (**Figure 57. A**) et l'expression des gènes participants à sa synthèse ne sont pas affectées (Table S1, p 159 de

l'article). Ces résultats montrent que malgré une plus forte disponibilité en phosphocholine dans les cellules, la teneur de PC est finement régulée ou que le taux de conversion des enzymes est limitant. Cela évoque aussi le devenir du pool de phosphocholine dans les plantes. Contrairement à d'autres végétaux, *Arabidopsis* n'est pas une plante accumulant de la glycine-bétaïne, composé osmoprotecteur ayant pour précurseur la choline. La phosphocholine est donc peu susceptible d'être redirigée dans cette voie au cours de nos expériences. Il a été montré que la phosphocholine peut servir de réserve de phosphate dans les cellules (Gout et al 1990, Schachtman et al 1998). Bien que nos conditions expérimentales ne doivent pas induire de carence en phosphate, peut être que la phosphocholine représente un stock de phosphate organique au sein des cellules.

Comme dans la condition MTX, les phospholipases NPC sont fortement stimulées lors d'un traitement MTX + phosphocholine (Figure 57. C). La production de DAG dans cette condition est plus importante qu'en présence de MTX seul, montrant que la PC est au cœur d'un turn-over de synthèse et de dégradation stimulé (Figure 57. B). L'accumulation de TAG est également favorisée, vraisemblablement car le pool de DAG est lui-même plus important (Figure 57. B).

La comparaison entre les traitements MTX et MTX + phosphocholine démontre très peu de différences. Il semble néanmoins que la présence de phosphocholine favorise et augmente le phénotype dû au MTX. Ainsi, la production de DAG et TAG est plus forte chez les cellules doublement traitées que chez les cellules MTX. En condition MTX, la phosphocholine est limitante (Figure 3, p 144 de l'article) et le turn-over de PC permet de recycler cette tête polaire. L'ajout de phosphocholine semble favoriser le turn-over d'un nombre de molécule de PC plus grand, du fait d'une plus grande disponibilité du stock de tête polaire.

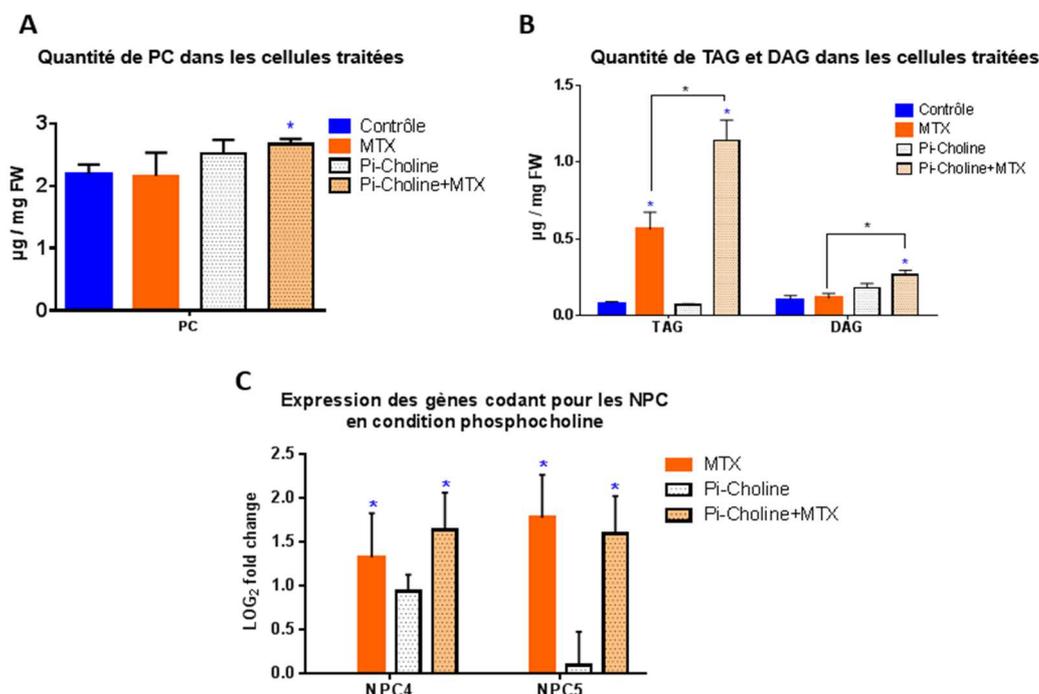


Figure 57 : Teneurs de la PC, des DAG et des TAG et suivi de l'expression des gènes des phospholipases NPC4 et 5 dans les cellules témoins et MTX traitées à la phosphocholine.

A) Teneur de la PC dans les cellules exprimée en μg par mg de poids frais. B) Teneur en TAG et DAG au sein des cellules, exprimée en μg par mg de poids frais. C) Expression des gènes codant pour les NPC, responsables de la formation de DAG à partir de PC. L'expression des gènes codant pour les enzymes en condition traitée est exprimée LOG_2 fold change, la condition témoin étant ramenée à zéro. L'astérisque bleue indique qu'une différence significative existe avec la condition contrôle. Pi-Choline : phosphocholine, MTX : méthotrexate, PC : phosphatidylcholine, NPC : non-specific phospholipases C, TAG : triacylglycérol, DAG : diacylglycérol.

i. Immunodétection des Non Specific Phospholipases C (NPC)

Le traitement au méthotrexate ou la carence d'azote ont permis de mettre en évidence le rôle des NPC dans la production de TAG et le turn-over de PC. Ces enzymes sont connues pour être impliquées dans la réponse au stress ainsi qu'à une carence en phosphate mais c'est la première fois que leur implication dans la production de lipide de réserve est suggérée. Afin de visualiser si l'expression des gènes est traduite au niveau protéique, des westerns blots contre les protéines NPC4 et 5 ont été réalisés. Les anticorps dirigés contre NPC5 se sont avérés non concluants : malgré des tests de concentrations croissantes, le signal reste très proche du bruit de fond (données non montrées). Concernant l'isoforme NPC4, la présence d'une bande d'environ 60 kD correspondant à la taille attendue de la protéine peut être observée sur la **Figure 58**. L'intensité de cette bande augmente dans la condition MTX et plus discrètement lors d'une carence d'azote. Une seconde bande est également visible en dessous de 50 kD dans la plupart des conditions. Il peut s'agir d'une bande aspécifique reconnue par les anticorps. La quantité de protéine NPC4 présente dans les traitements MTX + méthionine et MTX + phosphocholine reste à être évaluée. L'obtention de mutants KO et surexpresses pour ces protéines permettra d'avoir respectivement des contrôles négatifs et positifs pour les prochains westerns blots. Si les conditions d'expériences ne peuvent être optimisées pour l'anticorps dirigé contre NPC5, des collaborations peuvent être envisagées : d'autres équipes ayant produites des anticorps spécifiques avec succès (*Gaude et al 2008*).

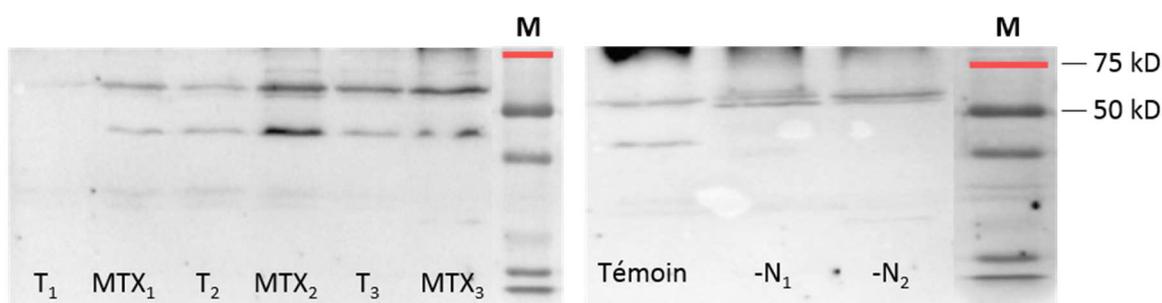


Figure 58 : Révélation de la protéine NPC4 par western blot sur des extraits protéiques totaux de cellules témoins, traitées au MTX et en carence d'azote. NPC4 a une taille de 60 kDa. NPC4 : non specific phospholipase C 4, T : témoin, MTX : condition méthotrexate, -N : condition carence d'azote. La numérotation correspond à différents réplica biologiques. Marqueur de taille (M) : Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Biorad.

3. Discussion

L'impact du méthotrexate observé sur le métabolisme des triglycérides chez les cellules d'*A. thaliana* mise en culture, peut provenir de l'inhibition du métabolisme C1. En absence de méthionine, l'activité des désaturases est modulée, en particulier pour FAD3 ce qui entraîne un changement global du niveau d'insaturation des acides gras. Les isoformes de l'enzyme PEAMT, qui nécessitent la présence de groupement méthyl pour leur activité sont aussi impactées par le traitement. Cependant, ces fluctuations n'expliquent pas entièrement le phénotype observé, montrant qu'il existe sûrement d'autres cibles non identifiées qui sont touchées par le traitement. La carence en azote est aujourd'hui un modèle très utilisé pour déclencher la production de TAG dans les cellules et étudier les voies métaboliques mises en jeu. Les mécanismes mis en place par la cellule pour répondre à cette déficience en nutriment ne sont pas encore tous élucidés.

Un enjeu important pour la recherche sur les biocarburants est de comprendre quelles sont les cascades de réactions qui se mettent en place dans ces situations de stress et s'il existe une réponse cellulaire commune. En comparant les deux traitements : MTX et carence d'azote, chez les cellules d'*Arabidopsis*, nous avons mis en avant de nombreuses similitudes :

- Une forte accumulation de TAG,
- Le maintien de la proportion de la teneur de PC (exprimé en pourcentage), vis-à-vis des autres glycérolipides membranaires,
- La surexpression des gènes codant pour les NPC, qui est corrélée (pour NPC4) avec une plus forte teneur en protéine,
- Les deux points précédents impliquent une homéostasie de la PC finement régulée, malgré un turn-over accéléré,
- Une composition en acide gras similaire entre la PC et les TAG et différente du pool d'acyl-CoA, suggérant un adressage préférentiel des acides gras édités sur la PC au TAG,
- Un fort taux de PUFAs (18:3) adressé aux TAG, montrant peut être la sélectivité des enzymes PDAT et DGAT1 (situation très nette en condition MTX et un peu moins avec la carence en azote).

Ces résultats mettent en avant le rôle important de la PC, véritable plaque tournante (ou "hub") pour l'édition des acides gras mais aussi pour la synthèse des TAG.

II. Induction de la production de TAG chez la diatomée modèle *P. tricornutum*

Les microalgues sont de plus en plus étudiées en raison de leur fort potentiel à produire des lipides de stockage. Elles sont également aisément cultivables en bioréacteurs ce qui en fait de solides candidats pour la production de biocarburant. Cependant, les coûts de production des biocarburants de 3^{ème} génération doivent encore être abaissés pour rendre le modèle rentable. La recherche se tourne actuellement vers l'amélioration des conditions de production et d'extraction des TAG. Dans cette optique il est primordial de continuer à produire des connaissances sur ces organismes, en particulier sur la synthèse des glycérolipides, afin d'être capable d'orienter la recherche appliquée vers de nouvelles cibles. Nous avons poursuivi le travail entrepris avec la plante supérieure *A. thaliana* chez la diatomée *P. tricornutum*, afin d'évaluer si certains mécanismes biologiques sont conservés dans les deux modèles.

En premier lieu, nous avons fait varier les conditions de culture des microalgues. Le suivi de la culture de *P. tricornutum* en fonction de la richesse du milieu en sels minéraux (azote et phosphore 1X ou 10X) a montré qu'une déficience de ces nutriments entraîne un remodelage de la composition en glycérolipides. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en 2015 dans le journal *Plant Physiology* : "*Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in Phaeodactylum tricornutum*". La diatomée est aussi sensible au repiquage : une accumulation transitoire de TAG, ainsi qu'une augmentation de la taille des cellules est visible jusqu'à 6h après repiquage.

Dans un second temps, nous avons réalisé des expériences d'incubation avec des petites molécules susceptibles d'impacter différentes voies métaboliques. Une première série d'expériences nous a permis de participer au dépôt d'un brevet visant à démontrer l'effet de molécules interférant avec le métabolisme des stérols sur la production de TAG ("*Inhibiteurs du métabolisme des stérols destinés à être utilisés pour l'accumulation de triglycérides dans les microalgues et procédés associés*", N° WO2015111029, publié le 30 Juillet 2015). Une deuxième série d'expérience a permis de visualiser l'impact de molécules de la famille des inhibiteurs de la DHFR/Thymidylate synthase chez *P. tricornutum*. Les résultats obtenus diffèrent partiellement de ceux obtenus avec le modèle *A. thaliana*.

A. Suivi de la croissance de cultures de *P. tricornutum*

Des cellules de *P. tricornutum* ont été mises en culture dans 50 mL de milieu ESAW 1X ou 10X (dix fois plus d'azote et de phosphate). Les mesures de l'activité de la photosynthèse, de l'accumulation de TAG et de la croissance cellulaire ont été réalisées tous les jours pendant 2 semaines et les résultats sont présentés **Figure 60**. L'accumulation de TAG est facilement suivie au cours du temps grâce à la coloration au Nile Red (*Franz et al 2013, Wong et Franz 2013*). Nous avons cherché à déterminer les différentes phases de croissance précédemment décrites pour les cultures de microalgues à savoir : la phase de latence, puis les phases de croissance exponentielle, linéaire, stationnaire et la phase de déclin (**Figure 59**).

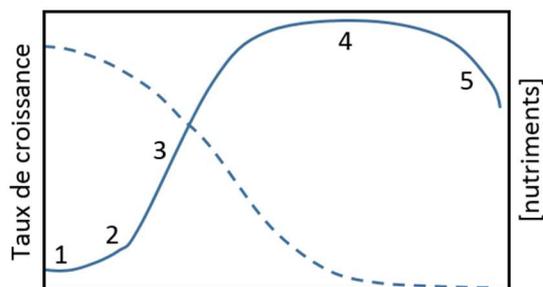


Figure 59 : Phases de croissances théoriques d'une culture de microalgue. 1) Phase de latence, durant laquelle la croissance est retardée due à l'ajustement au nouveau milieu. 2) Phase de croissance exponentielle, au cours de laquelle les cellules se divisent de manière exponentielle en fonction du temps, les nutriments et la lumière ne limitant pas la croissance. 3) Pendant la phase de croissance linéaire, la lumière devient limitante, la biomasse s'accumule à un taux constant jusqu'à ce que les nutriments deviennent limitants. 4) Phase de croissance stationnaire, durant laquelle la croissance est proche de zéro, due à la limitation en nutriment. 4) Phase de déclin au cours de laquelle la quantité de cellule baisse en raison de la mort cellulaire due à un manque en nutriment, des changements de pH du milieu, des contaminations,... Ligne pleine : taux de croissance, Ligne pointillée : concentration des nutriments. Schéma adapté de *Lee et al, 2015*.

Les cultures ont également été maintenues 42 jours, avec des mesures aux jours 26, 35 et 42 (**Figure 61**). Les cellules placées dans le milieu 10X ont un taux de croissance plus rapide comparées aux cellules placées dans le milieu 1X. En condition 10X, la croissance perdure durant au moins 17 jours, jusqu'à atteindre $43 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹. La croissance des cellules dans le milieu 1X atteint une phase stationnaire dès le 7^{ème} jour et la concentration cellulaire atteinte est de $20 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹, une concentration plus faible comparé au milieu 10X. La culture 10X, semble atteindre la phase stationnaire entre le 17^{ème} et le 26^{ème} jour (**Figure 61**). Pour les deux conditions, les mesures suivantes (dès le 26^{ème} jour) montrent un effondrement de la croissance des cultures (phase de déclin), sûrement dû à une baisse de la teneur en nutriments des milieux.

Concernant la production de TAG, les deux cultures n'ont pas le même comportement. La culture 10X reste stable dans le temps, avec une tendance à l'augmentation à partir du 26^{ème} jour, alors que la culture 1X accumule des TAG dès le 7^{ème} jour après repiquage avec une valeur autour de 4100 RFU/ 10^6 cellules.mL⁻¹, dépassant largement le bruit de fond (jusqu'à 2000 RFU/ 10^6 cellules.mL⁻¹). Pour la culture 1X, l'accumulation de TAG est concomitante avec le passage en phase stationnaire. La quantité de TAG baisse ensuite, dès la mesure au 26^{ème} jour, vraisemblablement due à une mort cellulaire et à l'entrée en phase de déclin. Etant donné que nos études portent sur la production de TAG induite par différents traitements, nous avons décidé de nous placer par la suite dans des conditions de culture 10X afin que le manque de nutriments (qui se fait sentir dans le milieu 1X), n'interfère pas avec nos résultats.

Résultats – Modèle *P. tricornutum*

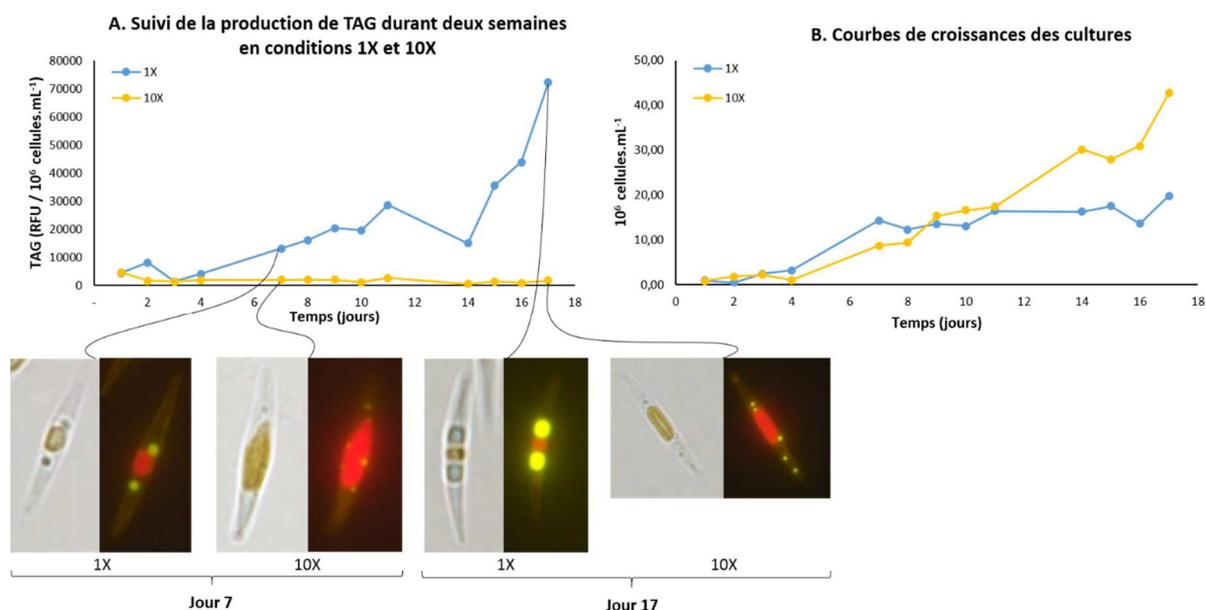


Figure 60 : Suivi de la production de TAG et de la croissance cellulaire sur deux semaines, en conditions de culture 1X et 10X. A) Suivi de l'accumulation de TAG par coloration au Nile Red. B) Suivi de la croissance cellulaire. La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹.

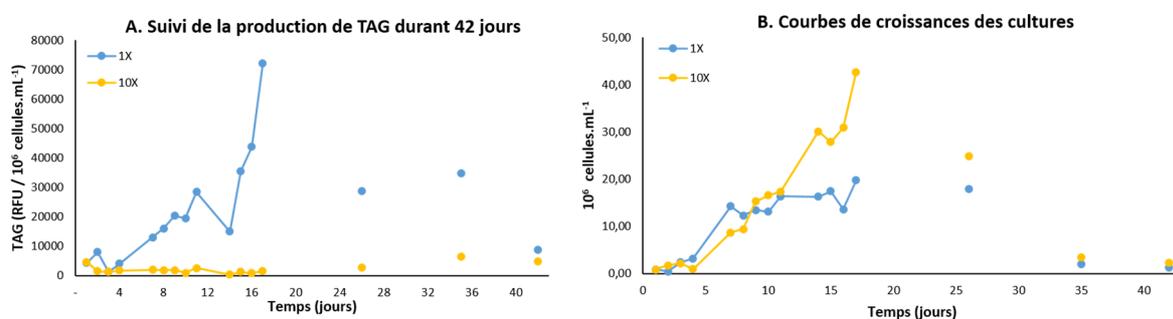


Figure 61 : Suivi de la production de TAG et de la croissance cellulaire sur 42 jours, en conditions de culture 1X et 10X. A) Suivi de l'accumulation de TAG par coloration au Nile Red. B) Suivi de la croissance cellulaire. La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹.

B. L'effet repiquage

Les cultures de microalgues sont sensibles au repiquage. Dans la littérature, il a été observé chez diverses espèces que la croissance marque un temps d'arrêt après dilution (*Mata et al 2009, Zhou et al 2014, Yuan et al 2014, Lee et al 2015*). Cette étape est appelée phase de latence ou "lag phase". Au laboratoire, des observations chez *P. tricornutum* ont été

réalisées à différents temps après repiquage : en concomitance avec l'arrêt de la division cellulaire, une accumulation de TAG a été observée jusqu'à 6h après la manipulation (**Figure 62**). Durant cette période, les cellules se gorgent de lipides de stockage et cela influence également sur leur taille, puisque celle-ci augmente vis-à-vis des cellules témoins non repiquées. Cet effet disparaît 24h après repiquage, à la fin de la phase de latence. Le repiquage engendre probablement un stress cellulaire mais celui-ci n'est pas mécanique (différentes méthodes de repiquages plus ou moins douces ont été testées) et ne provient pas non plus du changement de milieu, puisque les cellules répondent de la même manière quand elles sont placées dans un nouveau milieu ou replacées dans le même milieu de culture.

Ces résultats sont à prendre en compte lors de la manipulation de microalgues ; des expériences d'incubation avec de petites molécules visant à faire produire des TAG doivent s'effectuer après cette phase de latence afin de ne pas biaiser les résultats.

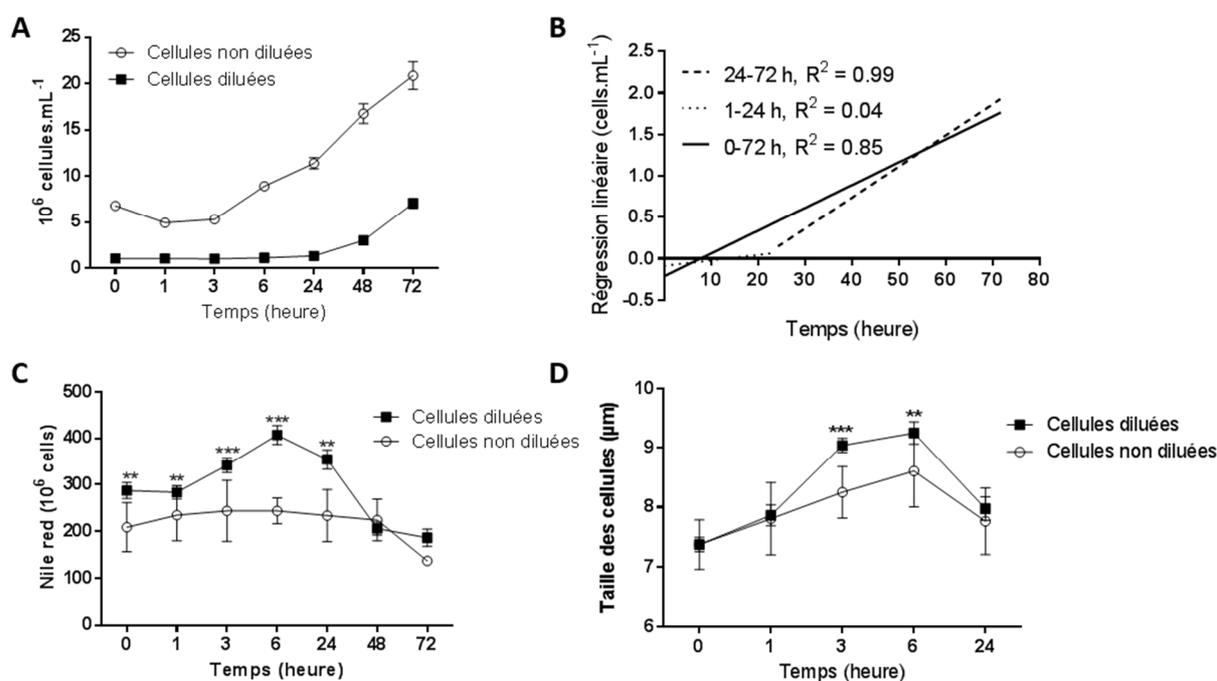


Figure 62 : Impact du repiquage sur les cultures de *P. tricornutum*. A) Effet sur la croissance. B) Régression linéaire de la croissance des cellules diluées. La régression est effectuée de 0 à 72h, puis de 1 à 24h et de 24h à 72h. Ces résultats montrent qu'il existe une phase de latence juste après le repiquage et ce jusqu'à 24h. C) Effet sur l'accumulation de TAG, mesurée par coloration au Nile Red. D) Effet sur la taille des cellules. La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10⁶ cellules.mL⁻¹.

C. Analyse des glycérolipides de *P. tricornutum*

La diatomée *P. tricornutum* est considérée comme un organisme modèle pour l'étude des microalgues. En collaboration avec d'autres membres de l'équipe, nous avons entrepris l'analyse exhaustive des glycérolipides de la diatomée, qui n'avait encore jamais été réalisée. Pour cela, nous avons déterminé le profil et quantifié les glycérolipides membranaires et de réserve, présents dans la diatomée en condition de croissance optimale. Puis nous avons mesuré l'impact de carences minérales sur la teneur et la distribution de ces glycérolipides. En effet, comme nous l'avons vu précédemment avec la technique de coloration des lipides neutres (Nile Red), *P. tricornutum* produit rapidement des TAG dans un milieu de culture 1X, la principale cause étant l'épuisement des ressources en phosphate et azote. Ces deux nutriments sont essentiels à la croissance et leur épuisement affecte considérablement le métabolisme des algues. Ainsi, nous avons observés sur plusieurs souches de *P. tricornutum* que le métabolisme des lipides est affecté par ces carences. La carence en azote mène à un arrêt de la croissance cellulaire, une accumulation de TAG et une sénescence des chloroplastes dès 3 jours, sénescence probablement liée à la diminution de la synthèse des protéines impliquées dans les réactions de photosynthèse. L'effet d'une carence de phosphate sur le métabolisme lipidique est plus lent, les réserves de phosphate étant vraisemblablement plus importantes que les réserves d'azote. Dans ce cas, l'accumulation des lipides de réserve n'est visible qu'à partir de 8 jours et les phospholipides sont consommés en parallèle par la diatomée comme source de phosphate secondaire. Ainsi les phospholipides sont dégradés au profit de lipides non-phosphatés comme des glycoglycérolipides et des bétaïne-glycérolipides : la PC est remplacée dans les membranes extraplastidiales par le DGTA (diacylglycerol hydroxymethyl-N,N,N-trimethyl- β -alanine) et peut-être par le DGDG, tandis que le SQDG supplée à la disparition du PG dans les membranes plastidiales. Dans les deux conditions de carence, le MGDG est fortement réduit et la quantité de PG réduite de moitié. En carence d'azote, le pourcentage des autres glycérolipides membranaires demeure inchangé, ce qui démontre que la production de TAG provient principalement de sa néosynthèse. Ces données ont fait l'objet d'une publication en 2015 dans le journal *Plant Physiology* : "*Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum**" visible section suivante. Dans cette étude, j'ai plus particulièrement contribué aux analyses des gènes de synthèse des glycérolipides induits ou réprimés aux cours des carences, afin de corrélérer ou non les variations d'expression des gènes aux variations des teneurs en PC, MGDG, DGDG et DGTA.

NB : Les figures et les références bibliographiques de cet article sont numérotées et classées de manière indépendante au reste du corps de texte de ce manuscrit.

Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*¹

Heni Abida², Lina-Juana Dolch², Coline Mei², Valeria Villanova, Melissa Conte, Maryse A. Block, Giovanni Finazzi, Olivier Bastien, Leïla Tirichine, Chris Bowler, Fabrice Rébeillé, Dimitris Petroustos*, Juliette Jouhet*, and Eric Maréchal*

Environmental and Evolutionary Genomics Section, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8197, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1024, 75005 Paris, France (H.A., L.T., C.B.); Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Unité Mixte de Recherche 5168 Centre National de la Recherche Scientifique-Commissariat à l'Énergie Atomique-Université Grenoble Alpes, Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, Commissariat à l'Énergie Atomique Grenoble, 38054 Grenoble cedex 9, France (L.-J.D., C.M., M.C., M.A.B., G.F., O.B., F.R., D.P., J.J., E.M.); and Fermentalg SA, F-33500 Libourne, France (V.V.)

Diatoms constitute a major phylum of phytoplankton biodiversity in ocean water and freshwater ecosystems. They are known to respond to some chemical variations of the environment by the accumulation of triacylglycerol, but the relative changes occurring in membrane glycerolipids have not yet been studied. Our goal was first to define a reference for the glycerolipidome of the marine model diatom *Phaeodactylum tricornutum*, a necessary prerequisite to characterize and dissect the lipid metabolic routes that are orchestrated and regulated to build up each subcellular membrane compartment. By combining multiple analytical techniques, we determined the glycerolipid profile of *P. tricornutum* grown with various levels of nitrogen or phosphorus supplies. In different *P. tricornutum* accessions collected worldwide, a deprivation of either nutrient triggered an accumulation of triacylglycerol, but with different time scales and magnitudes. We investigated in depth the effect of nutrient starvation on the Pt1 strain (Culture Collection of Algae and Protozoa no. 1055/3). Nitrogen deprivation was the more severe stress, triggering thylakoid senescence and growth arrest. By contrast, phosphorus deprivation induced a stepwise adaptive response. The time scale of the glycerolipidome changes and the comparison with large-scale transcriptome studies were consistent with an exhaustion of unknown primary phosphorus-storage molecules (possibly polyphosphate) and a transcriptional control of some genes coding for specific lipid synthesis enzymes. We propose that phospholipids are secondary phosphorus-storage molecules broken down upon phosphorus deprivation, while nonphosphorus lipids are synthesized consistently with a phosphatidylglycerol-to-sulfolipid and a phosphatidylcholine-to-betaine lipid replacement followed by a late accumulation of triacylglycerol.

¹ This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-12-BIME-0005 [DiaDomOil] to C.B., G.F., D.P., and E.M.), the Commissariat à l'Énergie Atomique Life Science Division (bioenergy grant ElicITAG to M.C. and E.M.), a European Research Council Advanced Grant (Diatomite; to C.B.), the Centre National de la Recherche Scientifique (Défi Transition Énergétique grant to L.T. and G.F.), the OCEANOMICS program from the French Ministry of Research (to E.M.), and the Institut Carnot Lipides pour la Santé et l'Industrie (to E.M.).

² These authors contributed equally to the article.

* Address correspondence to dimitris.petroustos@cea.fr, juliette.jouhet@cea.fr, and eric.marechal@cea.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Eric Maréchal (eric.marechal@cea.fr).

H.A., L.-J.D., C.M., V.V., M.C., F.R., D.P., and J.J. performed the experiments; O.B. achieved the bioinformatic analyses; M.A.B., G.F., L.T., and C.B. contributed to the design and analyses of experiments; D.P., J.J., and E.M. designed, supervised, and analyzed the experiments. All authors contributed to the writing of the article.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.114.252395

Diatoms are a major component of phytoplankton communities, believed to be responsible for up to one-fourth of global primary productivity (Scala and Bowler, 2001). They live in an environment where light, temperature, pH, oxygen, carbon dioxide, nutrients, and all kinds of physicochemical parameters can vary dramatically. Nitrogen (N), phosphorus (P), and iron are the most often limiting or colimiting nutrients (Mills et al., 2004; Moore et al., 2013), and N is more often limiting than P in marine systems, with the reverse in freshwaters (Hecky and Kilham, 1988). As a selection pressure, the relative fluctuations of N and P have been proposed to be responsible for the differences of size distributions of diatoms, freshwater species being smaller than marine ones due to the ambient scarcity of P (Litchman et al., 2009). Nutrient scarcity is a criterion to define oligotrophic areas in oceans. A study by Van Mooy et al. (2009) on phytoplanktonic communities in an oligotrophic marine region, where P is scarce (less than 10 nM), observed that diatoms reduced their P requirements by synthesizing less phosphoglycerolipids, in particular phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylglycerol (PG), and more

nonphosphorus lipids, such as sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and betaine lipids (BL), as compared with communities growing in a P-rich region (more than 100 nM). However, that study did not consider the levels of two other nonphosphorus lipid classes (i.e. the chloroplast galactoglycerolipids, in particular monogalactosyldiacylglycerol [MGDG]) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), and triacylglycerol (TAG). When Van Mooy et al. (2009) examined planktonic membrane lipids at the two locations, their observations were consistent with a PG-to-SQDG and a PC-to-BL replacement triggered by P shortage. In a complementary set of experiments, they cultivated the diatom *Thalassiosira pseudonana* in a P-depleted or P-replete artificial medium and found variations of the SQDG-PG and BL-PC ratios in line with their on-site observations (Van Mooy et al., 2009), supporting that lipid remodeling could be one of the most essential mechanisms allowing a given species to acclimate and populate oligotrophic areas.

Phospholipid-to-nonphosphorus lipid replacement has been studied in depth in the plant *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Benning and Ohta, 2005; Shimojima and Ohta, 2011; Boudière et al., 2012; Dubots et al., 2012; Nakamura, 2013; Petroustos et al., 2014). In *Arabidopsis*, PC and PG contents decrease upon P starvation, and the synthesis of plastid glycolipids (i.e. MGDG, DGDG, and SQDG) increases coincidentally. Based on the acyl profiles of glycerolipids, it is possible to identify the metabolic routes that are mobilized in this remodeling. In *Arabidopsis*, MGDG can be synthesized using diacylglycerol (DAG) generated locally inside the plastid, via the so-called prokaryotic pathway, or using diacyl precursors diverted from nonplastid phospholipids, via the so-called eukaryotic pathway (Browse et al., 1986). The prokaryotic structure is characterized by a 16-carbon (C16) fatty acid (FA) at position *sn*-2 of the glycerol backbone, like cyanobacterial lipids, whereas the eukaryotic structure contains an 18-carbon (C18) FA at position *sn*-2. Thus, in *Arabidopsis*, (1) 18:3/16:3-MGDG originates from the stepwise galactosylation of prokaryotic 18:1/16:0-DAG followed by a rapid desaturation into the trienoic form; and (2) 18:3/18:3-MGDG relies on the import and galactosylation of eukaryotic precursors derived from phospholipids, most notably having 18:2/18:2 structures (Maréchal et al., 1994), also followed by a desaturation into the trienoic form. Upon P shortage, the eukaryotic pathway is activated; PC hydrolysis releases a diacyl intermediate, which is then transferred to the plastid to synthesize MGDG and DGDG (Jouhet et al., 2003), creating a virtuous recycling of lipid intermediates between phospholipid breakdown and galactolipid increase. The *Arabidopsis* response to low P combines a rapid metabolic regulation, coupling MGDG synthesis to the phospholipid status (Dubots et al., 2010, 2012), with a longer term genomic reprogramming (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007) characterized by the up-regulation of phospholipases C and D (hydrolyzing phospholipids) and of monogalactosyldiacyl and digalactosyldiacyl isoforms (the galactosyltransferases synthesizing MGDG and DGDG, respectively). In P-starved conditions, a PG-to-SQDG replacement is observed and is considered to be a ubiquitous

phenomenon in photosynthetic organisms, enabling the preservation of an anionic lipid environment to the photosystems in the thylakoids (Boudière et al., 2014). No intense trafficking is required for this replacement, as SQDG and PG are both chloroplast lipids. The most spectacular feature of *Arabidopsis* lipid remodeling consists in the replacement of PC in a variety of subcellular locations, such as the plasma membrane, the tonoplast, and the mitochondria (but not observed in the endoplasmic reticulum [ER]), by DGDG synthesized in the chloroplast, using still uncharacterized lipid export systems (Andersson et al., 2003, 2005; Jouhet et al., 2003, 2004, 2007, 2010; Sandelius et al., 2007; Tjellström et al., 2008).

Lipid modifications triggered in *Arabidopsis* by a deprivation of N have not been studied as extensively. Upon N shortage, the quantity of N-containing lipids, in particular PC and phosphatidylethanolamine (PE), seems to be unaffected (Gauze et al., 2007). On the other hand, the main response includes a relative decrease of MGDG and an increase of DGDG, concomitant with an up-regulation of the genes encoding both digalactosyldiacyl isoforms, and a small increase of TAG synthesis (Gauze et al., 2007). It is not known whether any lipid trafficking can be triggered by N shortage, nor whether there are any changes in the lipid composition of cell compartments, like those documented in cells exposed to P shortage.

No such comprehensive study has been made in a diatom model. Acyl profiles of all glycerolipid classes and quantifications still have to be determined. The existence of redundant metabolic routes, similar to the prokaryotic and eukaryotic pathways dissected in *Arabidopsis*, also requires assessment. The conservation of some processes occurring in plants, such as a decrease of MGDG and an increase of DGDG in N-depleted conditions or an increase of MGDG and DGDG and a putative PC-to-DGDG replacement in P-depleted conditions, also should be investigated.

Studies in diatoms have benefited from developments in two model species, the centric diatom *T. pseudonana* (Coscinodiscophyceae) and the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae), for which intense efforts have resulted in fully sequenced genomes (Armbrust et al., 2004; Bowler et al., 2008) and provided reference data for transcriptomic (Maheswari et al., 2005, 2009; Allen et al., 2008; Sapriel et al., 2009; Shrestha et al., 2012; Chauton et al., 2013) and whole-cell proteomic (Montsant et al., 2005; Nunn et al., 2009) analyses. *P. tricornutum* is pleiomorphic, with three major morphotypes (fusiform, triradiate, and oval). A series of axenic strains have been collected in various marine environments worldwide, denoted Pt1 to Pt10 (De Martino et al., 2007), allowing analyses of phenotypic variations and the adaptation to various habitats.

In photosynthetic organisms, it is usually considered that, in standard conditions, phospholipids are mostly present in the endomembrane system, whereas nonphosphorus glycolipids are in the plastid. However, this distinction might be more complex in diatoms due to the physical connection between some membranes limiting the plastid with the endomembrane system and/or

mitochondria. Briefly, like all eukaryotes, diatoms contain a conventional endomembrane system comprising the ER, nuclear envelope, Golgi, trans-Golgi network, plasma membrane, etc., which are connected to each other by vesicular shuttles or tubular structures (Brighthouse et al., 2010). In addition, two semiautonomous organelles of endosymbiotic origins are present, a mitochondrion limited by two membranes and a plastid bounded by four membranes, which originate from a secondary endosymbiosis (Dorrell and Smith, 2011; Petroutsos et al., 2014). A continuum occurs between the ER and the outermost membrane of the plastid (Kroth et al., 2008). The glycerolipid composition of each of the four membranes that surround the plastid is simply unknown. Therefore, it is difficult to speculate on the location of MGDG and DGDG synthesis and whether any export of DGDG to other locations of the cell could be plausible, like that observed in plants. Given the current state of membrane fractionation techniques, only global analyses can be performed. By contrast with other omics data, and although previous targeted studies have allowed the structural determination of some isolated glycerolipid classes (Arao et al., 1987; Yongmanitchai and Ward, 1993; Naumann et al., 2011), the complete membrane glycerolipidome of *P. tricornutum* has not been fully characterized. The analyses of membrane glycerolipid remodeling in diatoms should also consider the accumulation of TAG triggered by nutrient shortage, which has been scrutinized in much more detail due to the potential applications for biofuels and green chemistry (Alonso et al., 2000; Rezanka et al., 2011; Zendejas et al., 2012; Levitan et al., 2014).

In this article, by combining multiple analytical techniques, we sought to characterize comprehensively the major membrane glycerolipid classes in *P. tricornutum*, together with TAG. FA profiles of each class have been determined, providing acyl signatures that can be used as markers for diacyl moiety origins and fluxes. With a fully characterized glycerolipidome in hand, we then analyzed changes triggered by N and/or P depletion and deduced from lipid class and acyl signature variations the dynamic processes driving the observed lipid remodeling.

RESULTS

Comparison of *P. tricornutum* Ecotypes in Nutrient-Replete and Nutrient-Limiting Batch Cultivation

We examined the responses of all available *P. tricornutum* accessions, collected originally in various geographical regions and covering all known morphotypes (i.e. the fusiform shape commonly observed in laboratory conditions, the triradiate shape thought to be more abundant in nature, and the oval shape, indicative of a temperature or salinity stress; De Martino et al., 2007; Fig. 1A). In our growth conditions, most accessions were fusiform except Pt8, which is mainly triradiate, and Pt3 and Pt9, which are oval. Cells grown in nutrient-replete

conditions (0.55 mM N and 0.0224 mM P, called here 1N1P) were shifted to $-N$ (0N1P) or $-P$ (1N0P) medium.

Nonpolar lipid accumulation (mainly TAG), known to be triggered by nutrient shortage in phytoplankton, was monitored using Nile Red fluorescence staining. N depletion triggered a faster TAG accumulation as compared with P depletion; therefore, the comparison of the response of the different ecotypes to $-N$ or $-P$ was made 3 d after N depletion (Fig. 1B) and 8 d after P depletion (Fig. 1C). All accessions showed a marked accumulation of TAG shortly after N depletion, except Pt4, which exhibited a relatively modest increase (a representative experiment is shown in Figure 1B). The detection of nonpolar lipid accumulation in response to low P required a much longer cultivation time in P-depleted medium, and no significant TAG accumulation could be detected after 3 to 5 d. After 8 d of growth in a P-limited medium, a contrasting phenotype in the series of Pt accessions could be observed (a representative experiment is shown in Figure 1C), with a substantial accumulation of nonpolar lipid in all accessions except Pt4, Pt10, and PtHK, in which the Nile Red staining was lower than a 2-fold increase, as compared with cells grown in a replete medium.

We did not observe any correlation between the magnitude of response to N or P depletion and the corresponding morphotypes. Phenotypic variations might be related, rather, to the efficiency of N or P storage systems in the different accessions and/or to the signaling and metabolic processes activated by the lack of nutrients. In all cases, an increase of Nile Red fluorescence, even moderate, was always detected, thus demonstrating that TAG accumulation is a marker of nutrient shortage. We decided to pursue our experiments on Pt1, the most commonly used strain in laboratories, which responded significantly to both N and P deprivations.

Effects of N and P Depletion on the Growth and Photosynthesis of *P. tricornutum*

Since P depletion exerted an effect after a longer time period than N depletion, we had to be sure, when studying the effect of P shortage, that no exhaustion of N occurred during the time of observation and that control conditions were indeed kept replete. To avoid such issues, we adjusted the initial nutrient-replete conditions to concentrations 10 times higher than that applied in our comparative study of ecotypes (i.e. 5.5 mM N and 0.22 mM P [a medium called 10N10P]). We checked that the 10N10P medium supported the growth of *P. tricornutum* Pt1 at higher cell densities compared with the 1N1P medium (Supplemental Fig. S1A). Most importantly, the photosynthetic capacity of cells, probed as photosynthetic capacity (F_v/F_m), remained unaltered for 10 d in the 10N10P medium, in stark contrast with cells grown in 1N1P medium, where F_v/F_m dropped quickly during the growth period (Supplemental Fig. S1B). After 5 d of cultivation in 1N1P medium, a decrease of F_v/F_m and an increase of nonpolar lipid content were measured

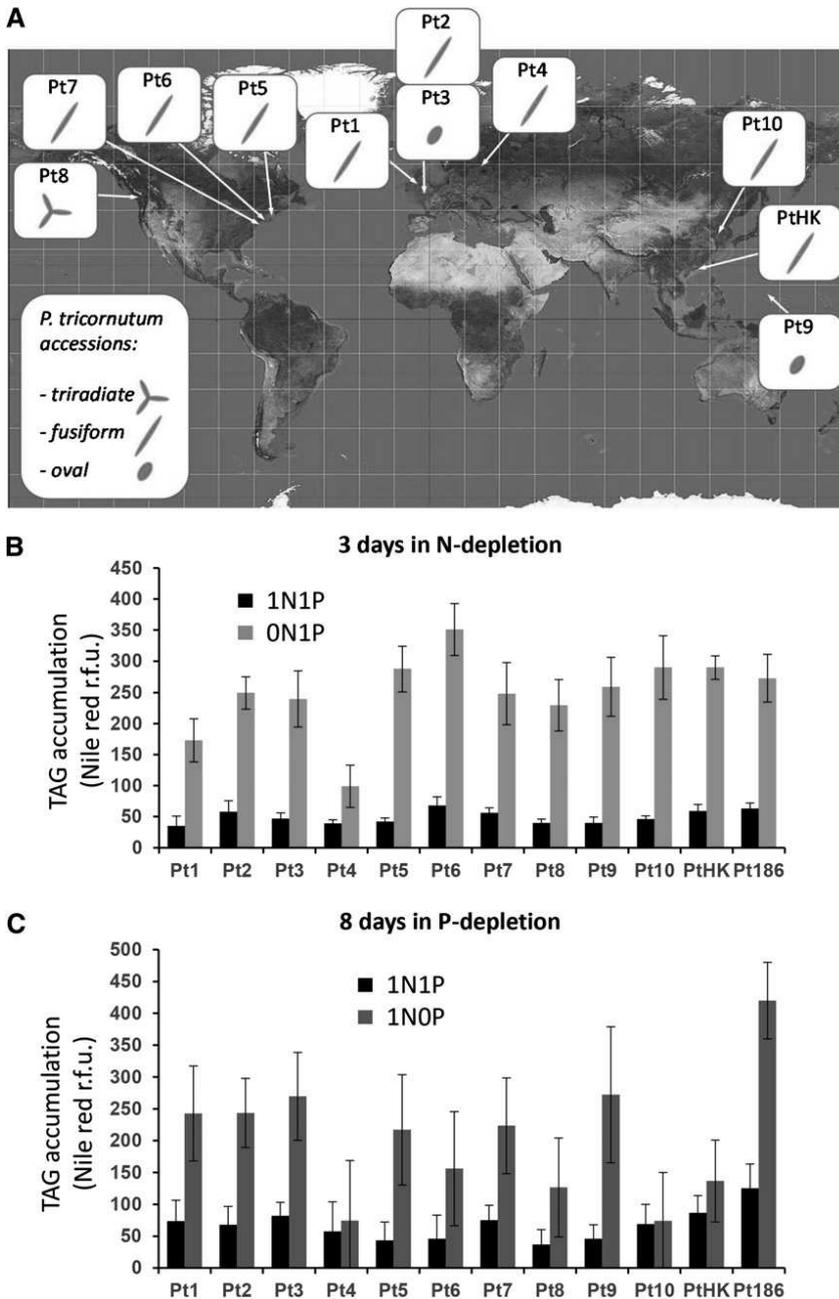


Figure 1. Preliminary comparison of accessions of *P. tricornutum* grown in artificial medium depleted in N or P. A, Geographical origin and major morphotypes of Pt accessions. The origin areas of sampling of Pt accessions are shown: Pt1 off Blackpool, United Kingdom; Pt2 and Pt3 off Plymouth, United Kingdom; Pt4 near the island of Segelskå; Pt5 in the Gulf of Maine; Pt6 off Woods Hole, Massachusetts; Pt7 off Long Island, New York; Pt8 near Vancouver, Canada; Pt9, Territory of Guam, Micronesia; PtHK, near Hong Kong; and Pt10, in the Yellow Sea. The genomic strain Pt1 8.6 derives from the Pt1 accession. Pt3 is a stress form deriving from Pt2. Major morphotypes observed for each accession in artificial seawater are indicated (i.e. the triradiate, fusiform, and oval morphotypes; from De Martino et al. [2007]). B, Accumulation of nonpolar lipids in N-limiting conditions. Cells in the exponential phase of growth were harvested by centrifugation and transferred to a fresh replete (1N1P; black bars) or N-depleted (0N1P; red bars) ESAW medium. Nonpolar lipid accumulation was measured after 3 d by Nile Red staining and expressed as fluorescence intensity normalized by cell number. C, Accumulation of nonpolar lipids in P-limiting conditions. Cells in the exponential phase of growth were harvested by centrifugation and transferred to a fresh replete (1N1P; black bars) or P-depleted (1N0P; blue bars) ESAW medium. Nonpolar lipid accumulation was measured after 8 d by Nile Red staining and expressed as fluorescence intensity normalized by cell number. r.f.u., Relative fluorescence units.

(Supplemental Fig. S1C), reflecting a nutrient limitation in the 1N1P medium that did not occur in the 10N10P condition.

We then evaluated the time scale of the Pt1 response after transfer to nutrient-limiting conditions. For this, the diatoms were grown in 10N10P medium until they reached a cell density of 6 to 7 million cells mL^{-1} . Cells were centrifuged, washed with 0N0P medium, and resuspended in 10N10P, 0N10P, and 10N0P media at a starting cell density of 3 to 3.5 million cells mL^{-1} . N depletion resulted in growth arrest after 1 d (Supplemental Fig. S2A) and led to an accumulation of nonpolar lipids after 4 d (based on Nile Red fluorescence; Supplemental Fig. S2B). P depletion affected neither growth nor lipid

accumulation between days 0 and 4 (Supplemental Fig. S2, A and B), consistent with the delay observed for the different accessions grown in 0N1P or 1N0P medium, before any visible effect could be measured (Fig. 1, B and C).

We then cultivated Pt1 cells in sufficient amounts to analyze in parallel their cell phenotypes, photosynthetic properties, and lipidomic profiles. Based on previous experiments (Supplemental Fig. S2B), F_v/F_m was selected as an indicator of nutrient limitation (Fig. 2A). At day 5, cells grown in 10N10P and 0N10P were harvested, whereas cells grown in 10N0P were kept in the culture medium until day 13. We should note that at days 5, 8, and 10, 30% of the 10N0P culture volume was replaced by fresh 10N0P medium to ensure that no other

nutrient limitation besides P would occur. In parallel, a 10N10P culture was similarly complemented with fresh 10N10P medium and kept as a control condition during the same period. After 13 d of P limitation, the cells were clearly impacted in their photosynthetic activity (Fig. 2A) and showed a high nonpolar lipid content (Fig. 2B). At the same time point, the control cultures also showed a slightly diminished F_v/F_m , which was not attributed to N or P deprivation, since we did not observe any TAG accumulation (Fig. 2B). Since we did not detect any significant change in the TAG content and membrane glycerolipid profile of cells grown in 10N10P medium collected after 5 or 13 d of culture, we used cells collected after 5 d in 10N10P as a control to compare nutrient-starved and nutrient-replete cells.

Comprehensive Characterization of the Glycerolipid Content of *P. tricornutum* Pt1 Grown in Nutrient-Replete Medium

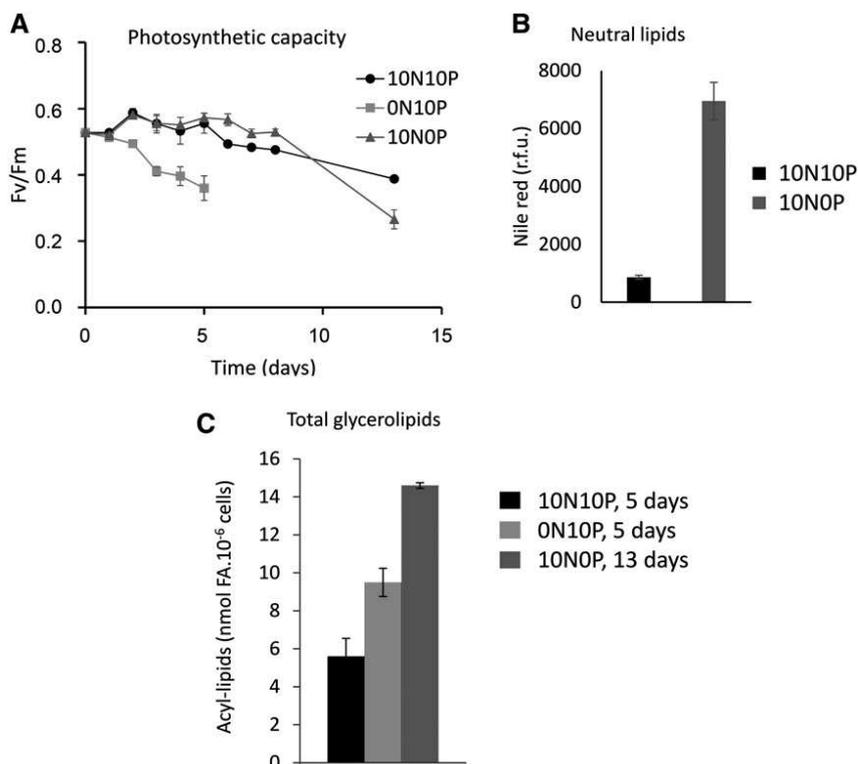
We extracted the lipids from *P. tricornutum* cells with great caution to avoid lipid degradation. For this purpose, samples were freeze dried rapidly after harvest and lipids were extracted following a treatment in boiling ethanol to inactivate lipase activities. An aliquot fraction of the total extract of glycerolipids was transesterified in the presence of methanol, thus producing fatty acid methyl esters (FAMES) that were separated by gas chromatography and quantified by flame ionization detection (GC-FID), as described in "Materials and Methods." We used thin-layer chromatography (TLC)

to separate the different classes of glycerolipids, combining robust one-dimensional and two dimensional TLC systems to separate, on the one hand, nonpolar glycerolipids and free FA, and on the other hand, polar glycerolipids (phosphoglycerolipids and nonphosphorus glycerolipids; Fig. 3; Supplemental Fig. S3). We analyzed the structure of lipids in each spot revealed on the TLC plate (see "Materials and Methods") by mass spectrometry (MS; Tables I–III) and determined the corresponding FAME profiles by GC-FID.

The total glycerolipid extract from *P. tricornutum* grown in a 10N10P medium had a FA composition similar to those already reported in the literature for diatoms (Guschina and Harwood, 2006; Liang et al., 2014) and eustigmatophytes such as *Nannochloropsis graditana* (Simionato et al., 2013): that is, strikingly enriched in C16 molecular species (16:0, 16:1, 16:2, and 16:3) and eicosapentaenoic acid (20:5) and poor in C18 FAs (Fig. 4A).

We analyzed the different classes of glycerolipids in the extract (Fig. 4B), providing, to our knowledge, the first reference for a complete glycerolipidome of *P. tricornutum* in unstressed conditions. The profile is dominated by MGDG, SQDG, and PC, which together represent more than 75% of the total content. We also confirmed the presence of 20:5 acyl-SQDG, as reported previously (Naumann et al., 2011; Supplemental Fig. S4). We identified a spot corresponding to diacylglycerol-hydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine (DGTA; Figs. 3 and 4B; Supplemental Fig. S3), a betaine glycerolipid that had not yet been reported for *P. tricornutum* but has been reported for other algae such as *Phaeocystis* sp. (Haptophyceae), *Ochromonas danica* (Chrysophyceae),

Figure 2. Photosynthetic activity and lipid accumulation in the Pt1 ecotype of *P. tricornutum* cultivated in replete or N- or P-depleted conditions. A, Time-course evolution of photosynthetic efficiency. The F_v/F_m ratio, representative of the photosynthetic efficiency of the diatom, was measured for Pt1 cells grown either in a replete medium (10N10P; black) or in medium deprived of N (0N10P; blue) or P (10N0P; red). B, Nonpolar lipid accumulation measured at day 13. Nonpolar lipid accumulation was estimated by the Nile Red fluorescence normalized to cell number. In 10N10P, the fluorescence signal remained at background level, indicating that the F_v/F_m decrease was not due to N or P starvation. r.f.u., Relative fluorescence units. C, Total glycerolipid accumulation. The total level of glycerolipids (membrane lipids + TAG) was estimated by the total FA content after 5 d of cultivation in the replete condition (black bar) or following N starvation (red bar) or 13 d of P starvation (blue bar). To avoid any N deficiency in 10N10P or 10N0P culture, the media were replaced by fresh ESAW 10N10P medium every 3 d.



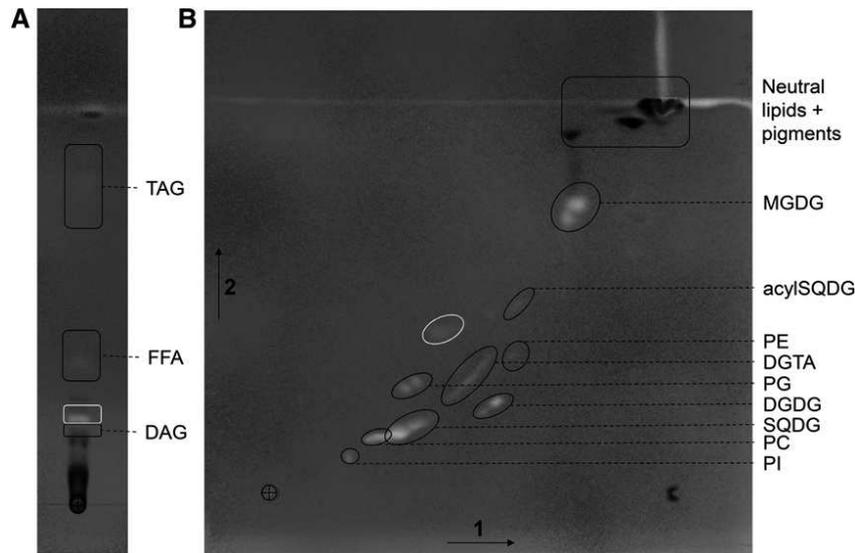


Figure 3. Separation by TLC of the glycerolipids from *P. tricornutum*. Lipids from Pt1 cells grown in a replete medium (10N10P) were extracted and resolved following the procedures described in “Materials and Methods.” The cross indicates the initial deposit. A, One-dimensional separation of nonpolar lipids (DAG and TAG) and free FA (FFA). Migration was performed in hexane:diethylether:acetic acid (70:30:1, v/v). B, Two-dimensional separation of polar (membrane) lipids. Migration was performed in chloroform:methanol:water (65:25:4, v/v) for the first dimension (arrow 1) and chloroform:acetone:methanol:acetic acid:water (50:20:10:10:5, v/v) for the second migration (arrow 2). Lipids were visualized under UV light, after spraying with 2% 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid in methanol, and scraped off the plate for analyses. Identification of the lipid in each spot was performed by MS2 analyses. The spot circled in white is an unknown compound with a structure that differs from a glycerolipid.

and some brown algae such as *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae; Dembitsky, 1996). DGTA has the same mass as diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine (DGTS) but could be discriminated by a different migration position on two-dimensional TLC (Vogel and Eichenberger, 1992) and, following tandem mass spectrometry (MS2) fragmentation, by the absence of a fragment corresponding to a loss of mass-to-charge ratio (m/z 87; Armada et al., 2013). We did not detect the presence of DGTS in *P. tricornutum*.

Nonpolar lipids, DAG and TAG, are also present but in minor amounts (e.g. TAG represented only 1%–3% of the total glycerolipids when cells were grown in the 10N10P medium; Fig. 4B). We were not able to identify in our TLC system any spot corresponding to phosphatidic acid, diphosphatidylglycerol, and phosphatidyl-Ser. This does not mean that these phospholipids are absent in *P. tricornutum* but indicates that they each represent less than 1% of the total glycerolipid content. Overall, the main lipids are the four chloroplast lipids present in every photosynthetic membrane (i.e. MGDG, SQDG, DGDG, and PG) together with PC, which is usually the main glycerolipid in nonplastid membranes, although in diatoms its abundance in the four membranes surrounding the chloroplast cannot be excluded.

The positioning of FAs on each glycerolipid (summarized in Table III) was determined using MS and MS2 analyses, as described in Table II. The FA molar profiles (percentage) of the three main membrane lipids and the nonpolar glycerolipids are shown in Figure 5.

Several general features can be deduced from Table III. First, we confirmed previous analyses (Arao et al.,

1987; Yongmanitchai and Ward, 1993) reporting that 16:3 is always located at the *sn*-2 position and 20:5 at the *sn*-1 position, except when two 20:5s are present. Almost all glycerolipids have a C16 FA at the *sn*-2 position, suggesting that the plastid lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT), an enzyme called Arabidopsis seed gene2 (ATS2) in plants, has a very high selectivity for a C16-acyl carrier protein (C16-ACP), as in higher plants (Frentzen et al., 1983), and that the plastid pathway (also known as the prokaryotic pathway) for the synthesis of the diacylglycerol backbone of glycerolipids is largely dominant in diatoms (Mongrand et al., 1998). Considering MGDG, for example, the most abundant species is 20:5/16:3, in agreement with our gas chromatography analyses (Fig. 5). Generally speaking, 16:3 and 16:4 are restricted to MGDG and only found at the *sn*-2 position. Considering DGDG, synthesized from MGDG, the *sn*-2 position is also esterified exclusively to a C16-FA, suggesting that these molecular species could originate from the same plastidic pathway. FAs in the *sn*-2 position are more saturated than those in MGDG (no 16:3 and 16:4 could be detected), suggesting that the desaturation of MGDG in 16:3 and 16:4 could be a way to lock an MGDG diacylglycerol backbone, preventing its utilization as a substrate for the synthesis of other glycerolipids, as shown previously in plants (Boudière et al., 2012; Petroustos et al., 2014) and in *Chlamydomonas reinhardtii* (Li et al., 2012). By contrast with plants, the *sn*-1 position of MGDG contains a very low proportion of C18 molecular species, with only about 8% of 18:0/16:3. The acyl profile of the different lipid classes, therefore,

Table I. Identification of glycerolipids from *P. tricornutum*

Characteristic fragments generated by fragmentation of the parent ion (MS2) are shown, together with the associated references.

Analyzed Lipids	Polarity	Ion Analyzed	Specific Fragments in MS2 Scan	References
Phospholipids				
PC	+	[M + H] ⁺	Neutral loss of <i>m/z</i> 59	Domingues et al. (1998)
PE	+	[M + H] ⁺	Neutral loss of 141	Brügger et al. (1997)
Phosphatidylserine	+	[M + H] ⁺	Neutral loss of 185	Brügger et al. (1997)
PG	+	[M + NH ₄] ⁺	Neutral loss of 189	Taguchi et al. (2005)
PI	+	[M - H] ⁻	Precursors of <i>m/z</i> 241	Hsu and Turk (2000b)
Phosphatidic acid	+	[M + NH ₄] ⁺	Neutral loss of 115	Li-Beisson et al. (2010)
Nonphosphorus glycerolipids				
SQDG	-	[M - H] ⁻	Precursors of <i>m/z</i> 225	Gage et al. (1992); Welti et al. (2003)
ASQ	-	[M - H] ⁻	Precursors of <i>m/z</i> 509	Naumann et al. (2011)
MGDG	+	[M + NH ₄] ⁺	Neutral loss of 179	Li-Beisson et al. (2010)
DGDG	+	[M + NH ₄] ⁺	Neutral loss of 341	Moreau et al. (2008)
DGTA	+	[M + H] ⁺	Precursors of <i>m/z</i> 236; neutral loss of 59; no neutral loss of 87 as found for DGTS	Armada et al. (2013)
Neutral glycerolipids				
Free FA	-	[M - H] ⁻		
DAG	+	[M + NH ₄] ⁺	Scan of [M+NH ₄ -RCOONH ₄] ⁺	Camera et al. (2010)
TAG	+	[M + NH ₄] ⁺	Scan of [M+NH ₄ -RCOONH ₄] ⁺	Hsu and Turk (2010)

indicates (1) that the FA synthases of the chloroplast produce 14:0, 16:0, and 18:0 species, (2) that the acyl-ACP $\Delta 9$ -desaturase is mainly active on 16:0 rather than on 18:0, and (3) that the plastid glycerol-3-phosphate acyl-transferase (an enzyme called ATS1 in plants) may have a lower affinity for C18 substrates than plant ATS1. The relative availability of acyl-ACP substrates (C16, C18, and C20 molecular species) also might be an important determinant, as it was recently reported that the level of C18 FA increased in MGDG when shifting the growth temperature from 20°C to 30°C, a condition known to lower 20:5 biosynthesis (Dodson et al., 2014).

PE, PC, and DGTA, which are likely synthesized in extraplastidic membranes, also contain C16 species at the *sn*-2 position, together with C18 and C20 FAs. The

occurrence of a C16 FA at the *sn*-2 position in this lipid is consistent with two hypotheses: either an export of a prokaryotic diacylglycerol backbone or the fact that the microsome LPAAT has no selectivity for FA molecular species, by contrast with the plastid LPAAT. Thus, in *P. tricornutum*, no specific signature could be determined for a potential eukaryotic pathway providing diacyl precursors to plastid lipids, as defined, respectively, in *Arabidopsis* and other microalgae such as *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011). A similar unbiased chain-length incorporation at the *sn*-2 position in *P. tricornutum* has also been observed in some chlorophytes such as *Dunaliella bardawil* (Davidi et al., 2014), despite their distant lineages. In addition, PE, PC, and DGTA retained most of the C18 present in the cells. It is also noteworthy that we

Table II. Conditions for the regiochemical assignment of FAs at *sn*-1, *sn*-2, and *sn*-3 positions in glycerolipids from *P. tricornutum*

Analyzed Lipids	Polarity	Ion Analyzed	MS2 Fragment Properties	References
Phospholipids				
PC	+	[M + H] ⁺	[M+H-R ₂ CH = C = O] ⁺ > [M+H-R ₁ CH = C = O] ⁺	Hsu and Turk (2003)
PE	-	[M - H] ⁻	[R ₂ COO] ⁻ > [R ₁ COO] ⁻	Hsu and Turk (2000a)
PG	-	[M - H] ⁻	[M-H-R ₂ COOH] ⁻ > [M-H-R ₁ COOH] ⁻	Hsu and Turk (2001)
PI	-	[M - H] ⁻	M-H-R ₂ COOH] ⁻ > [M-H-R ₁ COOH] ⁻	Hsu and Turk (2000b)
Nonphosphorus glycerolipids				
SQDG	-	[M - H] ⁻	[M-H-R ₁ COOH] ⁻ > [M-H-R ₂ COOH] ⁻	Zianni et al. (2013)
ASQ	-	[M - H] ⁻	[M-H-R ₁ COOH] ⁻ > [M-H-R ₂ COOH] ⁻	Naumann et al. (2011)
MGDG	+	[M + Na] ⁺	[M+Na-R ₁ COO] ⁺ > [M+Na-R ₂ COO] ⁺	Guella et al. (2003)
DGDG	+	[M + Na] ⁺	[M+Na-R ₁ COO] ⁺ > [M+Na-R ₂ COO] ⁺	Guella et al. (2003)
DGTA	+	[M + H] ⁺	[M+H-R ₂ COOH] ⁺ > [M+H-R ₁ COOH] ⁺	By analogy with phospholipid diacylglycerol moiety
Nonpolar glycerolipids				
DAG	+	[M + NH ₄] ⁺	[M+NH ₄ -R ₁ COONH ₄] ⁺ > [M+NH ₄ -R ₂ COONH ₄] ⁺	Camera et al. (2010)
TAG	+	[M + NH ₄] ⁺	[M+NH ₄ -R _{1/3} COO] ⁺ > [M+NH ₄ -R ₂ COO] ⁺	Hsu and Turk (2010)

Table III. Positional distribution of FAs, and molecular species found in each glycerolipid class

Only molecules that represent more than 5% of all the species present in the class are indicated. The asterisk indicates where the *sn*-1 and *sn*-2 positions could not be discriminated. Major molecular species of a given lipid class are shown in bold characters.

<i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	MGDG	DGDG	SQDG	ASQ	PG	PC	DGTA	PE	PI	DAG	TAG
14:0/16:0			6.9	6							
14:0/16:1			16.5	13.2						14.5	
16:0/16:0			4.6								
16:1/16:0	5.2	8.7	23.9	8.2	31.7				100	54.8*	
16:1/16:1	6.6	14.1			4.9	5.2	5.1			30.8	
16:1/16:2		5.4									
16:1/16:3	7.9										
16:1/18:1	5.4										
16:1/24:0			9.7								
16:2/16:0			9.6								
16:2/16:3	10.5										
18:0/16:3	7.7										
18:2/18:2						5.2					
20:5/14:0				12.7							
20:5/16:0		6.6	9.4	53.5	11.2	6.9					
20:5/16:1		16.1			48.5	12.1	13	11.3			
20:5/16:2	5.1	34.3				5	5.2	6.4			
20:5/16:3	19.1	7.3									
20:5/16:4	7.4										
20:5/18:2							7	7.8			
20:5/18:3						7	4.9	5.6			
20:5/18:4							5.7	6.2			
20:5/20:4						7.2		9.2			
20:5/20:5						20.1	11.1	24			
<i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2/ <i>sn</i> -3											
14:0/16:1/16:1											6.5
14:0/16:1/16:0											9.3
16:1/16:1/16:1											11
16:1/16:1/16:0											23.5
16:1/16:0/16:0											16
16:1/16:0/20:5											5

found only one species of phosphatidylinositide (PI), with a 16:1/16:0 scaffold, suggesting a peculiar role for this phospholipid. PG showed two major species, 20:5/16:1 and 16:1/16:0, always with a C16 at position *sn*-2. It was reported previously that 16:1 at the *sn*-1 position was 16:1 (ω -7) (cis-desaturation in ω -7 or Δ -9 position) and 16:1 at the *sn*-2 position was 16:1(ω -13)t (trans-desaturation at position ω -13; Arao et al., 1987). Because the C16 trans-isomer is found only in chloroplast PG, it is likely that the 20:5/16:1 PG is located in plastids and that the 16:1/16:0 PG, similar to PI, is an extraplastidic PG species.

We also found that acyl-SQDG always harbors a 20:5 linked to its polar head, with the same diacylglycerol backbones as those found in SQDG species but with a highly dissimilar distribution. The main species of 20:5 acyl-SQDG was 20:5/16:0, and the corresponding SQDG substrate represented only 10% of its own class of lipid. Assuming that acylation occurs on SQDG (Riekhof et al., 2003), this observation suggests that it should be quite specific for the molecular species 20:5/16:0.

Concerning nonpolar lipids, the DAG pool is mainly constituted of three different molecular species, dominated by 16:1/16:0 and 16:1/16:1, with a lower amount of 14:0/16:1. Although minor amounts of C18 and C20 were detected in DAG by gas chromatography analysis

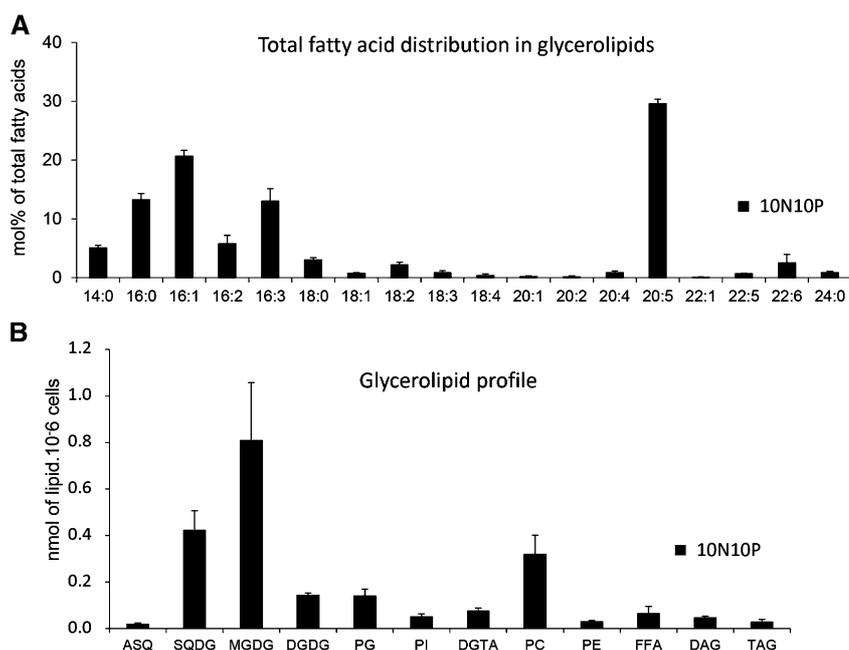
(Fig. 5), these FAs were not detected by MS analyses, indicating that DAG species having a C18 or C20 were minor and could not be discriminated from the background. The DAG acyl composition (Table III) does not reflect the composition found in the main membrane lipids, in support of a *de novo* synthesis rather than a recycling of the diacylglycerol backbone from membrane lipids. These DAG molecular species are clearly at the origin of the TAG pool, also dominated by 16:0 and 16:1, with lower amounts of 14:0 and some 20:5 at position *sn*-3 (or *sn*-1). The proportion of TAG among other glycerolipids was low, reflecting the absence of any nutrient limitation.

Based on our structural determination of glycerolipid classes, we thus generated a reference profile for glycerolipids in *P. tricornutum* grown in nutrient-replete conditions. Based on this, we then assessed the variation of the glycerolipidome in nutrient-limited cells.

Impact of N and P Shortage on the Glycerolipid Content of *P. tricornutum* Pt1

We analyzed the glycerolipid profile in *P. tricornutum* Pt1 cells after 5 d of N starvation and 13 d of P starvation:

Figure 4. Quantitative analysis of *P. tricornutum* glycerolipids. Lipids from Pt1 cells grown in a replete medium (10N10P) were extracted, separated by TLC, and analyzed as described in “Materials and Methods.” A, Global FA profile in a total lipid extract. FA proportions are given in percentages. B, Quantitative analysis of the various glycerolipids identified after TLC separation. Glycerolipids are expressed in nmol 10^{-6} cells and not as the summed FA content in each class. Each result is the average of three biological replicates \pm SD. ASQ, 20:5-Acyl-SQDG; FFA, free FAs.



that is, when strong impacts on both the photosynthetic capacity (based on the F_v/F_m ratio) and the nonpolar lipid content (based on Nile Red staining) could be observed (Figs. 1 and 2). Figure 6A shows the glycerolipid profile in the three contexts: control (10N10P), N oligotrophic (0N10P), and P oligotrophic (10N0P). We observed the following trends. (1) A considerable increase of TAG content, on a per cell basis, was observed in both N- and P-limiting conditions, reaching 40 and 60%, respectively, of the total glycerolipid content (i.e. a 45-fold and a 100-fold increase when compared with control conditions). (2) The MGDG content decreased in both conditions. This decrease was more pronounced in the case of N shortage, whereas the levels of the other membrane lipids remained almost unchanged, except for PG, which also decreased by a factor of 2. (3) A total disappearance of the phospholipids was observed in the P-starved condition, including the major phospholipids PC and PG, coinciding with a strong increase of DGTA and slight increases of DGDG and SQDG.

The nature and amounts of FA, measured as a whole (Fig. 6B), were also affected by nutrient limitation, with marked increases of 16:0 and 16:1 and a smaller albeit significant increase of 14:0, in support of an induced FA neosynthesis. Interestingly, the total amount of 20:5, the dominant FA in the control condition, remained almost unchanged. Thus, in the nutrient-limiting conditions, the dominant FA is no longer 20:5 but 16:1. Generally speaking, with the notable exception of TAG, the FA composition remained unchanged in the different glycerolipids (data not shown). A specific focus on TAG (Fig. 6C) indicated that not only 14:0, 16:0, and 16:1 but also 20:5 increased. In fact, the proportion of 20:5 in this class of lipids increased from about 1% in the control conditions to 8% in the N-starved and 6% in the P-starved

conditions, suggesting a specific enrichment of 20:5 in TAG. MS analysis indicated that 20:5, as observed in control cells, was esterified at the *sn*-3 (or *sn*-1) position, indicating that this FA had been incorporated during the latter phases of TAG biosynthesis.

In order to better understand the origin of these FAs accumulating in TAGs, we measured the amount of 16:1 and 20:5 in each glycerolipid (Fig. 7A). The level of 16:1 remained approximately constant in all glycerolipids except in TAG, indicating that the observed increase of 16:1 (Fig. 6B) was mainly, if not only, correlated to the increase of TAG synthesis and reflected FA neosynthesis. In the N-starved condition, the level of 20:5 increased in TAG and decreased in MGDG by about the same amount (Fig. 7B). Because it almost remained constant in the other glycerolipids, this result suggests a 20:5 transfer from MGDG to TAG, as observed previously in *N. graditana* (Simionato et al., 2013) and *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011).

In the P-limiting conditions, the situation was more complex. A stronger increase of 20:5 was observed in the TAG pool, together with a smaller decrease in the MGDG pool than was observed in N-starved cells. No phospholipid, containing initially a high proportion of 20:5, could be detected. Recycling of phospholipid FAs, therefore, also could contribute to the 20:5 enrichment of TAG. Furthermore, an increase of SQDG and DGTA was observed (Fig. 6A), consistent with (1) a PG replacement by SQDG in the plastid and (2) a possible recycling of the PC diacylglycerol moiety into DGTA, taking place in an extraplasmic membrane. This hypothesis is based on the strong increase of 20:5 in DGTA, likely reflecting the quantitative increase of the DGTA pool (Fig. 6A) rather than a specific 20:5 enrichment, because the global FA composition remained largely unaffected.

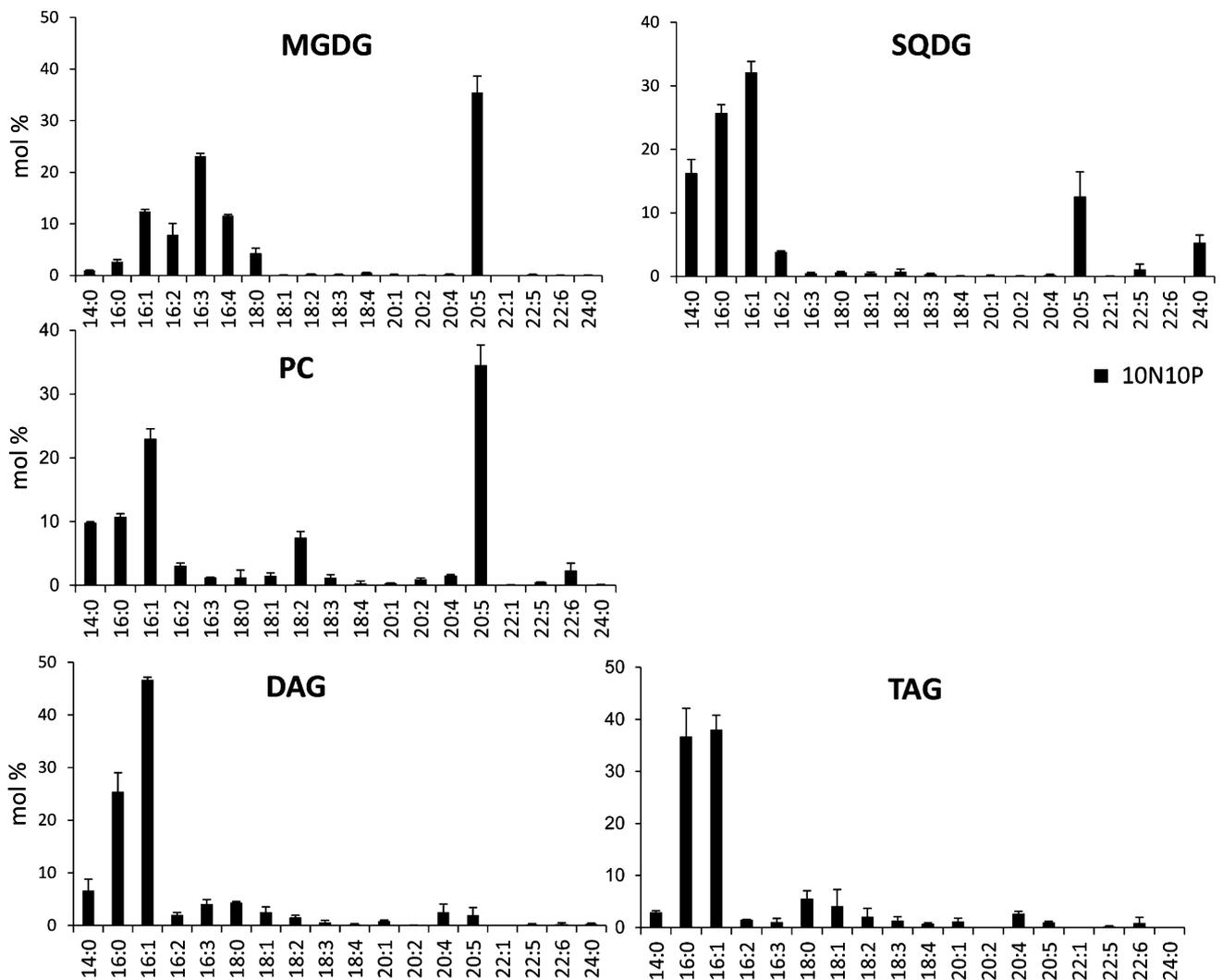


Figure 5. Molar profiles of FAs in PC, DAG, TAG, MGDG, and SQDG. Lipids from Pt1 cells grown in a replete medium (10N10P) were extracted, separated by TLC, and analyzed for their FAs as described in "Materials and Methods." Note that a cross contamination is possible between SQDG and PC due to the proximity of the TLC spots, leading to moderate enrichment of 20:5 in SQDG and 14:0 in PC. Each result is the average of three biological replicates \pm SD.

DISCUSSION

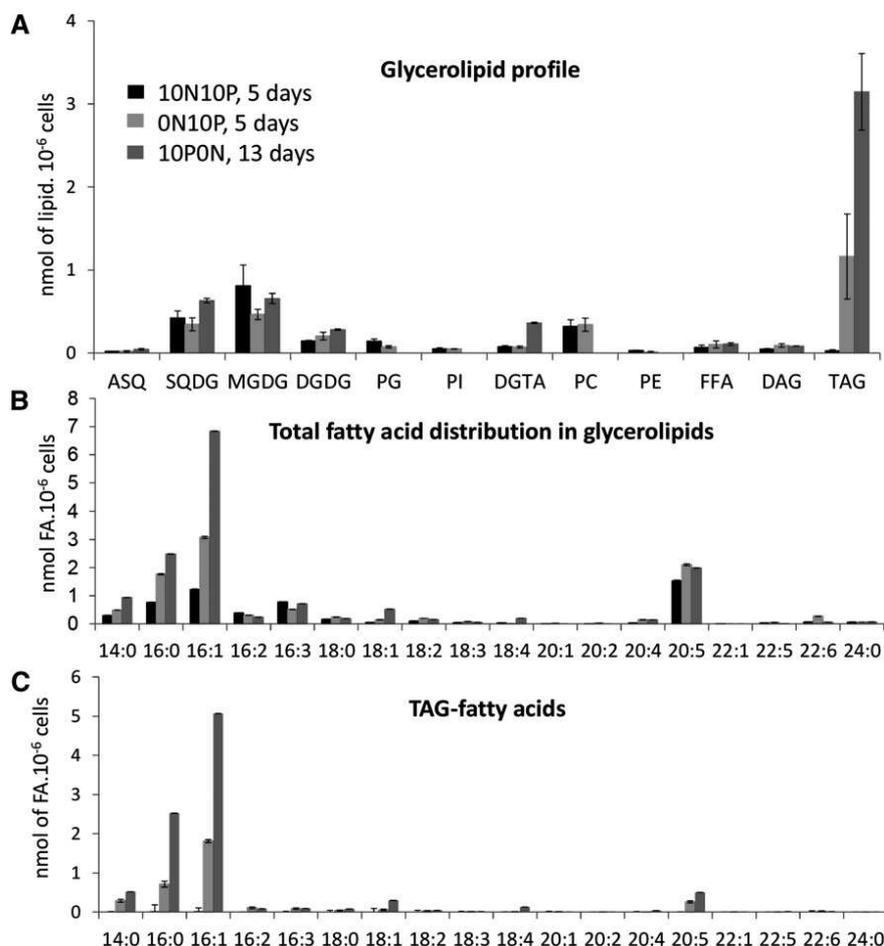
A Reference Glycerolipid Profile for *P. tricornutum*

The glycerolipid composition of *P. tricornutum* presents a strong similarity with those reported for other photosynthetic unicellular eukaryotes (Dembitsky, 1996) but also specific differences. Besides the major lipids conserved in photosynthetic membranes (i.e. MGDG, DGDG, SQDG, and PG), we confirmed the presence of 2'-*O*-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerides (20:5-acyl-SQDG [ASQ]), largely dominated by the molecular species *sn*-1:20:5/*sn*-2:16:0/2':20:5 (Naumann et al., 2011). The presence of ASQ has also been reported for *C. reinhardtii*, although 18:3 or 18:4 acyl groups were the FAs involved in the 2'-acylation of the sulfoquinovose moiety (Riekhof et al., 2003). To date, there is no evidence for a physiological or biochemical role of ASQ. The large proportion of SQDG

also suggests that this lipid might not be restricted to chloroplast membranes; therefore, the subcellular localization of SQDG and ASQ should be assessed in the future.

Notwithstanding, an *SQD1* *C. reinhardtii* mutant, lacking SQDG and ASQ, was clearly impaired in its photosynthetic capacities and in its response to inorganic phosphate deficiency, indicating altered membrane properties and an inability to adjust its membrane composition to adapt to environmental change (Riekhof et al., 2003). These experiments did not reveal any specific role of ASQ versus SQDG, but the results presented here indicate that, if SQDG is the precursor of ASQ, as postulated previously (Riekhof et al., 2003), this acylation process is quite specific for one minor SQDG species, *sn*-1:20:5/*sn*-2:16:0, representing less than 10% of the total SQDG. Such specificity in the acylation process suggests the existence of a specific role for ASQ.

Figure 6. Quantitative analysis of FAs and glycerolipids in *P. tricornutum* grown in nutrient-replete conditions or in medium devoid of either N or P. Lipids from Pt1 cells grown either in a replete medium (10N10P; black) or in medium deprived of N (0N10P; blue) or P (10N0P; red) were extracted, separated by TLC, and quantified as described in “Materials and Methods.” To avoid any N deficiency in 10N10P or 10N0P culture, media were replaced by fresh ESAW 10N10P or 10N0P medium every 3 d. Lipids were analyzed after 5 d of cultivation in replete conditions (black bars), N starvation (red bars), or after 13 d for P starvation (blue bars). A, Changes in glycerolipid content. Note that in the P-depleted condition, phospholipids were not detectable. B, Changes in FA content. C, FA profile in TAG. Each result is the average of three biological replicates \pm SD. ASQ, Acyl-SQDG; FFA, free FAs.



Based on sequence similarity, we identified gene candidates for a plastid-localized synthesis of glycerolipids: a putative chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase (ATS1 homolog; Phatr_3262), a chloroplast 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase (ATS2 homolog; Phat_43099), three MGDG synthase isoforms (three monogalactosyldiacyl homologs; Phatr_14125, Phatr_54168, and Phatr_9619), three DGDG synthase isoforms (three digalactosyldiacyl homologs; Phatr_12884, Phatr_11390, and Phatr_43116), a UDP-sulfoquinovose synthase (SQD1; Phatr_21201), and two SQDG synthase isoforms (two SQD2 homologs; Phatr_50356 and Phatr_42467). One or both of these SQD2 homologs also could be involved in the synthesis of ASQ.

The results obtained in this study indicate that FAs are synthesized in the stroma of chloroplasts by type II FA synthases, mainly as 14:0-, 16:0-, and 18:0-ACP. The presence of the saturated form of C18 in plastid lipids (i.e. 18:0) and the position of desaturation of 16:3 $\Delta_{6,9,12}$ in MGDG (Domergue et al., 2003) suggest that the plastid Δ^9 -acyl-ACP desaturation might operate only on 16:0-ACP, releasing 16:1(ω -7)-ACP.

In plants, there are two pools of PG: one localized in the plastid, with a prokaryotic diacylglycerol backbone and a specific FA at the *sn*-2 position, 16:1(ω -13)t; and one in microsomal membranes and mitochondria, with

a so-called eukaryotic diacylglycerol backbone assembled in the ER. In Arabidopsis, two enzymes are thus responsible for PG synthesis: Phosphatidylglycerophosphate synthase1 (PGP1), localized in both chloroplast and mitochondria (Babiychuk et al., 2003), and PGP2, localized in the ER (Müller and Frentzen, 2001). By studying *pgp* mutants, it was established that the PGP1-dependent pathway was responsible for 70% of PG synthesis in leaves and was required for the development of green leaves and chloroplasts with well-developed thylakoid membranes (Hagio et al., 2002; Xu et al., 2002), whereas the *pgp2* mutant showed a small decrease in PG content compensated by a slight increase in PI content (Tanoue et al., 2014). Based on the facts that PG and PI biosynthesis pathways share their precursors (i.e. phosphatidic acid and cytidine diphosphate-diacylglycerol [CDP-DAG]) and that PGP2, the PI synthase, and the extraplastidic CDP-DAG synthases are all localized in the ER (Löffke et al., 2008; Zhou et al., 2013), the accumulation of PI in the Arabidopsis *pgp2* mutant is consistent with an accumulation of CDP-DAG. In *P. tricornutum*, we found only two species of PG, the 20:5/16:1 form, which is probably plastidic with 16:1(ω -13)t at the *sn*-2 position, and the 16:1/16:0 form, which we expect to be extraplastidic, having exactly the same composition as PI. Together, these results suggest that the extraplastidic CDP-DAG synthase

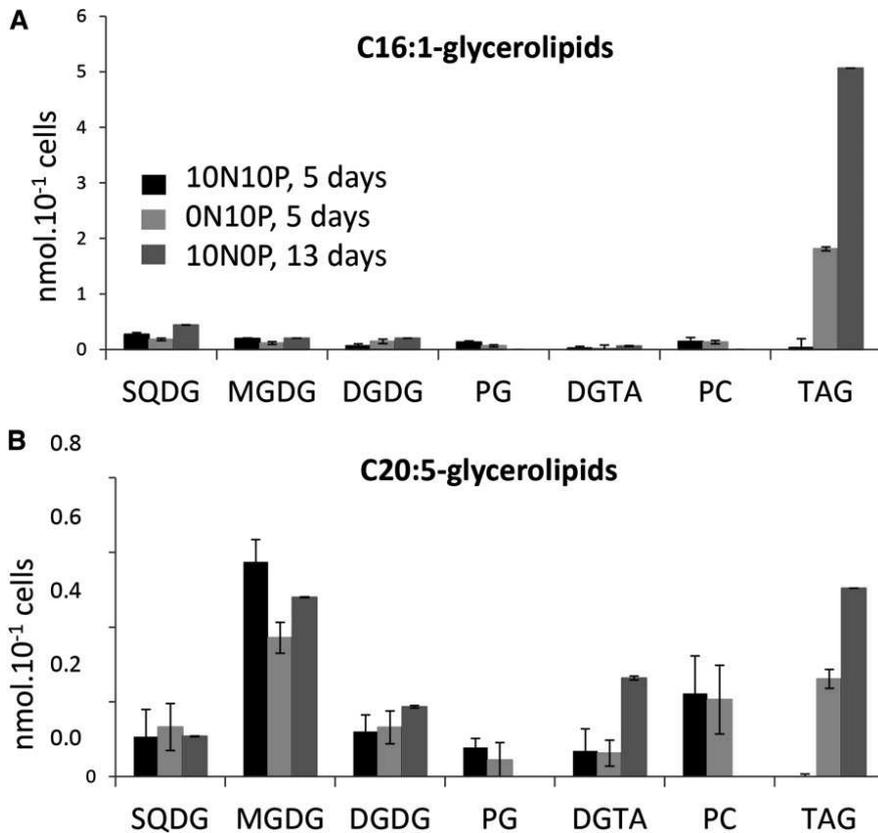


Figure 7. Distribution of 16:1 and 25:0 FAs in the glycerolipid classes of *P. tricornutum* grown in nutrient-replete conditions or in medium devoid of either N or P. Lipids from Pt1 cells grown in a replete medium (10N10P) were extracted, separated by TLC, and quantified as described in “Materials and Methods.” Lipids were analyzed after 5 d of cultivation in replete condition (black bars), N starvation (red bars), or after 13 d of P starvation (blue bars). A, Quantitative distribution of 16:1 in the major glycerolipid classes. B, Quantitative distribution of 25:0 in the major glycerolipid classes. Each result is the average of three biological repeats \pm SD.

is highly specific for a 16:1/16:0 substrate. Furthermore, the conservation of 16:0 at the *sn*-2 position in extraplastidic PG and PI in different algae species (Araki et al., 1987; Giroud et al., 1988; Liang et al., 2014) differs strikingly from the eukaryotic route observed in plants.

The preservation of the medium-chain FA in PI and extraplastidic PG might be important for their biological function. This result further supports either the absence of any FA selectivity of the extraplastidic LPAAT as being the basis of the plant eukaryotic signature or an export of the prokaryotic diacylglycerol backbone, as suggested in *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011). In the *P. tricornutum* genome, two putative CDP-DAG synthases can be predicted (Phatr_559 and Phatr_7678), and future functional studies should help to ascertain whether one is specific for the production of PG/PI precursors.

In addition to the classical phospholipids that make up the bulk of nonphotosynthetic membranes, we report the presence of DGTA, a betaine glycerolipid never observed previously in *P. tricornutum*. BL have been detected in numerous algae (comprehensively reviewed by Dembitsky [1996]). Both DGTA and DGTS are usually associated with nonplastid membrane compartments (Künzler et al., 1997) and have structural similarities to PC (Sato and Murata, 1991). Therefore, we can speculate that DGTA might be more abundant in the endomembrane system and may be present in the outermost of the four membranes of the chloroplast, connected to the nuclear envelope. We identified a candidate gene that might be involved in BL synthesis, Phatr_42872, whose role should

be assessed in the future based on functional genomics approaches.

Concerning FAs, eicopentaenoic acid (20:5) is the major molecular species, found in all membrane lipids of *P. tricornutum*. It is also a major FA in numerous microalgae, such as *Porphyridium cruentum* (Khozin et al., 1997), *N. gaditana* (Simionato et al., 2013), *Monodus subterraneus* (Khozin-Goldberg et al., 2002), and *Chromera velia* (Botté et al., 2011). This polyunsaturated very-long-chain FA is usually synthesized in the ER (Khozin et al., 1997) following complex desaturation and elongation processes (for review, see Petroustos et al., 2014). The synthesis of 20:5 in the ER has not been unambiguously demonstrated in *P. tricornutum*. Nevertheless, the two front-end desaturases involved in this pathway, the Δ 6 and Δ 5 desaturases (Phatr_2948 and Phatr_46830, respectively), do not contain any predicted signal peptide and plastid-like transit sequence that could be involved in a targeting to the chloroplast. The synthesis of 20:5, therefore, is very likely to occur outside chloroplasts in *P. tricornutum* as well. The dominant species of MGDG in *M. subterraneus* (Khozin-Goldberg et al., 2002) and *P. cruentum* (Khozin et al., 1997) are 20:5/20:5. In these organisms, it was proposed that PE and PC were, respectively, donors for the DAG moiety responsible for these eukaryotic-like MGDG species. In *P. tricornutum*, however, all MGDG species having a 20:5 FA at the *sn*-1 position have a C16 at the *sn*-2 position, displaying a prokaryotic signature. Therefore, the acyl position in *P. tricornutum* MGDG supports a different

scenario from that documented for *Arabidopsis* eukaryotic MGDG: once synthesized in cytosolic membranes, 20:5 has to be released from a phospholipid into the cytosolic acyl-CoA pool and then transported into the chloroplasts to be attached to the glycerol-3-phosphate at the *sn*-1 position by the first acyltransferase, AT5G1. We denoted this unique route, misleadingly thought to correspond to the plant eukaryotic pathway, the omega pathway (Petroustos et al., 2014). The precise details and the enzymes and transporters involved in these events remain to be characterized.

The question of the putative existence of a eukaryotic pathway with a recycling of an intact diacylglycerol backbone coming from phospholipid for galactolipid synthesis, as described in higher plants, remains unsolved. Indeed, there is no visible signature for the eukaryotic pathway to follow, the typical eukaryotic 20:5/20:5 backbone found in extraplastidic glycerolipids (i.e. PC, PE, and DGTA) and described in other algae (Khozin et al., 1997; Khozin-Goldberg et al., 2002) being absent in plastid glycolipids. Since PC harbors a high proportion of C16 at the *sn*-2 position, we cannot exclude that some MGDG species could result from the galactosylation of a diacylglycerol backbone with this signature. However, considering that C18 is almost absent from galactoglycerolipids, this pathway should operate a sorting of diacyl molecular species, excluding PC with a C18 at position *sn*-2.

Remodeling of Membrane Glycerolipids in N- and P-Limiting Conditions

Based on our reference glycerolipid profile in a replete medium, we could compare the variations of the membrane lipid distribution occurring upon N or P starvation and attempt to deduce some likely remodeling scenarios. N shortage induces visible effects over a shorter time scale (3–4 d) compared with P shortage (8–13 d, depending on the initial level of this nutrient). This feature has been observed for all the *Pt* accessions examined here. Based on our observations, N limitation seems to trigger a serious and rapid stress response, presumably related to the need for protein synthesis, whereas more sophisticated lipid-remodeling systems seem to be operative during P limitation, perhaps as an adaptive response. This difference is also reflected at the level of photosynthesis; based on the F_v/F_m ratio, photosynthesis was apparently affected more rapidly in low-N than in low-P conditions.

Considering membrane glycerolipids, N deprivation has no effect on the level of N-containing lipids such as PC, PE, and DGTA. As in *Arabidopsis*, N-containing lipids are not a form of N storage (Gaude et al., 2007), in contrast with phospholipids, which are clearly a biochemical parameter tuned by photosynthetic organisms. The only significant changes we observed were a relative decrease of the proportion of MGDG and an increase in DGDG, leading to a diminished MGDG-DGDG ratio, a lipid change that also has been observed in *Arabidopsis*

upon N shortage (Gaude et al., 2007). The physiological significance of this phenomenon is unknown, but a reduced MGDG-DGDG ratio is often observed in chloroplasts with impaired photosynthesis (Boudière et al., 2014). We could also detect a slight decrease in the proportion of PG, possibly reflecting senescence of the thylakoid membranes.

Following P deprivation, all phospholipids, including PC and PG, were completely undetectable, compensated by an increase of nonphosphorus lipids synthesized in endomembranes (indicated by a 5-fold-increase of DGTA) and in the plastid (indicated by a 2-fold increase of DGDG and a 1.5-fold increase of SQDG). The proportion of MGDG decreased by a factor of 1.5, but the overall proportion of galactoglycerolipids (MGDG and DGDG) increased. Similar observations have been made in higher plant cells (Jouhet et al., 2003), although the impact on phospholipids was not as dramatic as that recorded here. The best documented form of BL in the literature is DGTS, and, because it sometimes has an inverse concentration relationship with PC, it is thought to replace PC in extraplastidic membranes (Moore et al., 2001), as suggested for *C. reinhardtii*, which lacks PC (Riekhof et al., 2005, 2014), and further supported by the comparison of phytoplankton communities collected in P-rich and P-oligotrophic regions (Van Mooy et al., 2009). Consistent with this postulate, the increase of DGTA in the P-starved conditions reached a value that was about identical to that measured for PC in control cells, thus supporting that a PC-to-DGTA replacement occurred in extraplastidic membranes. In terms of lipid trafficking, no specific machinery would be required, since both DGTA and PC are likely synthesized in the same membrane system (i.e. the ER). It is also known that an increase of SQDG could compensate the absence of PG in plastids (Jouhet et al., 2010). Similarly, this remodeling would not require any massive lipid transport, since PG and SQDG are localized in the same membranes (i.e. thylakoids).

In plants, P deprivation induces an increase of galactolipid production, using a eukaryotic diacylglycerol moiety diverted from hydrolyzed phospholipids, and an export of DGDG from plastids to extraplastidic membranes, such as the plasma membrane, the tonoplast, and/or mitochondrial membranes (Andersson et al., 2003, 2005; Jouhet et al., 2004). First, based on our results, there is no evidence for a eukaryotic pathway in *P. tricornutum* as described in plants, but rather an omega pathway, which might participate in the recycling of the phospholipid hydrophobic moiety, possibly by free FA transfers. Second, in *P. tricornutum*, the plastid envelope contains four membranes, with the two outermost ones being derived from the ER. DGDG has never been found in the ER of higher plants, and this lipid is transferred toward mitochondria via contact sites, indicating that the ER is not involved in DGDG trafficking, at least for this interorganellar transfer (Jouhet et al., 2004). Similar physical links between the secondary plastid and the mitochondria might occur in *P. tricornutum*, since both organelles are very close (Prihoda et al., 2012). Third, the increase of

SQDG and DGTa could quantitatively compensate for the decrease of PG and PC, respectively. There is no obvious necessity for an export of DGDG toward extraplastidic membranes in the cells of *P. tricornutum* exposed to P limitation. It is possible, therefore, that an increase of DGDG, observed during both N and P limitation, might counteract the decrease of MGDG and contribute to the protection of photosynthetic membrane integrity.

In a recent report on the transcriptome changes occurring in *P. tricornutum* upon P shortage, transcripts for the ATS1 homolog (Phatr_3262), one of the MGDG synthase homologs (Phatr_54168), the two SQDG synthase isoforms (Phatr_50356 and Phatr_42467), and the putative gene involved in DGTa synthesis (Phatr_42872) were significantly up-regulated (Yang et al., 2014). Likewise, in the centric diatom *T. pseudonana*, genes coding two putative SQD1 homologs (gene identifiers 7445840 and 7452379) and two putative monogalactosyldiacyl homologs (gene identifiers 7447073 and 7445775) were found to be up-regulated in response to P limitation (Dyhrman et al., 2012). Therefore, the remodeling of lipids in diatoms seems to be transcriptionally controlled following, at least in part, the model dissected previously in plants, in which some of the genes encoding MGD, digalactosyldiacyl, and SQD2 isoforms (in *Arabidopsis*, MGD2, MGD3, DGD2, and SQD2; Misson et al., 2005) were shown to be specific to the P starvation response and activated by signaling cascades responding to low P. An in-depth study of the transcriptome of *P. tricornutum* cultivated in identical conditions to those used here will help identify all genes that are likely to be transcriptionally coordinated upstream of the observed remodeling and search for the corresponding cis-elements and transcriptional systems.

Accumulation of TAG in Conditions of N and P Starvation

All accessions of *P. tricornutum*, collected in various oceanic locations, showed an increase of TAG, albeit with some variations in the time scale and magnitude of accumulation of this class of nonpolar lipids. There was no apparent correlation between TAG accumulation and morphotype (triradiate, fusiform, or oval) or the initial geographic location. Pt10 and PtHK, which were both less sensitive to P shortage, were collected on the eastern coast of China, albeit at very distant sites, which could suggest an environmental impact on the physiology of these strains, perhaps with a higher capacity to store P. Interestingly, Pt4 was not able to accumulate large amounts of TAG in either N- or P-limiting conditions, which could suggest that it is affected in its ability to synthesize or store TAG. Pt4 was collected in the Baltic Sea, a relatively closed sea, but the long-term influence of this particular area on the physiological and metabolic behavior of these algae remains to be determined. Clearly, a genomic analysis of these strains is required to draw further conclusions.

P and N limitation affect both the lipid content and the photosynthetic capacities of Pt1 cells. Although

N deprivation has a strong and almost immediate effect on cell division, it is important to note that P deprivation requires a much longer period to induce any visible effect. Diatoms, therefore, might struggle more with a lack of N than with a lack of P, possibly because of the existence of powerful P-storage systems within the cell, such as polyphosphate, a ubiquitous P polymer (Martin et al., 2014). N and P limitation will impact both the biosynthesis of proteins and the level of phosphorylated metabolites, which, in turn, will affect numerous metabolic functions, including growth and photosynthesis. However, oil accumulation depends on the availability of a carbon source (Fan et al., 2011), and this is in apparent contradiction with an increase of TAG concomitant with a decline of photosynthesis. In this study, this source of carbon possibly arises from the remaining photosynthetic activity and/or from stored carbohydrates (Li et al., 2011). Thus, it is likely that, in the case of a growth arrest linked to a mineral deficiency, the available carbon and energy unused for cell division and membrane expansion are diverted toward lipid biosynthesis and storage. This could be part of a cellular strategy to allow a better and quicker restart when environmental conditions become favorable again. Whether the arrest of cell division is an absolute requirement to trigger TAG accumulation is thus an important open question.

During both N and P shortages, we observed a significant increase in the neosynthesis of 16:0 and 16:1, which was mainly if not uniquely associated with the accumulation of TAG, whereas we observed only little change in the FA composition of the various glycerolipids, besides a 16:1 and 20:5 enrichment in TAG. This confirms previously published reports, in a variety of photosynthetic eukaryotes, showing that the accumulation of TAG triggered by a shortage of N originated mainly from FA neosynthesis (Simionato et al., 2013). Whatever the growth conditions, the small pool of DAG is constituted of three main species comprising only 14:0, 16:0, and 16:1 acyl groups, with 14:0 being less abundant than the others and always esterified at the *sn*-1 position, when present. Interestingly, the *sn*-1 and *sn*-2 positions in TAG completely mirror the DAG pool, and the *sn*-3 position is occupied by a 16:0 or 16:1 FA in 80% to 90% of the molecular species. These two FAs are also the main ones overproduced in nutrient-limiting growth conditions. Clearly, these data do not support any substantial recycling of DAG moieties deriving from membrane glycerolipids, by contrast with higher plants (Bates and Browse, 2012). Therefore, it is likely that TAGs are mostly synthesized via a route involving a diacylglycerol acyltransferase and de novo DAG and acyl-CoA synthesis (Kennedy pathway).

During both N and P limitation, TAGs were enriched in 20:5 at the *sn*-3 or *sn*-1 position, whereas the global level of 20:5 inside the cell was not affected. Since 20:5 is produced at the level of phospholipids in nonplastid membranes, it has to be transferred to TAG, most likely via the acyl-CoA pool or via a phosphatidyl diacylglycerol acyltransferase. In the N-deprived condition, it was striking to observe that the increase of 20:5 in TAG,

on a per cell basis, roughly corresponds to the decrease of 20:5 in MGDG, suggesting that MGDG also could contribute to TAG synthesis, as described in *N. graditana* (Simionato et al., 2013) and *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011; Li et al., 2012). Based on this mechanism, the eicopentaenoic acid released in the acyl-CoA pool following the degradation of MGDG (or other membrane lipids such as phospholipids) should be recycled mainly into other glycerolipids such as TAG, rather than oxidized through the β -oxidation pathway.

CONCLUSION

The overall goal of this work was first to define a reference for the glycerolipidome of *P. tricornutum*, with MGDG, DGDG, SQDG, and PG as conserved lipids in photosynthetic membranes and PC and DGTA as major lipids in extraplastidic membranes. We also detected the presence of ASQ. Based on this reference, we could deduce that the FAs were most likely synthesized de novo in the stroma of chloroplasts as 14:0-, 16:0-, and 18:0-ACP species. We identified only one gene candidate coding for a putative palmitoyl-ACP $\Delta 9$ -desaturase (Phatr_9316). When exported to the cytosol, FAs can be elongated and desaturated to generate 20:5. Acyl-ACP can be used in the plastid for the production of MGDG, DGDG, SQDG, and part of PG via a canonical prokaryotic pathway, and acyl-CoA can be used in the cytosol and endomembranes to generate PC, DGTA, or TAG. We could identify gene candidates coding for putative enzymes involved in these pathways. Extraplastidic PG and PI seem to share a common CDP-DAG precursor with a 16:1/16:0 signature. We could not detect any specific signature for an extraplastidic eukaryotic pathway as in plants and could not assess the possibility of the import of eukaryotic precursors inside the chloroplast. Rather, the plastid lipid profiles we obtained would be consistent with an import of 20:5 FAs, hydrolyzed from extraplastidic phospholipids, to serve as precursors for plastid acyltransferases, eventually producing MGDG, DGDG, and SQDG. We called this pathway the omega pathway, and future challenges include the deciphering of the machinery importing 20:5 FA into the chloroplast.

We compared the remodeling triggered by the deprivation of two major nutrients fluctuating in the oceans, N and P. On the one hand, N oligotrophy is apparently a severe stress for *P. tricornutum*, triggering a rapid senescence of chloroplast membranes, an arrest of cell division, and an accumulation of TAG. By contrast, a complex adaptation to P deprivation is observed, with a first phase of consumption of specific P-storage forms, most likely polyphosphate, followed by a breakdown of phospholipids, behaving like a secondary form of P storage, and their replacement by nonphosphorous lipids, most likely following PG-to-SQDG and PC-to-DGTA replacements. A phospholipid-to-DGDG replacement cannot be ruled out in some of the membranes limiting the chloroplast, but this has to be confirmed.

Future work should entail the characterization of the enzyme isoforms and the machineries for lipid synthesis, lipid breakdown, and lipid trafficking involved in the lipid changes described here and the systems controlling them. A survey of transcriptome variations occurring in *P. tricornutum* or *T. pseudonana* supports a transcriptional control, which should be studied further in the future. The task is as complex as that in plants, since some pathways, like the omega pathway, are apparently specific to chromalveolates, and their components cannot be deduced from previous studies. Nevertheless, the possibility to perform large-scale omics studies and to characterize the function of gene products is among the advantages of the *P. tricornutum* model. Future work starting with the gene candidates listed here will hopefully help to unravel the adaptive system of this diatom to cope with a fluctuating environment.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Culture Conditions

Phaeodactylum tricornutum strains were obtained from the culture collections of the Pruvost-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) and the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), using axenic accessions characterized by De Martino et al. (2007): Pt1, CCAP 1055/3; Pt2, CCMP2558; Pt3, CCMP2559; Pt4, CCAP 1055/2; Pt5, CCMP630; Pt6 (fusiform), CCAP 1054/4; Pt7, CCAP 1055/6; Pt8, CCAP 1055/7; Pt9, CCAP 1055/5; Pt10, CCAP 1055/8. We completed this series of accessions with the fully sequenced reference strain for *P. tricornutum*, derived from Pt1, Pt1.8.6 (Bowler et al., 2008; CCAP1055/1), and with an axenic strain isolated in Hong Kong, PtHK. Cells were maintained and grown in enriched seawater, artificial water (ESAW) medium, as described by Falcatore et al. (2000). The different cell shapes described here are those of algae grown and maintained in artificial medium. In the preliminary comparative study of Pt1 to Pt10 ecotypes by microscopic imaging, cells were grown either in the presence of 0.55 mM N and 0.0224 mM P or in the absence of one or both of these nutrients. Cultures were grown in exponential phase in 50-mL single-use flasks with 100 rpm shaking, an irradiance of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a 12-h-light/12-h-dark photoperiod at 19°C.

For the Nile Red measurements, 50-mL cultures were grown in exponential phase before being centrifuged at 1,500g for 30 min and suspended in 10 mL of replete or deficient medium. Initial cell densities for P-deficient and N-deficient experiments were 10^4 and 10^5 cells mL^{-1} , respectively. In the in-depth analysis performed on the Pt1 strain, cells were grown in batch conditions in 250-mL flasks containing 50 mL of ESAW medium with or without N or P. Replete conditions consisted of 5.5 mM N and 0.22 mM P, in order to avoid nutrient exhaustion in the batch culture over the observation period and to increase the contrast in the analyzed lipid profiles between nutrient-rich and -depleted conditions. Cells were cultivated in an artificial climate incubator, with 100 rpm shaking, under an irradiance of 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and with a 12-h-light/12-h-dark photoperiod at 19°C. The initial inoculum was 0.5 to 1.1⁶ cells mL^{-1} . Cells were collected after 5 or 13 d and counted with a Malassez chamber using an aliquot fraction before any further manipulations.

Chlorophyll Fluorescence Measurements

The parameter F_v/F_m was used as an indicator of PSII activity in a dark-adapted state. For this, in vivo chlorophyll fluorescence was determined using a Speedzen MX fluorescence imaging setup (JBeamBio). Excitation was done in the blue range ($\lambda = 450$ nm) using short pulses (10 μs). Emission was measured in the near far red. Saturating pulses (duration of 250 ms) were provided by a green ($\lambda = 520$ nm) light-emitting diode array. Measurements were done 15 min after dark adaptation of the samples.

The variable fluorescence (F_v) was calculated as $F_v = F_m - F_o$, where F_m is the maximum fluorescence in the dark-adapted state and F_o is the minimal fluorescence in the dark-adapted state (Genty et al., 1990).

Nile Red Staining of Nonpolar Lipids

Accumulation of nonpolar lipids and oil droplets was monitored by Nile Red (Sigma-Aldrich) fluorescent staining (excitation wavelength at 532 nm and emission at 565 nm), as described previously (Cooksey et al., 1987). In brief, 200 μ L of culture was stained with 50 μ L of a Nile Red stock solution (2.5 μ g mL⁻¹ in dimethyl sulfoxide), and fluorescence was measured by flow cytometry using a Partec Cube8 device equipped with a 532-nm green laser. When the number of cells was estimated, specific fluorescence was determined by dividing Nile Red fluorescence intensity by the number of cells.

Glycerolipid Extraction, Separation by TLC, and Analyses by GC-FID and MS

Glycerolipids were extracted from freeze-dried *P. tricornutum* cells grown in 50 mL of ESAW medium with variable initial supplies of P and/or N. First, cells were harvested by centrifugation and then immediately frozen in liquid N. Once freeze dried, the pellet was suspended in 4 mL of boiling ethanol for 5 min to prevent lipid degradation, and lipids were extracted according to Simonato et al. (2013) by the addition of 2 mL of methanol and 8 mL of chloroform at room temperature. The mixture was then saturated with argon and stirred for 1 h at room temperature. After filtration through glass wool, cell debris was rinsed with 3 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v), and 5 mL of 1% (w/v) NaCl was then added to the filtrate to initiate biphasic formation. The chloroform phase was dried under argon before solubilizing the lipid extract in pure chloroform.

Total glycerolipids were quantified from their FAs: in an aliquot fraction, a known quantity of 15:0 was added and the FAs present were transformed as FAMES by a 1-h incubation in 3 mL of 2.5% (v/v) H₂SO₄ in pure methanol at 100°C (Jouhet et al., 2003). The reaction was stopped by the addition of 3 mL of water and 3 mL of hexane. The hexane phase was analyzed by a GC-FID (Perkin-Elmer) on a BPX70 (SGE) column. FAMES were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma-Aldrich) and quantified by the surface peak method using 15:0 for calibration. Extraction and quantification were performed at least three times.

To quantify the various classes of nonpolar and polar glycerolipids, lipids were separated by TLC onto glass-backed silica gel plates (Merck) using two distinct resolving systems (Simonato et al., 2013). To isolate nonpolar lipids including TAG and free FA, lipids were resolved by TLC run in one dimension with hexane:diethylether:acetic acid (70:30:1, v/v). To isolate membrane glycerolipids, lipids were resolved by two-dimensional TLC. The first solvent was chloroform:methanol:water (65:25:4, v/v) and the second was chloroform:acetone:methanol:acetic acid:water (50:20:10:10:5, v/v). Lipids were then visualized under UV light, after spraying with 2% (v/v) 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid in methanol, and scraped off the plate. No phosphatidylethanol could be detected after TLC or following MS analyses, indicating that the boiling ethanol treatment did not give rise to this category of glycerolipid derivative by non-specific chemical reactions. Lipids were recovered from the silica powder after the addition of 1.35 mL of chloroform:methanol (1:2, v/v) thorough mixing, the addition of 0.45 mL of chloroform and 0.8 mL of water, and collection of the chloroform phase (Bligh and Dyer, 1959). Lipids were then dried under argon and either quantified by methanolysis and GC-FID as described above or analyzed by MS.

For MS analyses, purified lipid classes were dissolved in 10 mM ammonium acetate in pure methanol. They were introduced by direct infusion (electrospray ionization-MS) into a trap-type mass spectrometer (LTQ-XL; Thermo Scientific) and identified by comparison with standards. In these conditions, the produced ions were mainly present as H⁻, H⁺, NH₄⁺, or Na⁺ adducts. Lipids were identified by MS2 analysis with their precursor ion or by neutral loss analyses as indicated in Table I. All experiments were performed in triplicate.

Positional Distribution of FAs Esterified to Glycerolipids

The positions of FA molecular species esterified to the glycerol backbone of the various glycerolipids were determined based on MS2 analyses. Glycerol carbons were numbered following the stereospecific number (*sn*) nomenclature. Depending on the nature of the glycerolipid and the type of adduct, the substituents at the *sn*-1 (or *sn*-3) and *sn*-2 positions are differently cleaved when subjected to low-energy collision-induced dissociation. This is reflected in MS2 analyses by the preferential loss of one of the two FAs, leading to a dissymmetrical abundance of the collision fragments. The patterns of MS2 fragments for all glycerolipids have been described in previous studies (Table II),

except for DGTA. In this study, we hypothesized that the loss of FAs in DGTA following low-energy collision-induced dissociation is similar to that observed for other polar lipids, such as PC.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Growth, photosynthetic activity, and intracellular triacylglycerol content of Pt1 cells in 1N1P and 10N10P conditions.

Supplemental Figure S2. Growth, photosynthetic activity, and intracellular triacylglycerol content of Pt1 cells in 10N10P, 0N10P, and 10N0P conditions.

Supplemental Figure S3. General structure of glycerolipids.

Supplemental Figure S4. Structural analysis of ASQ.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yahui Gao (Xiamen University), who kindly provided the PthK strain isolated in Hong Kong Harbor in October 2010, and Catherine Cantrel (Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure), Mathilde Cussac, Valérie Gros, and Guillaume Tourcier (Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale) for helpful technical support.

Received October 23, 2014; accepted December 5, 2014; published December 8, 2014.

LITERATURE CITED

- Allen AE, Laroche J, Maheswari U, Lommer M, Schauer N, Lopez PJ, Finazzi G, Fernie AR, Bowler C (2008) Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 10438–10443
- Alonso DL, Belarbi EH, Fernández-Sevilla JM, Rodríguez-Ruiz J, Molina Grima E (2000) Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* **54**: 461–471
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellström H, Liljenberg C, Sandelius AS (2005) Phosphate-limited oat: the plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* **280**: 27578–27586
- Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett* **537**: 128–132
- Araki S, Sakurai T, Kawaguchi A, Murata N (1987) Positional distribution of fatty acids in glycerolipids of the marine red alga, *Porphyra yezoensis*. *Plant Cell Physiol* **28**: 761–766
- Arao T, Kawaguchi A, Yamada M (1987) Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* **26**: 2573–2576
- Armada I, Hachero-Cruzado I, Mazuelos N, Ríos JL, Machado M, Cañavate JP (2013) Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vikianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* **95**: 224–233
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, et al (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**: 79–86
- Babiychuk E, Müller F, Eubel H, Braun HP, Frentzen M, Kushnir S (2003) Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J* **33**: 899–909
- Bates PD, Browse J (2012) The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Front Plant Sci* **3**: 147
- Benning C, Ohta H (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* **280**: 2397–2400
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917

- Botté CY, Yamaryo-Botté Y, Janouskovec J, Rupasinghe T, Keeling PJ, Crellin P, Coppel RL, Maréchal E, McConville MJ, McFadden GI** (2011) Identification of plant-like galactolipids in *Chromera velia*, a photosynthetic relative of malaria parasites. *J Biol Chem* **286**: 29893–29903
- Boudière L, Botté CY, Saidani N, Lajoie M, Marion J, Bréhélin L, Yamaryo-Botté Y, Satiat-Jeunemaître B, Breton C, Girard-Egrot A, et al** (2012) Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells. *Mol Biosyst* **8**: 2023–2035
- Boudière L, Michaud M, Petroustos D, Rébeillé F, Falconet D, Bastien O, Roy S, Finazzi G, Rolland N, Jouhet J, et al** (2014) Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1837**: 470–480
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otiillar RP, et al** (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**: 239–244
- Brighouse A, Dacks JB, Field MC** (2010) Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell Mol Life Sci* **67**: 3449–3465
- Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR** (1986) Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **235**: 25–31
- Brügger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD** (1997) Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2339–2344
- Camera E, Ludovici M, Galante M, Sinagra JL, Picardo M** (2010) Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *J Lipid Res* **51**: 3377–3388
- Chauton MS, Winge P, Brembu T, Vadstein O, Bones AM** (2013) Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles. *Plant Physiol* **161**: 1034–1048
- Cooksey KE, Guckert B, Williams SA, Callis PR** (1987) Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J Microbiol Methods* **6**: 333–345
- 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
- De Martino A, Meichenin A, Shi J, Pan K, Bowler C** (2007) Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *J Phycol* **43**: 992–1009
- Dembitsky VM** (1996) Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Prog Lipid Res* **35**: 1–51
- Dodson VJ, Mouget JL, Dahmen JL, Leblond JD** (2014) The long and short of it: temperature-dependent modifications of fatty acid chain length and unsaturation in the galactolipid profiles of the diatoms *Haslea ostrearia* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Hydrobiologia* **727**: 95–107
- Domergue F, Spiekermann P, Lerchl J, Beckmann C, Kilian O, Kroth PG, Boland W, Zähringer U, Heinz E** (2003) New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism: cloning and functional characterization of plastidial and microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturases. *Plant Physiol* **131**: 1648–1660
- Domingues P, Amado FML, Santana-Marques MGO, Ferrer-Correia AJ** (1998) Constant neutral loss scanning for the characterization of glycerol phosphatidylcholine phospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom* **9**: 1189–1195
- Dorrell RG, Smith AG** (2011) Do red and green make brown? Perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. *Eukaryot Cell* **10**: 856–868
- Dubots E, Audry M, Yamaryo Y, Bastien O, Ohta H, Breton C, Maréchal E, Block MA** (2010) Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **285**: 6003–6011
- Dubots E, Botté C, Boudière L, Yamaryo-Botté Y, Jouhet J, Maréchal E, Block MA** (2012) Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie* **94**: 86–93
- Dyrhrman ST, Jenkins BD, Rynearson TA, Saito MA, Mercier ML, Alexander H, Whitney LP, Drzewianowski A, Bulygin VV, Bertrand EM, et al** (2012) The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS ONE* **7**: e33768
- Falciatore A, d'Alcalá MR, Croot P, Bowler C** (2000) Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science* **288**: 2363–2366
- Fan J, Andre C, Xu C** (2011) A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **585**: 1985–1991
- Frentzen M, Heinz E, McKeon TA, Stumpf PK** (1983) Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* **129**: 629–636
- Gage DA, Huang ZH, Benning C** (1992) Comparison of sulfoquinovosyl diacylglycerol from spinach and the purple bacterium *Rhodobacter spaeroides* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Lipids* **27**: 632–636
- Gaude N, Bréhélin C, Tischendorf G, Kessler F, Dörmann P** (2007) Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant J* **49**: 729–739
- Genty B, Harbinson J, Briantais JM, Baker NR** (1990) The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves. *Photosynth Res* **25**: 249–257
- Giroud C, Gerber A, Eichenberger W** (1988) Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*: analysis of molecular species and intracellular site(s) of biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **29**: 587–595
- Guella G, Frassanito R, Mancini I** (2003) A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**: 1982–1994
- Guschina IA, Harwood JL** (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* **45**: 160–186
- Hagio M, Sakurai I, Sato S, Kato T, Tabata S, Wada H** (2002) Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **43**: 1456–1464
- Hecky RE, Kilham P** (1988) Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments. *Limnol Oceanogr* **33**: 786–822
- Hsu FF, Turk J** (2000a) Characterization of phosphatidylethanolamine as a lithiated adduct by triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *J Mass Spectrom* **35**: 595–606
- Hsu FF, Turk J** (2000b) Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: a mechanistic study. *J Am Soc Mass Spectrom* **11**: 986–999
- Hsu FF, Turk J** (2001) Studies on phosphatidylglycerol with triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization: fragmentation processes and structural characterization. *J Am Soc Mass Spectrom* **12**: 1036–1043
- Hsu FF, Turk J** (2003) Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: the fragmentation processes. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 352–363
- Hsu FF, Turk J** (2010) Electrospray ionization multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry for structural elucidation of triacylglycerols: assignment of fatty acyl groups on the glycerol backbone and location of double bonds. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**: 657–669
- Jouhet J, Dubots E, Maréchal E, Block MA** (2010) Lipid trafficking in plant photosynthetic cells. In **H Wada, N Murata**, eds, *Lipids in Photosynthesis*, Vol 30. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 349–372
- Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA** (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* **167**: 863–874
- Jouhet J, Maréchal E, Bligny R, Joyard J, Block MA** (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett* **544**: 63–68
- Jouhet J, Maréchal E, Block MA** (2007) Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res* **46**: 37–55
- Khozin I, Adlerstein D, Bigongo C, Heimer YM, Cohen Z** (1997) Elucidation of the biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*: II. Studies with radiolabeled precursors. *Plant Physiol* **114**: 223–230
- Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Shayakhmetova I, Cohen Z** (2002) Biosynthesis of eicopentaenoic acid (EPA) in the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyceae). *J Phycol* **38**: 745–756
- Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Parker MS, Stanley MS, Kaplan A, Caron L, Weber T, et al** (2008) A model for

- carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS ONE* **3**: e1426
- Künzler K, Eichenberger W, Radunz A** (1997) Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy. *Z Naturforsch C* **52**: 487–495
- Levitán O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG** (2014) Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol* **32**: 117–124
- Li X, Moellering ER, Liu B, Johnny C, Fedewa M, Sears BB, Kuo MH, Benning C** (2012) A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**: 4670–4686
- Li Y, Han D, Sommerfeld M, Hu Q** (2011) Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresour Technol* **102**: 123–129
- Liang Y, Maeda Y, Yoshino T, Matsumoto M, Tanaka T** (2014) Profiling of polar lipids in marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris* JPC DA0580: prediction of the potential mechanism for eicosapentaenoic acid-incorporation into triacylglycerol. *Mar Drugs* **12**: 3218–3230
- Li-Beisson Y, Shorosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, et al** (2010) Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book* **8**: e0133, doi/10.1199/tab.0161
- Litchman E, Klausmeier CA, Yoshiyama K** (2009) Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 2665–2670
- Löfke C, Ischebeck T, König S, Freitag S, Heilmann I** (2008) Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **413**: 115–124
- Maheswari U, Mock T, Armbrust EV, Bowler C** (2009) Update of the Diatom EST Database: a new tool for digital transcriptomics. *Nucleic Acids Res* **37**: D1001–D1005
- Maheswari U, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM, Bowler C** (2005) The Diatom EST Database. *Nucleic Acids Res* **33**: D344–D347
- Maréchal E, Block MA, Joyard J, Douce R** (1994) Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *J Biol Chem* **269**: 5788–5798
- Martin P, Dyhrman ST, Lomas MW, Poulton NJ, Van Mooy BAS** (2014) Accumulation and enhanced cycling of polyphosphate by Sargasso Sea plankton in response to low phosphorus. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 8089–8094
- Mills MM, Ridame C, Davey M, La Roche J, Geider RJ** (2004) Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* **429**: 292–294
- Misson J, Raghohama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, et al** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 11934–11939
- Mongrand S, Bessoule JJ, Cabantous F, Cassagne C** (1998) The C16:3/C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* **49**: 1049–1064
- Montsant A, Maheswari U, Bowler C, Lopez PJ** (2005) Diatomics: toward diatom functional genomics. *J Nanosci Nanotechnol* **5**: 5–14
- Moore C, Mills M, Arrigo K, Berman-Frank I, Bopp L, Boyd P, Galbraith E, Geider R, Guieu C, Jaccard S, et al** (2013) Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nat Geosci* **6**: 701–710
- Moore TS, Du Z, Chen Z** (2001) Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: in vitro biosynthesis of diacylglyceryltrimethylhomoserine. *Plant Physiol* **125**: 423–429
- Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Bläsing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, et al** (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ* **30**: 85–112
- Moreau RA, Doehlert DC, Welti R, Isaac G, Roth M, Tamura P, Nuñez A** (2008) The identification of mono-, di-, tri-, and tetragalactosyl-diacylglycerols and their natural estolides in oat kernels. *Lipids* **43**: 533–548
- Müller F, Frenz M** (2001) Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **509**: 298–302
- Nakamura Y** (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res* **52**: 43–50
- Naumann I, Klein BC, Bartel SJ, Darso KH, Buchholz R, Lange HA** (2011) Identification of sulfoquinovosyldiacylglycerides from *Phaeodactylum tricornutum* by matrix-assisted laser desorption/ionization QTrap time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**: 2517–2523
- Nunn BL, Aker JR, Shaffer SA, Tsai S, Strzepek RF, Boyd PW, Freeman TL, Brittnacher M, Malmström L, Goodlett DR** (2009) Deciphering diatom biochemical pathways via whole-cell proteomics. *Aquat Microb Ecol* **55**: 241–253
- Petroutsos D, Amiar S, Abida H, Dolch LJ, Bastien O, Rébeillé F, Jouhet J, Falconet D, Block MA, McFadden GI, et al** (2014) Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways: from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Prog Lipid Res* **54**: 68–85
- Prihoda J, Tanaka A, de Paula WBM, Allen JF, Tirichine L, Bowler C** (2012) Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. *J Exp Bot* **63**: 1543–1557
- Rezanka T, Lukavský J, Nedbalová L, Sigler K** (2011) Effect of nitrogen and phosphorus starvation on the polyunsaturated triacylglycerol composition, including positional isomer distribution, in the alga *Trachydiscus minutus*. *Phytochemistry* **72**: 2342–2351
- Riekhof WR, Naik S, Bertrand H, Benning C, Voelker DR** (2014) Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine. *Eukaryot Cell* **13**: 749–757
- Riekhof WR, Ruckle ME, Lydic TA, Sears BB, Benning C** (2003) The sulfolipids 2'-O-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in *SQD1*. *Plant Physiol* **133**: 864–874
- Riekhof WR, Sears BB, Benning C** (2005) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryot Cell* **4**: 242–252
- Sandelius AS, Andersson MX, Goksoy M, Tjellström H, Wellander R** (2007) Membrane contact sites: physical attachment between chloroplasts and endoplasmic reticulum revealed by optical manipulation. *Chem Phys Lipids* **149**: S42–S43
- Sapriel G, Quinet M, Heijde M, Jourden L, Tanty V, Luo G, Le Crom S, Lopez PJ** (2009) Genome-wide transcriptome analyses of silicon metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* reveal the multilevel regulation of silicic acid transporters. *PLoS ONE* **4**: e7458
- Sato N, Murata N** (1991) Transition of lipid phase in aqueous dispersions of diacylglyceryltrimethylhomoserine. *Biochim Biophys Acta* **1082**: 108–111
- Scala S, Bowler C** (2001) Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1666–1673
- Shimajima M, Ohta H** (2011) Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog Lipid Res* **50**: 258–266
- Shrestha RP, Tesson B, Norden-Krichmar T, Federowicz S, Hildebrand M, Allen AE** (2012) Whole transcriptome analysis of the silicon response of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *BMC Genomics* **13**: 499
- Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Maréchal E, Finazzi G, Morosinotto T** (2013) The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* **12**: 665–676
- Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H, Yamazaki T, Ishida M, Imagawa M, Shimizu T** (2005) Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* **823**: 26–36
- Tanoue R, Kobayashi M, Katayama K, Nagata N, Wada H** (2014) Phosphatidylglycerol biosynthesis is required for the development of embryos and normal membrane structures of chloroplasts and mitochondria in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **588**: 1680–1685
- Tjellström H, Andersson MX, Larsson KE, Sandelius AS** (2008) Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ* **31**: 1388–1398
- Van Mooy BAS, Fredricks HF, Pedler BE, Dyhrman ST, Karl DM, Koblizek M, Lomas MW, Mincer TJ, Moore LR, Moutin T, et al** (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* **458**: 69–72
- Vogel G, Eichenberger W** (1992) Betaine lipids in lower plants: biosynthesis of DGTS and DGTA in *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) and the possible role of DGTS in lipid metabolism. *Plant Cell Physiol* **33**: 427–436

- Welti R, Wang X, Williams TD** (2003) Electrospray ionization tandem mass spectrometry scan modes for plant chloroplast lipids. *Anal Biochem* **314**: 149–152
- Xu C, Härtel H, Wada H, Hagio M, Yu B, Eakin C, Benning C** (2002) The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity. *Plant Physiol* **129**: 594–604
- Yang ZK, Zheng JW, Niu YF, Yang WD, Liu JS, Li HY** (2014) Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress. *Environ Microbiol* **16**: 1793–1807
- Yongmanitchai W, Ward OP** (1993) Positional distribution of fatty acids, and molecular species of polar lipids, in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Gen Microbiol* **139**: 465–472
- Zendejas FJ, Benke PI, Lane PD, Simmons BA, Lane TW** (2012) Characterization of the acylglycerols and resulting biodiesel derived from vegetable oil and microalgae (*Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Biotechnol Bioeng* **109**: 1146–1154
- Zhou Y, Peisker H, Weth A, Baumgartner W, Dörmann P, Frentzen M** (2013) Extraplasmidial cytidinediphosphate diacylglycerol synthase activity is required for vegetative development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **75**: 867–879
- Zianni R, Bianco G, Lelario F, Losito I, Palmisano F, Cataldi TR** (2013) Fatty acid neutral losses observed in tandem mass spectrometry with collision-induced dissociation allows regiochemical assignment of sulfoquinovosyl-diacylglycerols. *J Mass Spectrom* **48**: 205–215

D. Stratégie de génétique chimique chez *P. tricornutum*

1. Inhibiteurs du métabolisme des stérols

Le criblage de petites molécules pour induire la production de TAG chez les microalgues est une stratégie connue (Franz *et al*, 2013). Par exemple, le fongicide fenpropimorphrapidly favorise une rapide accumulation de TAG (après 1h de traitement) chez *Chlamydomonas reinhardtii*, accumulation qui est deux fois supérieure à celle obtenue après neuf jours de traitements (Kim *et al* 2015). Dans un criblage précédent établi au sein de l'équipe par Melissa Conte, plusieurs classes de petites molécules se sont avérées avoir des effets sur la production de lipide de stockage chez les microalgues. Trois familles de molécules agissant dans la voie de biosynthèse des stérols (Figure 32) se sont révélées particulièrement intéressantes : les analogues structuraux des stérols (estrone et éthinylestradiol), les statines (mévastatine et simvastatine) et les inhibiteurs de la HMG-CoA reductase (buténafine et terbinafine). La molécule de chaque groupe ayant le plus d'effet sur *P. tricornutum* après 48h d'incubation est présentée Figure 63.

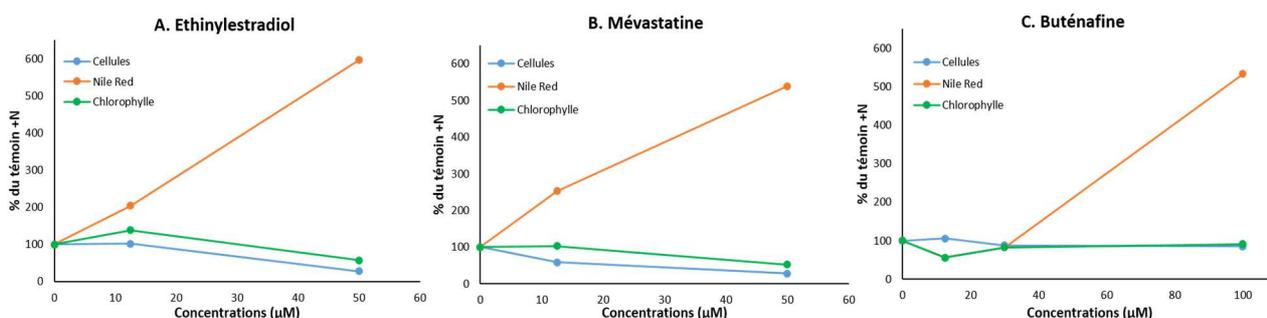


Figure 63 : Impact de A) l'éthinylestradiol, B) la mévastatine et C) la buténafine sur le nombre de cellules, le taux de TAG (Nile Red) et la chlorophylle de *P. tricornutum*, après 48h de traitement. Pour chaque composés, différentes concentrations ont été testées 12,5 μM – 30 μM et 100 μM pour la buténafine uniquement. La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et la teneur en chlorophylle et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentage en fonction du témoin (placé dans un milieu 10X).

Tous les traitements sont comparés en fonction de la condition témoin (cellules cultivées dans du milieu 10X et en l'absence d'inhibiteur). Ce témoin sert également de contrôle négatif quant à la production de TAG. Les cellules carencées en azote servent de contrôle positif. L'éthinylestradiol et la mévastatine agissent sur les cellules dès 12,5 μM : la quantité de TAG augmente comparé aux cellules témoins et à 50 μM , elle est 5 fois plus grande que dans le contrôle (Figure 63. A et B). Cette accumulation est même supérieure à celle mesurée lors d'une carence en azote, d'environ un facteur 1.6. Pour la buténafine, il faut atteindre une concentration de 100 μM pour voir une accumulation de TAG 5 fois supérieure au témoin (Figure 63. C).

La biosynthèse des stérols est effectuée à partir du précurseur commun à la synthèse des acides gras, les acyl-CoA. L'hypothèse est que lors de ces traitements, les acyl-CoA non utilisés pour la synthèse des stérols sont orientés vers la production de lipide de stockage (**Figure 32**). Tous les traitements montrent une même augmentation de TAG (environ 5 fois plus que le témoin). Cela suggère que quelle que soit la cible des inhibiteurs de la voie de synthèse des stérols, l'augmentation est plafonnée, correspondant peut-être au pool d'acyl-CoA susceptible d'être redirigé vers la synthèse des TAG. Quand les concentrations des inhibiteurs sont augmentées (au-delà de 100 μM), les TAG n'augmentent pas d'avantage, comme montré dans la **Figure 64**. Chez *Nannochloropsis oceanica*, l'inhibition de la voie des stérols par la terbinafine, conduit à une forte accumulation d'acide gras, sans augmentation des TAG (*Lu et al 2014*). La coloration au Nile Red est un bon indicateur de production de TAG mais il est nécessaire de vérifier l'impact de ces composés sur le métabolisme des lipides de *P. tricornutum* par des extractions lipidiques. Des cultures en plus grand volume (par exemple de 50mL) doivent donc être réalisées afin de permettre l'extraction des lipides et de comparer les quantités de TAG, lipides membranaires, acyl-CoA, acides gras et stérols présents.

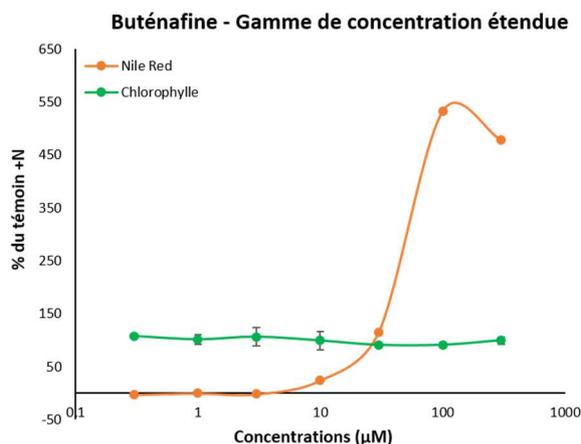


Figure 64 : Impact d'une gamme de concentrations de 0.2 à 300 μM de buténafine sur la teneur en chlorophylle et la quantité de TAG (Nile Red) de *P. tricornutum*. La teneur en chlorophylle et l'accumulation de TAG sont exprimées en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules. mL^{-1} . Le graphe est exprimé en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l'ESAW 10X.

De manière intéressante, les trois traitements sont faiblement cytotoxiques pour les cellules, puisque la concentration cellulaire et la teneur en chlorophylle évoluent chez les cellules traitées comme chez les cellules témoins. Ces résultats suggèrent que ces composés sont de bons candidats pour augmenter la quantité de TAG chez les microalgues dans une optique de production à grand échelle de biocarburants. Pour cette raison, un brevet international établi en 2015 regroupe ces trois familles d'inhibiteurs: "Inhibitors of sterol metabolism for their use to accumulate triglycerides in microalgae, and method thereof", M. Conte, L-J. Dolch, C. Mei, C. Barette, D. Petroutsos, D. Falconet, J. Jouhet, F. Rebeille, J-C. Cintrat, E. Maréchal, WO 2015/111029 A1.

2. Méthotrexate et analogues

a. Criblage des molécules sur *P. tricornutum*

Les inhibiteurs ciblant la dihydrofolate réductase et la thymidylate synthase affectent le métabolisme des glycérolipides chez *A. thaliana* (voir article p 138). Les microalgues étant des modèles prometteurs pour la production des biocarburants de 3^{ème} génération, nous avons cherché à savoir si ces molécules induiraient également une production de TAG chez *P. tricornutum*. Les cellules ont été incubées 48h en présence de différentes gammes de concentrations d'inhibiteurs et uniquement les résultats les plus intéressants sont présentés. Sur le modèle *P. tricornutum*, les molécules triméthoprimine et 5-fluorouracile sont les plus efficaces pour favoriser la production de TAG (**Figure 65**). Les cellules cultivées en présence de triméthoprimine présentent une accumulation de lipides de réserve significative dès 30 μM et le 5-fluorouracile agit à très faibles concentrations, dès 0.1-0.3 μM . Cependant, ces traitements ne sont pas sans conséquence pour la viabilité cellulaire de *P. tricornutum*. En présence de 30 μM de triméthoprimine, la molécule induit un comportement cytotatique des cellules et à des concentrations supérieures à 30 μM une cytotoxicité (également visible dans la mesure de la chlorophylle). De manière intéressante, le 5-fluorouracile n'induit pas de cytotoxicité car la concentration en cellules reste la même durant les 72h d'incubation. Un effet cytotatique est cependant observé entre 0.03 et 1 μM mais cela n'est pas corrélé avec une diminution de la chlorophylle, qui, au contraire, semble plus élevée que dans les cellules témoins.

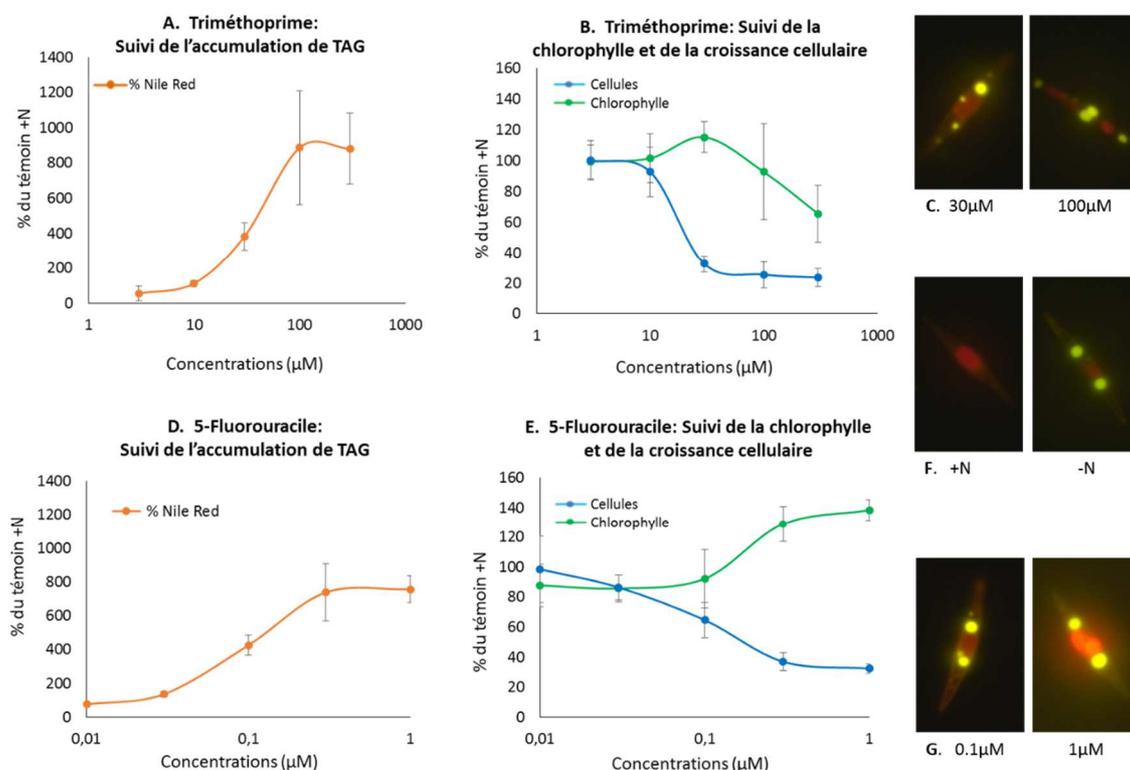


Figure 65 : Impact des molécules triméthoprimine et 5-fluorouracile sur des cultures de *P. tricornutum*, après 48h de traitement. Effet du triméthoprimine sur : A) et C) l'accumulation

de TAG, B) la chlorophylle et la croissance cellulaire. Effet du 5-fluorouracile sur : D) et G) l'accumulation de TAG, E) la chlorophylle et la croissance cellulaire. F) Contrôles négatif de la production de TAG (milieu complet avec azote : +N) et positif (milieu carencé en azote : -N). La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et la teneur en chlorophylle et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Les graphes sont exprimés en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l'ESAW 10X. L'autofluorescence des composés utilisés a été mesurée en présence de milieu de culture ESAW et de Nile Red afin de vérifier qu'ils n'interagissaient pas avec la mesure.

Les molécules méthotrexate et pyriméthamine qui induisaient la meilleure production de TAG chez le modèle *A. thaliana*, ce sont révélées moins efficaces chez *P. tricornutum* (**Figure 66**). Le méthotrexate ne présente aucun des effets attendus : pas d'accumulation de TAG et une cytotoxicité très légère (perte d'environ 20% des cellules). La pyriméthamine provoque une augmentation de TAG chez *P. tricornutum* dès 10 μ M accompagnée d'un effet cytostatique. Le composé est clairement cytotoxique (perte de chlorophylle et mort cellulaire) à partir de 100 μ M.

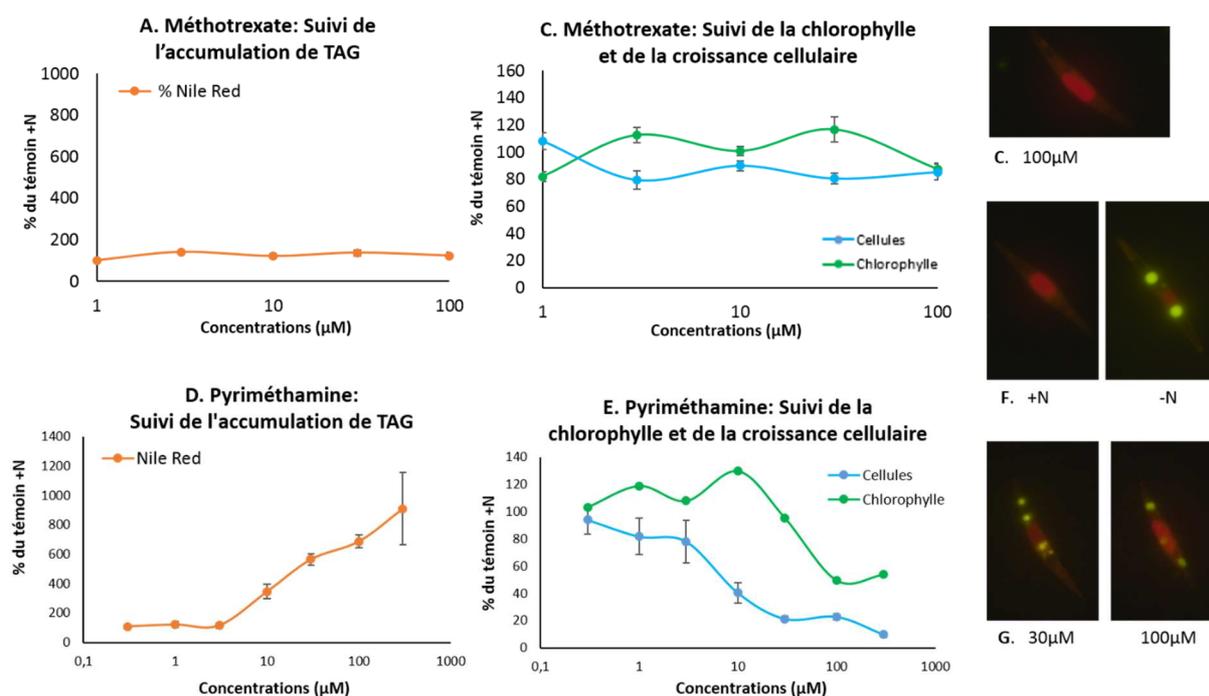


Figure 66 : Impact des molécules méthotrexate et pyriméthamine sur des cultures de *P. tricornutum*, après 48h d'incubation. Effet du méthotrexate sur : A) et C) l'accumulation de TAG, B) la chlorophylle et la croissance cellulaire. Effet de la pyriméthamine sur : D) et G) l'accumulation de TAG, E) la chlorophylle et la croissance cellulaire. F) Contrôles négatif de production de TAG (milieu complet avec azote : +N) et positif (milieu carencé en azote : -N). La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et la teneur en chlorophylle et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à

1.10^6 cellules.mL⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l'ESAW 10X. L'autofluorescence des composés utilisés a été mesurée en présence de milieu de culture ESAW et de Nile Red afin de vérifier qu'ils n'interagissent pas avec la mesure.

Comparé au modèle de plante supérieure *A. thaliana*, la diatomée *P. tricornutum* répond de manière différente à la famille des inhibiteurs de la DHFR et de la TS. L'explication de ce phénomène peut d'abord trouver son origine dans le design de l'expérience d'incubation. Les cellules sont placées en présence de 0.5% de DMSO pour faciliter la pénétration des composés mais peut-être n'est-ce pas suffisant. L'absence d'effet du MTX sur *P. tricornutum* au niveau du métabolisme lipidique mais aussi de la croissance cellulaire pourrait s'expliquer par le fait que le composé est difficilement internalisé. Des gammes de concentrations ont été testées mais peut-être que la concentration correcte n'a pas été trouvée pour les molécules. Des expériences avec des concentrations plus élevées sont peut être nécessaires pour noter un changement de phénotype chez la diatomée. Enfin, les mesures ont été réalisées après un temps d'incubation de 48h, ce qui permet de bloquer au moins deux cycles de divisions cellulaires mais ce temps est peut-être à ajuster afin d'obtenir un meilleur effet des inhibiteurs.

La différence de réponse entre les plantes et les diatomées pourrait aussi provenir de différences présentes sur l'enzyme cible. Chez *A. thaliana*, le MTX et la pyriméthamine ont l'impact le plus important sur la production de lipide de réserve, alors que c'est plutôt le triméthoprim et le 5-fluorouracile qui induisent le plus de TAG chez *P. tricornutum*. Il semble donc que la DHFR-TS de cette diatomée soit plus sensible au triméthoprim et au 5-FU que celle des plantes supérieures (*Albani et al 1985*). Chez ces deux organismes, l'enzyme DHFR-TS est une enzyme bi-fonctionnelle. Il existe deux classes de DHFR : une DHFR monofonctionnelle et une DHFR bifonctionnelle couplée à une TS. D'un point de vue évolutif, il semblerait que ce soit au moment où des cellules unicellulaires eucaryotes se soient séparées en deux taxons, un taxon contenant les cellules avec un seul flagelle (unikontes) et un autre contenant les cellules avec deux flagelles (bikontes), que la fusion DHFR-TS a eu lieu (*Cavalier-Smith 2003*). Bien qu'*A. thaliana* et *P. tricornutum* soient tous les deux des organismes bikontes, l'origine évolutive de leur enzyme DHFR-est différente. En effet, les plantes appartiennent au règne des *Archaeplastida* et sont issues d'une algue verte résultant d'une endosymbiose primaire entre une cyanobactérie et un eucaryote ancestral, tandis que les diatomées appartiennent au règne des *Chromalveolata* et sont issues d'une endosymbiose secondaire entre une algue rouge et un deuxième eucaryote ancestral. Il est alors possible que des différences existent entre les deux protéines homologues, différences qui se traduisent par des sensibilités diverses aux inhibiteurs que nous avons testés. De ce point de vue, au sein même des plantes, les DHFR-TS de différentes familles peuvent être plus ou moins sensibles aux mêmes molécules (*Barg et al 1984, Nano et al 1989, Irdani et al 1998*)

b. Conditions de culture mixotrophiques et exposition au MTX de *P. tricornutum*

L'accumulation de TAG obtenue avec la culture cellulaire d'*A. thaliana* exposée au MTX dépend aussi de la présence d'une source de carbone dans le milieu de culture (saccharose). Ces cellules ne sont pas totalement photoautotrophes, elles ont besoin d'une source de sucre pour croître. Nous nous sommes donc demandé si l'absence d'une source de carbone dans le milieu de culture ne pouvait pas être une condition limitante à l'accumulation de TAG chez *P. tricornutum* durant un traitement au MTX. La diatomée a donc été cultivée en condition mixotrophe, en présence soit de glycérol (précurseur des glycérolipides) soit en présence d'acétate (notamment précurseur des acides gras) et l'effet du MTX a été mesuré après 48 et 72h d'incubation (Liu et al 2008, Paranjape et al 2016). Après 48h d'incubation en présence de 10 μM de MTX, aucun effet lié à la présence de glycérol n'a pu être visualisé (Figure 67). Après 72h, une légère augmentation du signal Nile Red dans la condition contenant 100 mM de glycérol (40% de plus vis-à-vis d'un témoin sans MTX et sans glycérol), est détecté mais le résultat est non significatif. La présence de glycérol semble améliorer légèrement la survie cellulaire pour des temps courts car contrairement à la Figure 66 précédente, le MTX n'induit pas une baisse de 20% du nombre de cellules à 48h. Par contre, l'effet protecteur du glycérol sur la croissance cellulaire est perdu à 72h.

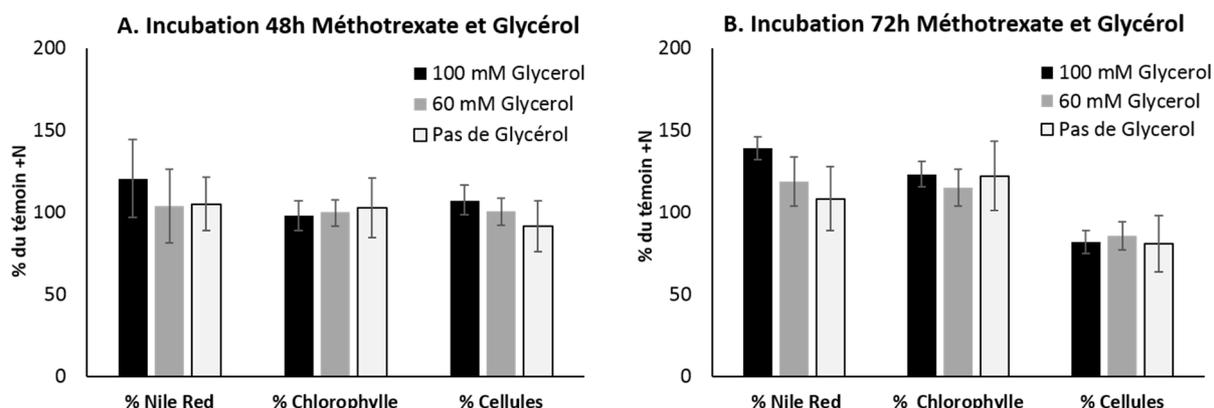


Figure 67 : Effet du glycérol sur des cultures de *P. tricornutum* exposées à 10 μM de MTX. Les mesures de production de TAG, de la teneur en chlorophylle et de la croissance cellulaire ont été effectuées à A) 48h et B) 72h. La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et la teneur en chlorophylle et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l'ESAW 10X.

L'ajout d'acétate dans des cultures traitées avec trois concentrations de MTX (1, 10 et 100 μM), semble favoriser la production de TAG mais les résultats sont là encore non significatifs (Figure 68). Après 48h, pour les concentrations de MTX 1 et 10 μM , la quantité de lipide de stockage augmente presque proportionnellement à la quantité d'acétate ajoutée. Pour 100 μM de MTX, la quantité de TAG en absence d'acétate est déjà deux fois

plus importante que le contrôle sans MTX et sans acétate. Cela montre que le composé a pu pénétrer dans les cellules et avoir un effet sur le métabolisme des glycérolipides, contrairement à ce qui a été observé **Figure 66**, mettant en évidence les variations qu’il peut exister d’une expérience à une autre. Dans cette condition, l’ajout de 15 et 30 mM d’acétate augmente très légèrement la production de TAG. De manière inexplicable, l’ajout de 60 mM d’acétate semble plutôt inhiber la production. Après 72h, toutes les conditions sont équivalentes à la production de TAG mesurée dans le témoin sans MTX et sans acétate. Contrairement au glycérol dont l’effet n’était visible qu’après 72h, il semble que l’acétate soit plus rapidement internalisé et métabolisé car ses effets sont visibles dès 48h.

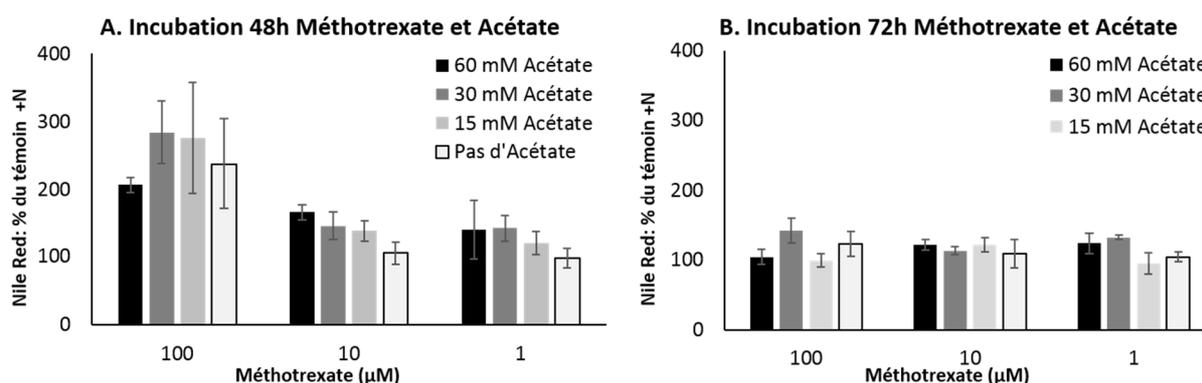


Figure 68 : Effet de l’acétate sur la production de TAG des cultures de *P. tricornutum* exposées à 1, 10 et 100 µM de MTX. Les mesures de production de TAG (Nile Red) ont été effectuées à A) 48h et B) 72h. L’accumulation de TAG est exprimée en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l’ESAW 10X.

Nous n’avons pas observé d’effet de l’acétate sur la teneur en chlorophylle (résultats non montrés). Les mesures de croissance cellulaire **Figure 69**, révèle que le MTX à forte dose (100 µM) agit dès 48h. Dans cette condition, la concentration en cellules diminue d’un facteur 2, ce qui suggère que, contrairement au glycérol, l’acétate n’a pas d’effet protecteur. Cet effet perdure dans le temps et à 72h, les cellules traitées avec 1 et 10 µM de MTX présentent également une diminution du nombre de cellules d’environ 20% (**Figure 69**).

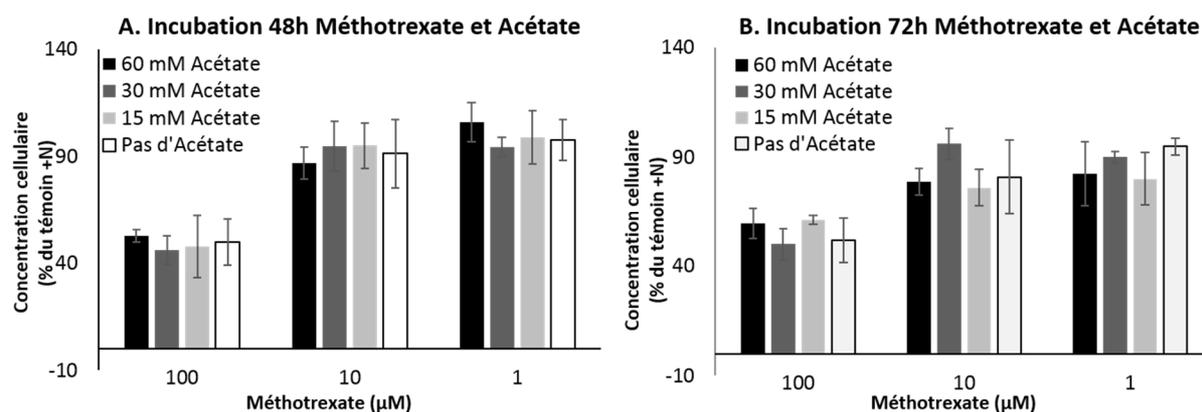


Figure 69 : Effet de l'acétate sur la croissance cellulaire des cultures de *P. tricornutum* exposées à 1, 10 et 100 µM de MTX. La croissance cellulaire est donnée en pourcentage en fonction des cellules témoins (milieu 10X, pas de traitement MTX ou acétate) à A) 48h et B) 72h. La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre. Les résultats sont exprimés en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l'ESAW 10X.

Dans le modèle *A. thaliana*, la présence d'une source de carbone durant une exposition au MTX permet aux cellules de puiser dans le milieu pour néosynthétiser des TAG. La diatomée *P. tricornutum* est connue comme capable de croissance en milieu mixotrophe et capable d'une meilleure production de TAG en présence d'une source de carbone (Paranjapea et al 2016). Cependant dans nos conditions expérimentales, la présence de glycérol ou d'acétate ne semble pas améliorer significativement la production de TAG lors d'un traitement au MTX. Il serait intéressant de répéter ces expériences en présence des inhibiteurs 5-fluorouracile ou triméthoprime car ces molécules seules induisent déjà de bons rendements de production de TAG.

c. Scale-up du composé 5-fluorouracile chez *P. tricornutum*

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus au cours des tests de criblage, nous avons décidé de tester l'effet du 5-fluorouracile sur des volumes de culture de *P. tricornutum* plus important (50 mL). En effet, le 5-FU est en effet une molécule intéressante car elle induit une forte production de TAG à faibles concentrations (< 1 µM) et que cet effet est associé à un taux de mortalité cellulaire limité. La recherche de production de lipides de réserve s'inscrit dans un contexte d'application industrielle. Il est donc intéressant de tester l'effet de cet effecteur chimique sur de plus grands volumes que celui des criblages (plaques 48 puits), pour effectuer une preuve de concept à plus grande échelle. De plus, en augmentant le volume de la culture, la quantité de cellule devient suffisante pour pouvoir extraire les glycérolipides et ainsi analyser de façon plus précise l'impact du traitement sur ce métabolisme.

Basées sur les résultats obtenus lors du criblage initial, deux concentrations ont été sélectionnées pour le scale-up : 0.07 et 0.3 µM. Comme le montre la **Figure 70. A**, la croissance cellulaire de *P. tricornutum* n'est pas inhibée par ces deux concentrations, elle est

même légèrement supérieure au témoin non traité (100%). En parallèle, aucune accumulation de TAG significative n'a été observée (**Figure 70. B et C**). Dans les conditions présentées, le 5-FU ne semble donc pas avoir d'effet marquant sur la croissance et la production de TAG chez *P. tricornutum*, ne confirmant pas le phénotype observé lors du criblage en petit volume.

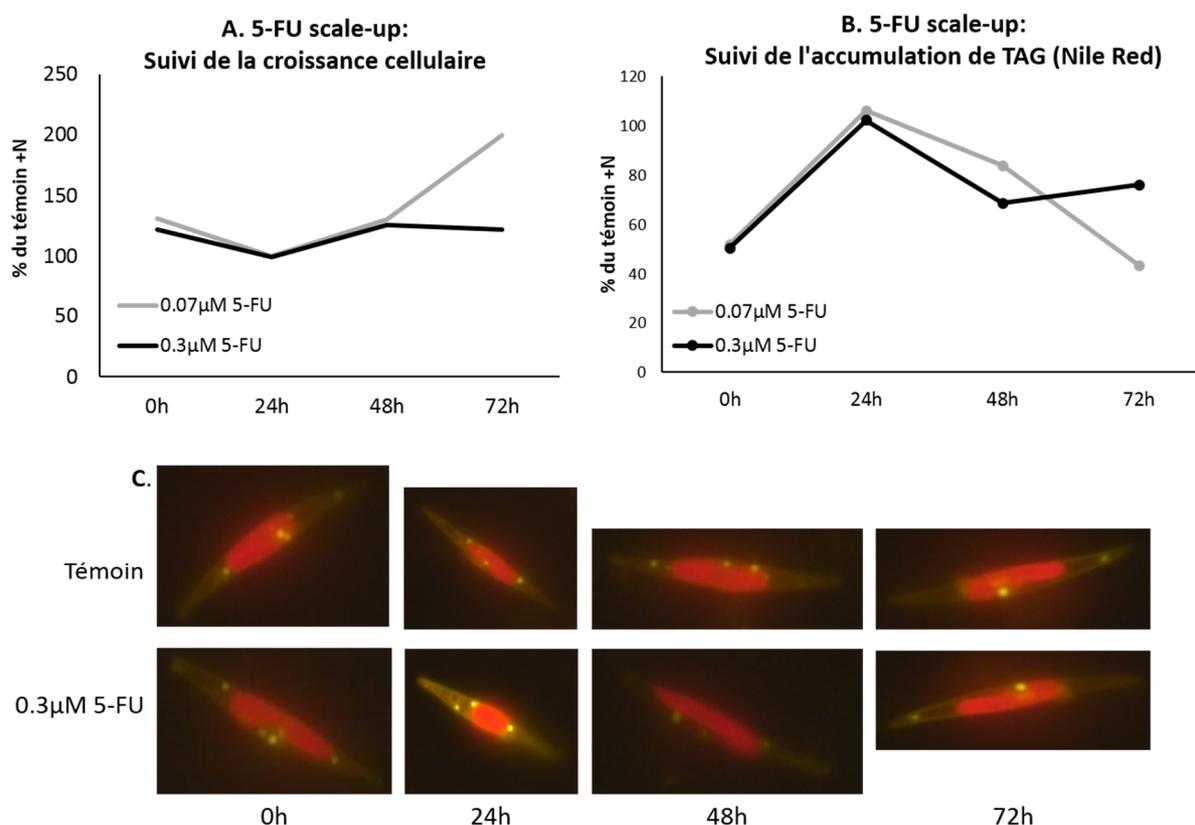


Figure 70 : Scale-up d'une culture de *P. tricornutum* de 50 mL en présence de 0.07 et 0.3 µM de 5-FU. Suivi pendant 72h des paramètres suivants : A) Suivi de la croissance cellulaire. B) et C) Suivi de l'accumulation de TAG (au travers de la coloration au Nile Red). La croissance cellulaire est exprimée en millions de cellules par millilitre et l'accumulation de TAG en unités de fluorescence relatives rapportée à 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentages vis-à-vis de la culture témoin, cultivée dans de l'ESAW 10X et DMSO 0.32%.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, cette expérience de scale-up est un premier essai, réalisé avec un seul réplica biologique par concentration. Pour confirmer ou infirmer ces données, au moins deux autres réplicas devraient être évalués. D'autre part, les cellules ont été repiquées à 1.10^6 cellules.mL⁻¹ et le 5-FU a été ajouté cinq jours après, alors que dans l'expérience de criblage, le repiquage et l'ajout des traitements étaient simultanés. Cela peut faire une différence car au moment du repiquage (transfert dans un nouveau milieu) les cellules ne sont pas dans le même état physiologique que 5 jours plus tard. D'autre part, dans l'expérience de scale-up, la concentration des cellules

était 5 fois plus grande que dans l'expérience de criblage au moment de l'ajout du 5-FU, ce qui fait que le rapport inhibiteur/cellules n'était pas le même dans les deux protocoles. D'une manière générale, il faut garder à l'esprit que les changements d'échelle de volume sont souvent difficiles pour des cultures biologiques car il faut généralement adapter et optimiser le processus à ce nouveau volume (*Huerlimann et al 2010, Gonçalves et al 2014, Isleten-Hosoglu et al 2015, Kasiri et al 2015*). Le scale-up d'une culture pour une condition donnée reste aujourd'hui encore un challenge majeur pour l'industrie.

3. Discussion

Comme pour le modèle de plante *A. thaliana*, il existe une variabilité de réponse de la part de la microalgue *P. tricornutum*, qui est dépendante de la molécule testée.

Ainsi, d'une manière générale, les inhibiteurs de la voie de synthèse des stérols ont un impact intéressant sur la production de TAG par la diatomée. La simvastatine, qui permet d'induire une forte accumulation de lipides de stockage chez *A. thaliana*, impacte également *P. tricornutum* (résultats non montrés), ce qui prouve que des mécanismes sont conservés entre les deux organismes pour la voie de synthèse du mévalonate.

Les résultats obtenus avec les inhibiteurs du métabolisme C1 sont surprenants, car le MTX qui avait le plus fort impact sur *A. thaliana*, n'a ici aucun effet sur *P. tricornutum*. De même, les molécules triméthoprime, pyriméthamine et 5-fluorouracile, qui induisent une faible production de lipides de réserve chez la plante modèle, sont plus efficaces sur la diatomée. En termes d'évolution, les enzymes DHFR des plantes et des diatomées doivent présenter des différences structurales, ce qui pourrait expliquer les données obtenues. L'apport de nutriments dans le milieu, tel que le glycérol ou l'acétate, communément utilisés comme sources de carbone dans des cultures de microalgues (*Najafabadi et al 2015*), n'a que peu influé la production de TAG. Cela montre que dans nos conditions expérimentales, le développement de *P. tricornutum* n'est pas favorisé par un milieu mixotrophe. Le test de scale-up pour l'inhibiteur 5-fluorouracile n'a provoqué aucune production de TAG, alors que la molécule impacte fortement les cultures dans de petits volumes. Le changement d'échelle des cultures des microalgues est un paramètre critique, une mise au point plus approfondie est sûrement indispensable pour le nouveau volume de culture.

Enfin, les inhibiteurs du métabolisme des folates ont également été testés sur la microalgue *Nannochloropsis gaditana*, une *Eustigmatophyceae*. Tous les résultats se sont avérés négatifs, montrant que la réponse à un inhibiteur dépend également de l'organisme utilisé.

Conclusion

Conclusion

L'étude des voies de biosynthèse des lipides de réserve chez les végétaux est actuellement portée par la recherche sur les biocarburants. La production d'huile par les plantes a longuement été étudiée chez la graine, organe de stockage des TAG par excellence, ce qui a permis de mettre en évidence des cibles cellulaires essentielles aux mécanismes d'accumulation des lipides de réserve. Dans le contexte actuel, la quantité d'huile produite par les graines est insuffisante pour une application industrielle des biocarburants qui n'impacte pas sur l'alimentation humaine. Différentes stratégies sont étudiées afin d'améliorer les rendements. La première est l'ingénierie génétique de modèles végétaux. Les gènes identifiés chez la graine pour être impliqués dans la synthèse de TAG sont surexprimés dans les tissus verts des végétaux, ce qui permet d'accroître les rendements en augmentant la surface de la plante qui produit de l'huile. Cette stratégie est notamment étudiée par *Vanhercke et al 2013 et 2014* qui surexpriment WRI1, DGAT1 et OLEOSIN1 dans des plants de tabac et parviennent à 15% de TAG produit par les feuilles (poids sec). Un autre axe de recherche se porte sur la caractérisation de souches de microalgue, organismes capables d'accumuler naturellement de grandes quantités de lipides de stockage. La production de TAG chez les microalgues est souvent déclenchée par un stress comme une carence en nutriment, ce qui impacte aussi la vitesse de croissance des algues. Dans ces conditions, il existe une forte dualité entre production de biomasse et production d'huile. Or, pour obtenir le meilleur rendement possible, ces deux paramètres doivent être élevés. Afin de s'affranchir des conditions de carence pour la production de TAG chez les microalgues, de l'ingénierie génétique est également développée pour ces modèles, en se basant sur l'homologie de gènes identifiés chez les plantes et les algues. C'est le cas des travaux de *Niu et al 2013* qui ont surexprimé DGAT2 dans *P. tricornutum* ou de *Zulu et al* (communication lors de l'ISPL 2016, Göttingen) qui ont favorisé la production de TAG en surexprimant DGAT1 et OLEO3 dans le même modèle. Malgré d'intéressantes avancées, la production d'huile végétale pour les biocarburants dits de 3^{ème} génération n'en est qu'à ses débuts. Les microalgues sont un modèle prometteur, appuyé par de plus en plus d'études cherchant à identifier et caractériser les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des TAG. Cependant, les annotations des génomes pour les microalgues sont souvent incomplètes et les techniques de transformations actuelles manquent encore d'efficacité, ce qui freine l'avancée des connaissances sur ces organismes. De ce fait, l'étude des voies métaboliques des lipides de stockage chez les plantes supérieures est primordiale. D'une part, car les données acquises peuvent être ensuite extrapolées aux microalgues, facilitant l'étude de ces dernières. D'autre part, car les études sur la synthèse des TAG dans les tissus végétatifs sont indispensables pour définir les meilleures stratégies de bio-ingénierie à mettre en œuvre dans une optique de biocarburants produits par les plantes.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier les mécanismes de formation des TAG par une approche de génétique chimique avec le modèle cellulaire de la plante supérieure *A. thaliana* et de comparer les résultats avec le modèle de diatomée *P. tricornutum*. Dans la littérature, les cultures cellulaires de bactéries ou de microalgues sont connues pour accumuler des réserves, notamment sous forme de TAG durant la phase stationnaire, phase où la croissance

Conclusion

est nulle. Lors d'une carence en nutriments chez les microalgues et les plantes, la croissance cellulaire est ralentie ou stoppée et les lipides de réserves s'accumulent. C'est notamment le cas chez la microalgue *C. reinhardtii*, qui durant une carence en azote entre dans une phase de quiescence où sa croissance est réduite de moitié, où les lipides de réserve s'accumulent (Tsai et al 2014). Une relation entre arrêt de la croissance cellulaire et stockage de TAG semble donc exister. Partant de ces observations, nous avons voulu vérifier si un arrêt de la croissance lié à l'utilisation d'inhibiteurs engendrerait aussi une accumulation de TAG. Au vu de nos résultats impliquant différentes molécules et différents modèles cellulaires, il semble que l'accumulation de TAG soit proportionnelle à l'inhibition de la croissance. Ce résultat est cependant à nuancer en fonction des molécules utilisées et des modèles cellulaires, ce qui montre que les mécanismes qui mènent à l'accumulation de TAG sont également cible-dépendants et ne relèvent pas seulement de phénomènes pléiotropiques.

La génétique chimique permet de cibler des voies métaboliques, sans a priori et ce de manière très rapide car contrairement à la génétique classique aucune construction de lignées mutantes n'est requise. La diversité des molécules existantes représente une palette d'outil permettant de perturber et d'étudier les mécanismes cellulaires. Différentes conditions peuvent être testées (temps d'incubation, concentrations,...) et ce, sur des modèles différents comme les plantes entières et les cultures cellulaires végétales ou de microalgues. Néanmoins, en pratique, l'utilisation d'une telle stratégie s'est révélée également complexe. Les conditions expérimentales sur le modèle *A. thaliana* ont été standardisées pour permettre de comparer les résultats obtenus mais la diversité des traitements rend tout de même difficile l'interprétation. Ainsi, suivant le produit utilisé, la solubilité est optimisée mais le taux de pénétration dans les cellules peut varier, ce qui influe sur l'efficacité de la molécule. L'affinité de la molécule pour sa cible est également un facteur important à prendre en compte : des molécules comme l'oryzaline et le taxol ciblant toutes deux les microtubules, n'ont pas les mêmes effets sur les cellules d'*Arabidopsis*. De la même manière, la famille de molécules ciblant la DHFR n'agit pas aux mêmes concentrations. Il est donc possible de passer à côté d'une cible cellulaire intéressante si l'inhibiteur de départ a été mal choisi ou si les conditions de cultures sont mal optimisées. Enfin, dans nos expériences, nous nous sommes placés à trois jours d'incubation quel que soit le traitement, ce qui nous a permis d'alléger les conditions expérimentales (une seule extraction et analyse de lipide par échantillon) mais également de comparer les différents traitements à un temps donné. Or, il est aussi important de prendre en compte le facteur « temps d'action » des molécules car certaines peuvent agir plus vite que d'autres ou avoir des effets secondaires toxiques si l'incubation est prolongée. Le développement de nouvelles techniques telles que la visualisation des TAG par coloration au Nile Red couplée à la lecture de la fluorescence en microplaque des cellules d'*Arabidopsis* et l'analyse des lipides par LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry), sont des méthodes qui vont alléger les conditions expérimentales et devraient permettre de mieux cerner le moment optimal de l'analyse en fonction du phénotype.

Conclusion

Le choix du modèle végétal avec lequel travailler est également important. Les cultures cellulaires d'*Arabidopsis* en milieu liquide sont un modèle facile à utiliser, représentatif du fonctionnement d'une cellule photosynthétique de plante. De plus, la composition du milieu de culture est aisément maîtrisable, ce qui permet de contrôler précisément les concentrations des molécules inhibitrices. Toutefois, l'évolution et la dérive des cultures cellulaires au fur et à mesure des repiquages sont aussi un paramètre important à prendre en compte. Comme nous l'avons publié, les cultures cellulaires de plantes peuvent avoir des temps de croissance différents d'une culture à l'autre, ce qui influe notamment sur les taux de saturation des acides gras et sur la quantité totale de lipide. Ainsi, les taux d'insaturations augmentent lorsque la vitesse de croissance est ralentie. Notre hypothèse est qu'en condition de croissance exponentielle, l'activité des désaturases est limitante vis-à-vis de l'expansion membranaire, ce qui n'est plus le cas lorsque la phase stationnaire de croissance est atteinte. Ainsi, le taux d'insaturation pourrait être un marqueur du vieillissement cellulaire. Chez les animaux, les acides gras polyinsaturés sont des cibles de choix pour les mécanismes d'oxydation, ce qui montre que le taux de PUFAs dans une cellule peut aussi influencer le vieillissement cellulaire (*Pamplona 2008, Calhoon et al 2015*). Il est aussi intéressant de noter que contrairement aux glycérolipides membranaires, le taux d'insaturations des TAG (18:2+18:3) reste élevé (environ 50% des acides gras) quel que soit le stade de culture. Il pourrait donc exister une priorité dans le transfert des acides gras polyinsaturés vers les TAG. Nos expériences s'étalant sur plusieurs années, il a parfois été difficile de les comparer à cause de cette dérive cellulaire, ce qui souligne l'importance et la nécessité de contrôles internes pour chaque expérience. Nous avons aussi observé que les modèles cellulaires d'*A. thaliana* et de *P. tricornutum* présentent une accumulation de TAG consécutive au repiquage cellulaire, ce qui peut influencer l'effet des molécules testées. Ainsi, il est possible que la quantité modérée de TAG observée dans les cellules traitées, provienne en partie d'un blocage des mécanismes de consommation des TAG et pas seulement d'une néosynthèse des lipides de réserve. En utilisant des traceurs radioactifs ou fluorescents, le suivi du turn-over des lipides à différents temps au cours des traitements pourrait permettre de quantifier et de différencier les TAG accumulés suite au repiquage, des TAG néosynthétisés en réponse au traitement chimique.

La diatomée *P. tricornutum* est connue pour accumuler des TAG durant des conditions de stress. De manière intéressante, ses réponses aux traitements diffèrent de celles obtenues avec les cellules d'*A. thaliana*. Ces résultats contradictoires peuvent provenir de différents paramètres, les trois plus importants étant la pénétration des composés dans les cellules, le volume des cultures et la spécificité pour la cible cellulaire. La pénétration dans les cellules est peut-être moins aisée dans des modèles unicellulaires possédant une paroi protectrice que dans une culture artificielle de cellules de plantes. Le volume des cultures influe particulièrement sur la réponse des microalgues aux traitements. Ainsi le 5-fluorouracile a montré un effet intéressant sur *P. tricornutum* au cours du criblage en petit volume, alors qu'un scale-up de la culture à 50 mL n'a pas permis de reproduire cet effet. Enfin, la différence des cibles cellulaires entre les modèles a de l'importance. Le génome des microalgues est

Conclusion

toujours en cours de caractérisation : certaines enzymes présentes chez les plantes terrestres ne le sont pas chez les microalgues ou présentent des différences importantes qui peuvent influencer sur leurs propriétés catalytiques. Néanmoins, des similitudes entre microalgues et plantes supérieures ont pu être observées au cours de cette étude, comme par exemple l'impact d'une carence en nutriment. En effet, pour les modèles *A. thaliana* et *P. tricornutum*, la vitesse d'accumulation des TAG suit la même logique avec une réponse rapide en quelques jours suite à une carence en azote et une réponse plus lente pour la carence en phosphate. Des effets similaires sont également mesurés lors d'un traitement à la simvastatine qui induit une forte production de TAG pour les deux modèles, montrant que des étapes de la voie de biosynthèse des stérols sont conservées entre microalgues et plantes supérieures. Ce type de résultat est encourageant pour une éventuelle application industrielle car la molécule peut être utilisée chez les deux modèles.

Malgré les limitations dues à l'utilisation d'une stratégie de génétique chimique, cette approche nous a permis de mettre en évidence des mécanismes cellulaires du métabolisme lipidique répondant à un traitement au méthotrexate chez *Arabidopsis*. Cet inhibiteur induit un arrêt de la croissance cellulaire couplé à une accumulation de TAG, jusqu'à 15 fois plus importante que la condition témoin. Il abaisse également le taux d'insaturation des acides gras dans tous les glycérolipides sauf les TAG, suggérant là encore une priorité dans le transfert des acides gras polyinsaturés vers les lipides de réserve. Cet effet est directement corrélé à l'inhibition de l'expression des gènes codant pour les désaturases. Nos analyses montrent également que l'homéostasie de la PC est fortement régulée et est indépendante dans une certaine mesure, de la concentration en phosphocholine présente dans les cellules. En effet, bien que le méthotrexate inhibe la synthèse de groupements méthyles dans les cellules, empêchant la formation *de novo* de la phosphocholine, précurseur de la tête polaire de la PC, cette dernière semble peu affectée par le traitement. Le recyclage de la phosphocholine associé à l'inhibition de l'expansion membranaire sont sûrement les mécanismes qui permettent de maintenir le niveau de PC.

En parallèle, une carence en azote a été réalisée sur les cultures cellulaires d'*A. thaliana*, condition utilisée comme « contrôle positif » car connue pour ralentir la croissance cellulaire et permettre l'accumulation de TAG chez les plantes et les microalgues. Comme le traitement MTX, la carence en azote semble affecter le taux de désaturation, les acides gras 18:3 se retrouvant préférentiellement au niveau des TAG. Egalement, dans les deux conditions, les gènes codant pour les phospholipases C : NPC4 et NPC5 sont fortement stimulés. Les NPC libérant la tête polaire de la PC, ces résultats semblent être en contradiction avec une homéostasie stable de la PC, au moins dans la condition MTX. Il faut cependant garder à l'esprit que la PC joue un rôle important dans les processus d'édition des acides gras et que de nombreuses études montrent qu'elle est un précurseur privilégié de la synthèse des TAG. Vu sous cet angle, nos résultats montrent un turn-over de la PC accéléré vis-à-vis des conditions témoins. Les acides gras sont désaturés et adressés au TAG, soit au niveau d'un pool spécifique d'acyl-CoA déjà édités, soit au niveau du squelette DAG de la PC, squelette

Conclusion

libéré par l'action des NPC. L'immunodétection d'une quantité de NPC4 accrue durant ces traitements renforce l'idée que les NPC jouent un rôle important dans ces réponses.

Les deux traitements : MTX et carence d'azote révèlent des similitudes dans la réponse apportée par la cellule, alors que les modes d'action et les stress occasionnés sont très différents. Etant donné que les NPC sont décrites dans la littérature comme impliquées lors de stress (carence de phosphate, stress osmotique,...) et que ces deux traitements sont des conditions stressantes pour les cellules, on peut se demander si les phénotypes commun observés ne sont pas des réponses métaboliques liées aux stress. Toutefois, une différence majeure observée dans la réponse cellulaire à ces deux situations se trouve au niveau de la quantité des glycérolipides. En condition MTX, le taux de glycérolipides membranaires et notamment des phospholipides PA, PC, PE et PI, a tendance à augmenter, tandis qu'en carence d'azote, tous les glycérolipides membranaires diminuent (la distribution des lipides étant globalement maintenue) et semblent approvisionner en carbone la synthèse des lipides de réserves. Il est possible que la diminution du nombre de protéines résultant de la déficience en azote ne permette plus de maintenir le réseau membranaire initial, les acides gras étant alors stockés sous forme de TAG, en attendant une situation plus favorable. Ce type de réponse a déjà été observé chez des cultures cellulaires de tabac qui consomment leurs phospholipides lors d'une carence en saccharose (*Inoue et Moriyasu 2006*).

L'ensemble de ces résultats sont en accord avec la littérature, puisqu'ils suggèrent que la synthèse des TAG chez *A. thaliana* est essentiellement réalisée à partir d'acides gras maturés par les mécanismes d'édition présents sur la PC. Au contraire, les mécanismes de formation des TAG chez les microalgues semblent différents de ceux des plantes supérieures. Au cours des carences en azote et phosphate réalisées chez *P. tricornutum* nous avons observé que la néosynthèse d'acides gras 16:0 et 16:1 augmente considérablement et que ces espèces se retrouvent presque exclusivement au niveau des TAG, sans être incorporés au niveau des glycérolipides membranaires. Cela suggère que ces organismes privilégient la voie directe de synthèse (voie Kennedy) plutôt qu'un recyclage des DAG provenant des lipides membranaires.

Le traitement au méthotrexate et la carence en azote sont des conditions qui doivent bouleverser de nombreux paramètres métaboliques dans les cellules d'*Arabidopsis*. Pour cette raison, il est difficile de se prononcer sur la spécificité de réponse des cellules. Néanmoins, ces traitements nous ont permis de mettre en lumière la très fine régulation de l'homéostasie de la PC et d'identifier pour la première fois l'implication des NPC dans la production des lipides de réserves. En perspective, il nous paraît important de confirmer le rôle des NPC dans la gestion du stock de PC et de la synthèse des TAG. Pour cela, des lignées d'*A. thaliana*, simple et double mutant pour *NPC4* et *NPC5* ainsi que des surexprimeurs sont en cours de caractérisation. Une fois obtenue, ces lignées de plantes seront utilisées pour produire des lignées cellulaires mutées. Les phénotypes des cellules témoins mais également ceux des cellules placées en condition MTX et en carence d'azote seront analysés. L'étude du turn-over de la PC sera également complétée par des expériences de pulse-chase avec de l'acétate marqué au C¹⁴ qui permet de suivre le devenir des acides gras et du [¹⁴C] glycérol-3-

Conclusion

phosphate permettant de suivre le squelette glycérol des lipides. Ce type d'expérience permettra de voir quel lipide est synthétisé en premier et de voir si la radioactivité de la PC est consommée, par exemple au profit des TAG. Cette technique nécessite l'analyse des lipides d'une même condition sur plusieurs temps (cinétiques), ce qui permettra aussi de compléter nos études précédentes, uniquement réalisées après trois jours de traitement. De plus, cette approche sans a priori viendra compléter les expériences d'incubation réalisées avec de la PC marquée avec un fluorochrome, en s'affranchissant des problèmes de reconnaissance du substrat par les enzymes. Afin de quantifier l'impact des NPC dans ces processus de turn-over, les mêmes expériences de pulse-chase pourront être réalisées dans les cultures cellulaires mutantes.

Bibliographie

A

Abida H, Dolch LJ, Meř C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rébeillé F, Petroutsos D, Jouhet J, Maréchal E "Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*." Plant Physiology 2015

Bioréacteurs alimentés avec des eaux usées en Espagne : <http://www.actualités-news-environnement>

Adeyo O, Horn PJ, Lee S, Binns DD, Chandrahas A, Chapman KD, Goodman JM "The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets." J Cell Biol, 2011

Alarcón GS "Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A Clinician's perspective." Immunopharmacology, 2000

Alatorre-Cobos F, Cruz-Ramírez A, Hayden CA, Pérez-Torres CA, Chauvin AL, Ibarra-Laclette E, Alva-Cortés E, Jorgensen RA, Herrera-Estrella L "Translational regulation of *Arabidopsis* XIPTL1 is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame 30." J Exp Bot, 2012

Albani D, Parisi B, Carbonera D, Cella R "Dihydrofolate reductase from *Daucus carota* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic characterization." Plant Mol Biol, 1985

Algaebase, Base de données en ligne sur les microalgues: <http://www.algaebase.org>

Allison AC "Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward." Immunopharmacology. 2000

Alonso-Apperte E, Varela-Moreiras G "Brain folates and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate." Int J Vitam Nutr Res, 1996

Armstrong RD, Lewis M, Stern SG, Cadman EC "Acute effect of 5-fluorouracil on cytoplasmic and nuclear dihydrofolate reductase messenger RNA metabolism." J Biol Chem, 1986

Anderson GH, Hanson MR "The *Arabidopsis* Mei2 homologue AML1 binds AtRaptor1B, the plant homologue of a major regulator of eukaryotic cell growth." BMC Plant Biol, 2005

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AS "Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol." FEBS Lett, 2003

Andrews J, Mudd JB "Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts: pathway and localization."

Angeles-Nunez JG, Tiessen A "Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of *Arabidopsis* seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds." J. Plant Physiol, 2011

Aparicio T, Ducreux M, Chaussade S "5-fluorouracil: metabolism and current indications in digestive cancer treatment." Gastroentérologie clinique et biologique, 2002

Aronel V, Lemieux B, Hwang I, Gibson S, Goodman HM, Somerville CR "Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*." *Science*, 1992

Aronson JK "The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions." *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*, Pages 1061–1066, 2016

Assaraf YG "Molecular basis of antifolate resistance." *Cancer Metastasis Rev*, 2007

Aubert Y, Vile D, Pervent M, Aldon D, Ranty B, Simonneau T, Vavasseur A, Galaud JP "RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol*, 2010

Aveek S, Animesh KD, Siraj D "Study on Folate Binding Domain of Dihydrofolate Reductase in Different Plant species and Human beings." *Bioinformation*, 2014

Awai K, Maréchal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J "Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*." *PNAS*, 2001

Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B "A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures." *Plant Physiol Biochem*, 1992

B

Babiychuk E, Müller F, Eubel H, Braun HP, Frentzen M, Kushnir S "*Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function." *Plant J*, 2003

Babiychuk E, Bouvier-Navé P, Compagnon V, Suzuki M, Muranaka T, Van Montagu M, Kushnir S, Schaller H "Allelic mutant series reveal distinct functions for *Arabidopsis* cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis." *PNAS*, 2008

Bachmann B, Follmann H "Deoxyribonucleotide biosynthesis in green algae: characterization of thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in *Scenedesmus obliquus*." *Arch Biochem Biophys*, 1987

Banaś W, Sanchez Garcia A, Banaś A, Stymne S "Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds." *Planta*, 2013

Bansal S, Durrett TP "*Camelina sativa*: an ideal platform for the metabolic engineering and field production of industrial lipids." *Biochimie*, 2016

Barg R, Peleg N, Perl M, Beckmann JS "Isolation of methotrexate-resistant cell lines in *Petunia hybrida* upon stepwise selection procedure." *Plant Mol Biol*, 1984

Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O "Growing *Arabidopsis* in vitro: Cells suspensions, *In vitro* cultures, and Regeneration." *Arabidopsis protocols, Methods in Molecular Biology*, 2014

Bibliographie

- Bates PD, Ohlrogge JB, Pollard M** "Glycerolipids in Pea Leaves Occurs via Acyl Editing." *The Journal of Biological Chemistry*, 2007
- Bates PD, Durrett TP, Ohlrogge JB, Pollard M** "Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos." *Plant Physiology*, 2009
- Bates PD, Browse J** "The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering." *Front Plant Sci*, 2012
- Bates PD, Fatihi A, Snapp AR, Carlsson AS, Browse J, Lu C** "Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols." *Plant Physiology*, 2012
- Baud S, Dichow NR, Kelemen Z, d'Andrea S, To A, Berger N, Canonge M, Kronenberger J, Viterbo D, Dubreucq B, Lepiniec L, Chardot T, Miquel M** "Regulation of HSD1 in seeds of *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol*, 2009
- Baud S, Lepiniec L** "Physiological and developmental regulation of seed oil production." *Progress in Lipid Research*, 2010
- Beaudoin F, Napier JA** "The targeting and accumulation of ectopically expressed oleosin in non-seed tissues of *Arabidopsis thaliana*." *Planta*, 2000
- BeGora MD, Macleod MJ, McCarry BE, Summers PS, Weretilnyk EA** "Identification of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Arabidopsis* and its role in choline and phospholipid metabolism." *The Journal of Biological Chemistry* 2010
- Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J** "SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond." *Curr Opin Cell Biol*, 2007
- Bennett MK, Lopez JM, Sanchez HB, Osborne TF** "Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways." *J Biol Chem*, 1995
- Benning C, Xu C, Awai K** "Non-vesicular and vesicular lipid trafficking involving plastids." *Curr Opin Plant Biol*, 2006
- Berges JA, Franklin DJ, Harrison PJ** "Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the past two decades." *J. Phycol*, 2001
- Besagni C, Kessler F** "A mechanism implicating plastoglobules in thylakoid disassembly during senescence and nitrogen starvation." *Planta*, 2013
- Blanc G, Duncan G, Agarkova I, Borodovsky M, Gurnon J, Kuo A, Lindquist E, Lucas S, Pangilan J, Polle J, Salamov A, Terry A, Yamada T, Dunigan DD, Grigoriev IV, Claverie JM, VanEtt en JL** "The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sec." *Plant Cell*, 2010
- Blée E** "Impact of phyto-oxylipins in plant defense." *Trends in Plant Sci*, 2002
- Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R** "Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization." *J Biol Chem*, 1983
- Bolognese CP, McGraw P** "The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase.", *Plant Physiology*, 2000

Borecka M, Białk-Bielińska A, Haliński ŁP, Pazdro K, Stepnowski P, Stolte S "The influence of salinity on the toxicity of selected sulfonamides and trimethoprim towards the green algae *Chlorella vulgaris*." Journal of Hazardous Material, 2016

Botella C, Sautron E, Boudiere L, Michaud M, Dubots E, Yamaro-Botté Y, Albrieux C, Marechal E, Block MA, Jouhet J "ALA10, a Phospholipid Flippase, Controls FAD2/FAD3 Desaturation of Phosphatidylcholine in the ER and Affects Chloroplast Lipid Composition in *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiology, 2016

Botté CY, Deligny M, Rocchia A, Bonneau AL, Saïdani N, Hardré H, Aci S, Yamaro-Botté Y, Jouhet J, Dubots E, Loizeau K, Bastien O, Bréhélin L, Joyard J, Cintrat JC, Falconet D, Block MA, Rousseau B, Lopez R, Maréchal E "Chemical inhibitors of monogalactosyldiacylglycerol synthases in *Arabidopsis thaliana*." Nat Chem Biol, 2011

Boudière L, Botté CY, Saidani N, Lajoie M, Marion J, Bréhélin L, Yamaro-Botté Y, Satiat-Jeunemaître B, Breton C, Girard-Egrot A, Bastien O, Jouhet J, Falconet D, Block MA, Maréchal E "Galvestine-1, a novel chemical probe for the study of the glycerolipid homeostasis system in plant cells." Mol Biosyst, 2012

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Ollar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kröger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jézéquel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siat M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR, Vardi A, von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van de Peer Y, Grigoriev IV "The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes." Nature, 2008

Boyle NR, Page MD, Liu B, Blaby IK, Casero D, Kropat J, Cokus SJ, Hong-Hermesdorf A, Shaw J, Karpowicz SJ, Gallaher SD, Johnson S, Benning C, Pellegrini M, Grossman A, Merchant SS "Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*." J Biol Chem, 2012

Bozbas K "Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union." Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2008

Bradford MM "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem, 1976

Browse J, Warwick N, Somerville CR, Slack CR "Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*." Biochem Journal, 1986

Browse J, Kunst L, Anderson S, Hugly S, Somerville C "A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase." Plant Physiology, 1989

Browse J, McConn M, James D Jr, Miquel M "Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of alpha-linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase." J Biol Chem, 1993

Burger KN "Greasing membrane fusion and fission machineries." Traffic, 2000

Bushby SR, Hitchings GH "Trimethoprim, a sulphonamide potentiator." Br J Pharmacol Chemother, 1968

C

Cagliari A, Margis R, dos Santos Maraschin F, Turchetoo-Zolet AC, Loss G, Margis-Pinheiro M "Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and algae." International journal of plant biology, 2011

Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P "Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*." Plant Journal, 2013

Calhoon EA, Ro J, Williams JB "Perspectives on the membrane fatty acid unsaturation/pacemaker hypotheses of metabolism and aging." Chemistry and Physics of Lipids, 2015

Thèse de Djeneb Camara. "Etude de la voie de biosynthèse du folate : caractérisation biochimique et recherche d'inhibiteurs de la formation de l'acide para-aminobenzoïque." Sciences agricoles, Université de Grenoble, 2011

Camara D, Bisanz C, Barette C, Van Daele J, Human E, Barnard B, Van der Straeten D, Stove CP, Lambert WE, Douce R, Maréchal E, Birkholtz LM, Cesbron-Delauw MF, Dumas R, Rébeillé F "Inhibition of p-aminobenzoate and folate syntheses in plants and apicomplexan parasites by natural product rubreserine." J Biol Chem, 2012

Canakci M, Sanli H "Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties." J Ind Microbiol Biotechnol, 2008

Cancer research UK organization: <http://www.cancerresearchuk.org/>

Carman GM, Henry SA "Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." J. Biol. Chem, 2007

Cavalier-Smith T "Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa." European Journal of Protistology, 2003

Cavalier-Smith T "Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010

Cella R, Carbonera D, Orsi R, Ferri G, Iadarola P "Proteolytic and partial sequencing studies of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from *Daucus carota*." Plant Mol Biol, 1991

Cernac A, Benning C "WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*." Plant Journal, 2004

- Cerón-García MC, Fernández-Sevilla JM, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Contreras-Gómez A, Molina-Grima E** "Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes." *Bioresour Technol*, 2013
- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J** "Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug?" *J. Clin. Invest*, 1985
- Chang W, Cheng D, Kaufmann K** "Efficient multiplex mutagenesis by RNA-guided *Cas9* and its use in the characterization of regulatory elements in the *AGAMOUS* gene." *Plant Method*, 2016
- Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT** "Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man." *J Lipid Res*, 2012
- Chapman K, Ohlrogge J** "Compartmentation of TAG accumulation in Plants." *The Journal of Biological Chemistry*, 2012
- Chen QF, Xiao S, Chye ML** "*Arabidopsis* ACBP6 is an acyl-CoA-binding protein associated with phospholipid metabolism." *Plant Signal Behav*, 2008
- Chen G, Woodfield HK, Pan X, Harwood JL, Weselake RJ** "Acyl-Trafficking During Plant Oil Accumulation." *Lipid*, 2015
- Chevalier F, Carrera LC, Nussaume L, Maréchal E** "Chemical Genetics in Dissecting Membrane Glycerolipid Functions." *Subcell Biochem*, 2016
- Choi HS, Su WM, Morgan JM, Han GS, Xu Z, Karanasios E, Siniosoglou S, Carman GM** "Phosphorylation of phosphatidate phosphatase regulates its membrane association and physiological functions in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of SER(602), THR(723), and SER(744) as the sites phosphorylated by CDC28 (CDK1)-encoded cyclin-dependent kinase." *J Biol Chem*, 2011
- Christi Y** "Biodiesel from microalgae." *Biotechnol Adv*, 2007
- Clough S, Bent A** "Simplified *Arabidopsis* Transformation Protocol." *Plant Journal*, 1998
- Cornell RB, Northwood IC** "Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization." *Trends Biochem Sci*, 2000
- Corson F, Hamant O, Bohn S, Traas J, Boudaoud A, Couder Y** "Turning a plant tissue into a living cell froth through isotropic growth." *PNAS*, 2009
- Cour des comptes**, Rapport public thématique : "La politique d'aide aux biocarburants." La Documentation française, Février 2016
- Craddock CP, Adams N, Bryant FM, Kurup S, Eastmond PJ** "Phosphatidic acid phosphohydrolase regulates phosphatidylcholine biosynthesis in *Arabidopsis* by phosphatidic acid-mediated activation of CTP:Phosphocholine cytidyltransferase activity." *Plant Cell*, 2015
- Crowe AJ, Abenes M, Plant A, Moloney MM** "The seed-specific transactivator, ABI3, induces oleosin gene expression." *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol*, 2000

Cruz-Ramírez A, López-Bucio J, Ramírez-Pimentel G, Zurita-Silva A, Sánchez-Calderon L, Ramírez-Chávez E, González-Ortega E, Herrera-Estrella L “The xip1 mutant of *Arabidopsis* reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity.” *Plant Cell*, 2004

Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernandez F, Ramirez-Chavez E, Herrera-Estrella L « Phospholipase D ζ 2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. » *PNAS*, 2006

Czabany T, Wagner A, Zweytick D, Lohner K, Leitner E, Ingolic E, Daum G “Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.” *J. Biol. Chem*, 2008

D

Da Costa E, Silva J, Mendonça SH, Abreu MH, Domingues MR “Lipidomic Approaches towards Deciphering Glycolipids from Microalgae as a Reservoir of Bioactive Lipids.” *Marine Drugs*, 2016

Da Silva PD, Lima F, Alves MM, Bijmans MF, Pereira MA “Valorization of lubricant-based wastewater for bacterial neutral lipids production: Growth-linked biosynthesis.” *Water Resources*, 2016

Daher GC, Harris BE, Diasio RB “Metabolism of pyrimidine analogs and their nucleosides.” *The international encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, 1994

Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne H “Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants.” *PNAS*, 2000

Davidi L, Katz A, Pick U “Characterization of major lipid droplet proteins from *Dunaliella*.” *Planta*, 2012

Delucchi MA, Institute of transportation, USA. “A Lifecycle Emissions Model (LEM): lifecycle emissions from transportation fuels; motor vehicles, transportation modes, electricity use, heating and cooking fuels.” *Main report UCD-ITS-RR-03-17*; 2003

Dembitsky VM, Srebnik M “Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives.” *Prog. Lipid. Res.* 2002

Dempsey E, Prudêncio M, Fennell BJ, Gomes-Santos CS, Barlow JW, Bell A “Antimitotic herbicides bind to an unidentified site on malarial parasite tubulin and block development of liver-stage *Plasmodium* parasites.” *Mol Biochem Parasitol*, 2013

Directive 2003/30/EC on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport, May 8, 2003

Dong W, Lv H, Xia G, Wang M “Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants?” *Plant Signaling & Behavior*, 2012

Dörmann P, Benning C “Galactolipids rule in seed plants.” *Trends in Plant Science*, 2002

Bibliographie

Dostál V, Libusová L "Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life." *Protoplasma*, 2014

Douce R "Site of biosynthesis of galactolipids in spinach chloroplasts." *Science*, 1974

Drews K "Folate metabolism--epigenetic role of choline and vitamin B12 during pregnancy." *Ginekol Pol*, 2015

Du ZY, Nanning C "Triacylglycerol accumulation in photosynthetic cell in plants and algae." Chapter 8 in *Lipids in Plant and Algae Development, Subcellular Biochemistry, Volume 86*, Editors: Nakamura Y, Li-Beisson Y, 2016

Dubots E, Botté C, Boudière L, Yamaryo-Botté Y, Jouhet J, Maréchal E, Block MA "Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis." *Biochimie*, 2012

Dubots E, Cottier S, Péli-Gulli MP, Jaquenoud M, Bontron S, Schneider R, De Virgilio C "TORC1 regulates Pah1 phosphatidate phosphatase activity via the Nem1/Spo7 protein phosphatase complex." *PLoS One*, 2014

Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J "Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels." *Plant Journal*, 2008

Dykes CW, Kay J, Harwood JL "Incorporation of choline and ethanolamine into phospholipids in germinating soya bean." *Biochem J*, 1976

E

Eastmond PJ "SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds." *Plant Cell*, 2006

Eastmond PJ, Quettier AL, Kroon JT, Craddock C, Adams N, Slabas AR "Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, 2010

Eichenberger W "Identification of new plant lipids: structure of a second betaine lipid from algae." P.J. Quinn, J.L. Harwood (Eds.), *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilisation*, Portland Press, London, 1990

Endo A, Kuroda M "Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis." *J Antibiot (Tokyo)*, 1976

Environmental Agency (EEA) "Greenhouse gas emission trends and projections in Europe 2004: progress by the EU and its Member States towards achieving their Kyoto Protocol targets." Report n°5. Copenhagen, Denmark, 2004.

F

Falciatore A, d'Alcalà MR, Croot P, Bowler C "Perception of environmental signals by a marine diatom." *Science*, 2000

Bibliographie

- Fan J, Andre C, Xu C** "A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*." FEBS Letters, 2011
- Fan W, Zhang M, Zhang H, Zhang P** "Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase." PLoS One, 2012
- Fan J, Yan C, Xu C** "Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol biosynthesis is crucial for protection against fatty acid-induced cell death in growing tissues of *Arabidopsis*." Plant Journal, 2013
- Fan J, Yan C, Zhang X, Xu C** "Dual role for phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol in *Arabidopsis* leaves." Plant Cell, 2013
- Fan J, Yan C, Roston R, Shanklin J, Xu C** "*Arabidopsis* lipins, PDAT1 acyltransferase, and SDP1 triacylglycerol lipase synergistically direct fatty acids toward β -oxidation, thereby maintaining membrane lipid homeostasis." Plant Cell, 2014
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK** "Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system." Cell Research, 2013
- Feutz E** "Evaluating the effects of oryzalin on the germination, emergence and vegetative vigor of non-target terrestrial plants." ABC Labs, American Environment Protection Agency (US EPA), 1992
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH** "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J. Biol. Chem, 1957
- Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, Anderson LA, Boothe JR** "Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity." ACS Chem Biol, 2013
- Freeman-Narrod M** "Choline antagonism of MTX liver toxicity in the rat." Medical and Pediatric Oncology, 1977
- Frentzen M, Heinz E, McKeon TA, Stumpf PK** "Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts." Eur J Biochem, 1983
- Frentzen M, Neuburger M, Joyard J, Douce R** "Intraorganelle localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA: sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase and acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase from potato tubers and pea leaves." Eur J Biochem, 1990
- Frentzen M, Griebau R** "Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria." Plant Physiology, 1994
- Frentzen M** "Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation." Curr Opin Plant Biol, 2004
- Froehlich JE, Benning C, Dörmann P** "The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis." J Biol Chem, 2001

G

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K "Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells." *Exp Cell Res*, 1968

Garces R, Sarmiento C, Mancha M "Oleate from triacylglycerols is desaturated in cold-induced developing sunflower (*Helianthus annuus L.*)." *Planta*, 1994

Gasulla F, Vom Dorp K, Dombrink I, Zahringer U, Gisch N, Dormann P, Bartels D "The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum* : a comparative approach." *Plant Journal*, 2013

Gaude N, Bréhélin C, Tschendorf G, Kessler F, Dörmann P "Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytol esters." *Plant Journal*, 2007

Gaude N, Nakamura Y, Scheible WR, Ohta H, Dörmann P "NPC5 is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*." *The Plant Journal*, 2008

Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP "Mechanisms of action of methotrexate." *Immunopharmacology*, 2000

Gluba-Brzozka A, Franczyk B, Toth PP, Rysz J, Banach M "Molecular mechanisms of statin intolerance." *Arch Med Sci*, 2016

Giroud G, Annegret G, Eichenberger W "Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of Molecular Species and Intracellular Site(s) of Biosynthesis." *Plant Cell Physiology*, 1988

Goldberg RB, de Paiva G, Yadegari R "Plant embryogenesis: zygote to seed." *Science*, 1994

Gómez-Merino FC, Brearley CA, Ornatowska M, Abdel-Haliem ME, Zanor MI, Mueller-Roeber B "AtDGK2, a novel diacylglycerol kinase from *Arabidopsis thaliana*, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression." *J Biol Chem*, 2004

Gonçalves GA, Prather KL, Monteiro GA, Prazeres DM "Engineering of *Escherichia coli* strains for plasmid biopharmaceutical production: scale-up challenges." *Vaccine*, 2014

Gong Y, Zhang J, Guo X, Wan X, Liang Z, Hu CJ, Jiang M "Identification and characterization of PtSGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*." *FEBS Letters*, 2013

Goreleva V, De Lepelire J, Van Daele J, Pluim D, Mei C, Cuypers A, Leroux O, Viane R, Rebeille F, Schellens JHM, Blancquaert D, Stove CP, Van Der Straeten D "Dihydrofolate reductase/thymidylate synthase fine-tunes the folate status and controls redox homeostasis in plants." *En cours de soumission*, 2016

Gout E, Bligny R, Roby C, Douce R "Transport of phosphocholine in higher plant cells: 31P nuclear magnetic resonance studies." *PNAS*, 1990

Graham IA "Seed storage oil mobilization." *Annu. Rev. Plant Biol*, 2008

Guihéneuf F, Leu S, Zarka A, Khozin-Goldberg I, Khalilov I, Boussiba S "Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*." FEBS J, 2011

H

Han GS, Wu WI, Carman GM "The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme." J Biol Chem, 2006

Han GS, Siniosoglou S, Carman GM "The cellular functions of the yeast lipin homolog PAH1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity." J. Biol. Chem, 2007

Harrison PJ, Waters RE, Taylor FJR "A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton." *J. Phycol*, 1980

Harwood JL "Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids." Biochim Biophys Acta, 1996

Harwood JL, Guschina IA "The versatility of algae and their lipid metabolism." Biochimie 2009

Heinz E "Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. In Lipid Metabolism in Plants." T.S. Moore, Jr., ed (Boca Raton, FL: CRC Press), 1993

Helling D, Possart A, Cottier S, Klahre U, Kost B "Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling." Plant Cell, 2006

Hernández ML, Whitehead L, He Z, Gazda V, Gilday A, Kozhevnikova E, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA "A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants." Plant Physiology, 2012

Hibino T, Waditee R, Araki E, Ishikawa H, Aoki K, Tanaka Y, Takabe T "Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants." J Biol Chem, 2002

Higgs HN, Han MH, Johnson GE, Glomset JA "Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine testis." J Biol Chem, 1998

Hocquellet A, Joubès J, Perret AM, Lessire R, Moreau P "Evidence for a different metabolism of PC and PE in shoots and roots." Plant Physiology and Biochemistry, 2005

Hooks MA, Turner JE, Murphy EC, Johnston KA, Burr S, Jarosławski S "The *Arabidopsis* ALDP protein homologue COMATOSE is instrumental in peroxisomal acetate metabolism." Biochem J, 2007

Horn PJ, James CN, Gidda SK, Kilaru A, Dyer JM, Mullen RT, Ohlrogge JB, Chapman KD "Identification of a new class of lipid droplet-associated proteins in plants." Plant Physiology, 2013

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." J Clin Invest, 2002

Bibliographie

Horvath SE, Daum G "Lipids of mitochondria." *Prog Lipid Res*, 2013

Hosaka K, Yamashita S "Regulatory role of phosphatidate phosphatase in triacylglycerol synthesis of *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta*, 1984

Huang CY, Chung CI, Lin YC, Hsing YI, Huang AH "Oil bodies and oleosins in *Physcomitrella* possess characteristics representative of early trends in evolution." *Plant Physiology*, 2009

Huerlimann R, de Nys R, Heimann K "Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production." *Biotechnol Bioeng*, 2010

Hunt L, Otterhag L, Lee JC, Lasheen T, Hunt J, Seki M, Shinozaki K, Sommarin M, Gilmour DJ, Pical C, Gray JE "Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms." *New Phytologist*, 2004

Hurlock AK, Roston RL, Wang K, Benning C "Lipid trafficking in plant cells." *Traffic*, 2014

I

Inatsugi R, Nakamura M, Nishida I "Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase isogenes in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol*, 2002

Ingraham HA, Tseng BY, Goulian M "Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine." *Mol Pharmacol*, 1982

Inoue Y, Moriyasu Y "Degradation of Membrane Phospholipids in Plant Cells Cultured in Sucrose-Free Medium." *Autophagy*, 2006

International Energy Agency (IEA). "World Energy Outlook 2007. China and India Insight", Paris, France.

Irdani T, Bogani P, Mengoni A, Mastromei G, Buiatti M "Construction of a new vector conferring methotrexate resistance in *Nicotiana tabacum* plants." *Plant Mol Biol*, 1998

Ishidate K "Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues." *Biochim Biophys Acta*, 1997

Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K "The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, 2001

Isleten-Hosoglu M, Ayyıldız-Tamis D, Zengin G, Elibol M "Enhanced growth and lipid accumulation by a new *Ettlia texensis* isolate under optimized photoheterotrophic condition." *Bioresource Biotechnol*, 2013

J

Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, Rébeillé F "One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development." *Plant Physiology*, 2003

James DW Jr, Dooner HK "Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition." *Theor Appl genet*, 1990

James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, Mullen RT, Dyer JM, Anderson RGW, Chapman KD "Disruption of the *Arabidopsis* CGI-58 homologue produces Chanarin-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants." *PNAS*, 2010

Jarvis P, Dörmann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J "Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant." *PNAS*, 2000

Ji MK, Yun HS, Hwang BS, Kabra AN, Jeon BH, Choi J "Mixotrophic cultivation of *Nephroselmis* sp. using industrial wastewater for enhanced microalgal biomass production." *Ecological Engineering*, 2016

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauß N "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution." *Nature*, 2001

Jordan MA « Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin." *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2002

Jost R, Berkowitz O, Shaw J, Masle J "Phosphoethanolamine N-Methyltransferase isoforms with different sensitivities to inhibition by phosphatidic acid." *The Journal of Biological Chemistry*, 2009

Jouhet J, Maréchal E, Bligny R, Joyard J, Block MA "Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation." *FEBS Letters*, 2003

Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA "Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria." *J Cell Biol*, 2004

Thèse de Juliette Jouhet "Etude des remaniements lipidiques des cellules végétales en carence de phosphate." Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005.

Jouhet J, Maréchal E, Block MA « Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells." *Prog Lipid Res*, 2007

Joyard J, Douce R "Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts." *Biochim Biophys Acta*, 1977

Joyard J, Teyssier E, Miege C, Berny-Seigneurin D, Marechal E, Block MA, Dorne AJ, Rolland N, Ajlani G, Douce R "The biochemical machinery of plastid envelope membranes." *Plant Physiol*, 1998

Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N "Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism." *Prog Lipid Res*, 2010

K

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

Karpman E, Kurzrock EA "Adverse reactions of nitrofurantoin, trimethoprim and sulfamethoxazole in children." J Urol, 2004

Kasiri S, Ulrich A, Prasad V "Optimization of CO₂ fixation by *Chlorella kessleri* cultivated in a closed raceway photo-bioreactor." Bioresource Biotechnol, 2015

Katayama K, Sakurai I, Wada H "Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria." FEBS Letters, 2004

Kates M "Hydrolysis of lecithin by plant plastid enzymes." Can J Biochem Physiol, 1955

Kennedy EP "Biosynthesis of complex lipids." Fed Proc, 1961

Kelly AA, Dörmann P "DGD2, an *arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions." J Biol Chem, 2002

Kelly AA, Froehlich JE, Dörmann P "Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis." Plant Cell, 2003

Kelly AA, van Erp H, Quettier AL, Shaw E, Menard G, Kurup S, Eastmond PJ "The SUGAR-DEPENDENT1 lipase limits triacylglycerol accumulation in vegetative tissues of *Arabidopsis*." Plant Physiology, 2013

Kellie AA, Feussner I "Oil is on the agenda: Lipid turnover in higher plants." Biochimica et Biophysica Acta, 2016

Keogh MR, Courtney PD, Kinney AJ, Dewey RE "Functional characterization of phospholipid N-methyltransferases from *Arabidopsis* and soybean." The Journal of Biological Chemistry 2009

Kim HU, Hsieh K, Ratnayake C, Huang AH "A novel group of oleosins is present inside the pollen of *Arabidopsis*." J. Biol. Chem, 2002

Kim HU, Li Y, Huang AH "Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*." Plant Cell, 2005

Kim HB, Lee H, Oh CJ, Lee HY, Eum HL, Kim HS, Hong YP, Lee Y, Choe S, An CS, Choi SB "Postembryonic seedling lethality in the sterol-deficient *Arabidopsis* cyp51A2 mutant is partially mediated by the composite action of ethylene and reactive oxygen species." Plant Physiol, 2010

Kim S, Yamaoka Y, Ono H, Kim H, Shim D, Maeshima M, Martinoia E, Cahoon EB, Nishida I, Lee Y "AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum." PNAS, 2013

- Kim HU, Jung SJ, Lee KR, Kim EA, Lee SM, Roh KH, Kim JB** "Ectopic overexpression of castor bean LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) in *Arabidopsis* triggers the expression of genes that encode regulators of seed maturation and oil body proteins in vegetative tissues." FEBS Open Bio, 2014
- Kim H, Jang S, Kim S, Yamaoka Y, Hong D, Song WY, Nishida I, Li-Beisson Y, Lee Y** "The small molecule fenpropimorph rapidly converts chloroplast membrane lipids to triacylglycerols in *Chlamydomonas reinhardtii*." Frontier in Microbiology, 2015
- Kim RJ, Kim HD, Shim D, Suh, MC** "Molecular and biochemical characterizations of the monoacylglycerol lipase gene family of *Arabidopsis thaliana*." Plant Journal, 2016
- Kinney AJ, Clarkson DT, Loughman BC** "The regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in rye (*Secale cereale*) roots. Stimulation of the nucleotide pathway by low temperature." Biochem J, 1987
- Kinney AJ** "Phospholipid head groups." In Lipid metabolism in plants. Ed. T.S. Moore p259-84. Boca Raton. CRC Press. 1993
- Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H** "Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis." PNAS, 2007
- Kobayashi K, Awai K, Nakamura M, Nagatani A, Masuda T, Ohta H** "Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation." Plant Journal, 2009
- Kobayashi K** "Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development." J Plant Res, 2016
- Kocourková D, Krcková Z, Pejchar P, Veselková S, Valentová O, Wimalasekera R, Scherer GF, Martinec J** "The phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C NPC4 plays a role in response of *Arabidopsis* roots to salt stress." Journal of experimental botany, 2011
- Koo AJK, Ohlrogge J, Pollard M** "On the export of fatty acids from the chloroplast." The Journal of biochemical Chemistry, 2004
- Kopka J, Pical C, Hetherington AM, Muller-Rober B** "CA²⁺/phospholipid-binding C2 domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium-sensing apparatus." Plant Mol Biol, 1998
- Krckova Z, Brouzdová J, Danek M, Kocourková D, Rainteau D, Ruelland E, Valentová O, Pejchar P, Martinec J** "*Arabidopsis* non-specific phospholipase C1: characterization and its involvement in response to heat stress." Frontiers in Plant Science, 2015
- Kroon JT, Wei W, Simon WJ, Slabas AR** "Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals." Phytochemistry, 2006
- Kuang A, Crispi M, Musgrave ME** "Control of seed development in *Arabidopsis thaliana* by atmospheric oxygen. Plant Cell Environ, 1998
- Kunst L, Samuels AL** "Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax." Prog Lipid Res, 2003

Kunz HH, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I, Flügge UI, Fulda M, Gierth M “The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness.” *The Plant Cell*, 2009

L

Lager I, Yilmaz JL, Zhou XR, Jasieniecka K, Kazachkov M, Wang P, Zou J, Weselake R, Smith MA, Bayon S, Dyer JM, Shockey JM, Heinz E, Green A, Banas A, Stymne S “Plant acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) have different specificities in their forward and reverse reactions.” *J Biol Chem*, 2013

Lager I, Glab B, Eriksson L, Chen G, Banas A, Stymne S “Novel reactions in acyl editing of phosphatidylcholine by lysophosphatidylcholine transacylase (LPCT) and acyl-CoA:glycerophosphocholine acyltransferase (GPCAT) activities in microsomal preparations of plant tissues.” *Planta*, 2015

Laibach N, Post J, Twyman RM, Gronover CS, Prüfer D “The characteristics and potential applications of structural lipid droplet proteins in plants.” *J Biotechnol.* 2015

Lazar G, Zhang H, Goodman HM “The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase isogenes of *Arabidopsis thaliana*.” *The Plant Journal*, 1993

Lee J, Welti R, Schapaugh WT, Trick HN “Phospholipid and triacylglycerol profiles modified by PLD suppression in soybean seed.” *Plant Biotechnol. J.* 2011

Lee E, Jalalizadeh M, Zhang Q “Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review.” *Algal Research*, 2015

Li Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge J “Oil content of *Arabidopsis* seeds: the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation.” *Phytochemistry*, 2006

Li M, Welti R, Wang X “Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D zeta1 and D zeta2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants.” *Plant Physiology*, 2006

Li J, Han D, Wang D, Ning K, Jia J, Wei L, Jing X, Huang S, Chen J, Li X, Hu Q, Xu J “Choreography of transcriptomes and lipidomes of *nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae.” *Plant Cell*, 2014

Li N, Gügel IL, Giavalisco P, Zeisler V, Schreiber L, Soll J, Philippar K “FAX1, a Novel Membrane Protein Mediating Plastid Fatty Acid Export.” *PloS Biology*, 2015

Li N, Xu C, Li-Beisson Y, Philippar K “Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells.” *Trends in Plant Science*, 2016

Liang PH, Anderson KS “Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase.” *Biochemistry*, 1998

Liao P, Chen QF, Chye ML “Transgenic *Arabidopsis* flowers overexpressing acyl-CoA-binding protein ACBP6 are freezing tolerant.” *Plant Cell Physiol*, 2014

Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett T, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, and Ohlrogge J *The Arabidopsis book, "Acyl-Lipid Metabolism"*, 2010

Liu X, Duan S, Li A, Xu N, Cai Z, Hu Z "Effect of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*." *Journal of Applied Phycology*, 2008

Liu Q, Siloto RMP, Lehner R, Stone SJ, Weselake RJ "Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology, *Prog. Lipid Res*, 2012

Liu C, Yin H, Gao P, Hu X, Yang J, Liu Z, Fu X, Luo D "Phosphatidylserine synthase 1 is required for inflorescence meristem and organ development in *Arabidopsis*." *J Integr Plant Biol*, 2013

Liu C, Xiao DW, Shi CL, Hu XF, Wu KB, Guan CY, Xiong XH "Sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPATs) in plants." *Yi Chuan*, 2013

Liu Y, Wang G, Wang X « Role of aminoalcoholphosphotransferases from *Arabidopsis thaliana* and soybean." *Plant Cell*, 2015

Löfke C, Ischebeck T, König S, Freitag S, Heilmann I "Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*." *Biochem J*, 2008

Loizeau K, Gambonnet B, Zhang GF, Curien G, Jabrin S, Van Der Straeten D, Lambert WE, Rébeillé F, Ravanel S "Regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis*: the N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation." *Plant Physiology*, 2007

Loizeau K, De Brouwer V, Gambonnet B, Yu A, Renou JP, Van Der Straeten D, Lambert WE, Rébeillé F, Ravanel S "A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by methotrexate." *Plant Physiology*, 2008

Thèse de Karen Loizeau "Etude de la régulation du métabolisme monocarboné chez *Arabidopsis thaliana*." *Biologie cellulaire, Université Joseph-Fourier - Grenoble I*, 2009

Loll B, Kern J, Seanger W, Zouni A, Biesiadka J "Toward complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II." *Nature*, 2005

Lopes R, Eleutério CV, Gonçalves LM, Cruz ME, Almeida AJ "Lipid nanoparticles containing oryzaline for the treatment of *leishmaniasis*." *Eur J Pharm Sci*

Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI "Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions." *Photosynth Res*, 2013

Lou Y, Schwender J, Shanklin J "FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo." *The Journal of Biological Chemistry*, 2014

Lu C, Xin Z, Ren Z, Miquel M, Browse J "An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of *Arabidopsis*." *PNAS*, 2009

Lu Y, Zhou W, Wei L, Li J, Jia J, Li F, Smith SM, Xu J "Regulation of the cholesterol biosynthetic pathway and its integration with fatty acid biosynthesis in the oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*." *Biotechnol Biofuels*, 2014

Lutterbeck CA, Kern DI, Machado ÊL, Kümmerer K "Evaluation of the toxic effects of four anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse for irrigation." *Chemosphere*, 2015

M

Ma J, Cheng Z, Chen J, Shen J, Zhang B, Ren Y, Ding Y, Zhou Y, Zhang H, Zhou K, Wang JL, Lei C, Zhang X, Guo X, Gao H, Bao Y, Wan JM, "Phosphatidylserine Synthase Controls Cell Elongation Especially in the Uppermost Internode in Rice by Regulation of Exocytosis." *PLoS One*, 2016

Mane SP, Vasquez-Robinet C, Sioson AA, Heath LS, Grene R "Early PLD α -mediated events in response to progressive drought stress in *Arabidopsis*: a transcriptome analysis." *J Exp Bot*, 2007

Marcel GC, Matos A, d'arcy-Lameta A, Kader JC, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi A "Two novel plant cDNAs homologous to animal type-2 phosphatidate phosphatase are expressed in cowpea leaves and are differently regulated by water deficits." *Biochem Soc Trans*, 2000

Marchive C, Nikovics K, To A, Lepiniec L, Baud S "Transcriptional regulation of fatty acid production in higher plants: molecular bases and biotechnological outcomes." *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 2014

Mata TM, Martins AA, Caetano NS "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." *Renewable and sustainable energy reviews*, 2010

May A, Spinka M, Köck M "*Arabidopsis thaliana* PECP1: enzymatic characterization and structural organization of the first plant phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase." *Biochim Biophys Acta*, 2012

McLachlan DH, Lan J, Geilfus CM, Dodd AN, Larson T, Baker A, Horak H, Kollist H, He Z, Graham I, Mickelbart MV, Hetherington AM "The breakdown of stored triacylglycerols is required during light-induced stomatal opening." *Curr. Biol*, 2016

McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD "Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance1." *Plant Physiology*, 1999

McNeil SD, Nuccio ML, Rhodes D, Shachar-Hill Y, Hanson AD "Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco." *Plant Physiology*, 2000

McNeil SD, Nuccio ML, Ziemak MJ, Hanson AD "Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase" *PNAS*, 2001

- Meesapyodsuk D, Qiu X** “A peroxygenase pathway involved in the biosynthesis of epoxy fatty acids in oat.” *Plant Physiology*, 2011
- Meijer HJ, Munnik TP** “Phospholipid-based signaling in plants.” *Annu Rev Plant Biol*, 2003
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C** “Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene.” *PNAS*, 2002
- Mhaske V, Beldjilali K, Ohlrogge J, Pollard M** “Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* knockout line for phospholipid: diacylglycerol transacylase gene (At5g13640).” *Plant Physiology Biochem*, 2005
- Michaud M, Gros V, Tardif M, Brugière S, Ferro M, Prinz WA, Toulmay A, Mathur J, Wozny M, Falconet D, Maréchal E, Block MA, Jouhet J** “AtMic60 Is Involved in Plant Mitochondria Lipid Trafficking and Is Part of a Large Complex.” *Current Biology*, 2016
- Minoda A, Sato N, Nozaki H, Okada K, Takahashi H, Sonoike K, Tsuzuki M** “Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Eur J Biochem*, 2002
- Miquel M, Browse J** “*Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase.” *J Biol Chem*, 1992
- Missihoun TD, Schmitz J, Klug R, Kirch HH, Bartels D** “Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses.” *Planta*, 2011
- Missihoun TD, Willée E, Guegan JP, Berardocco S, Shafiq MR, Bouchereau A, Bartels D** “Overexpression of ALDH10A8 And ALDH10A9 genes gives insight into their role in glycine betaine synthesis and affects the primary metabolism in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Cell Physiol*, 2015
- Mizoi J, Nakamura M, Nishida I** “Defects in CTP:phosphorylethanolamine cytidyltransferase affect embryonic and postembryonic development in *Arabidopsis*.” *Plant Cell*, 2006
- Moellering ER, Benning C** “RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Eukariotic cell*, 2010
- Moellering ER, Muthan B, Benning C** “Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane”. *Science*, 2010
- Moon BY, Higashi S, Gombos Z, Murata N** “Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants.” *PNAS*, 1995
- Moore TS** “Biosynthesis and utilization of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine.” In N Murata, ed, *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Vol 9. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 159–164, 1993
- Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer J, Bajer AS, Fosket DE** “Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro.” *Planta*, 1987

Mosblech A, Feussner I, Heilmann I "Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation." *Plant Physiology*, 2009

Mou Z, Wang X, Fu Z, Dai Y, Han C, Ouyang J, Bao F, Hu Y, Li J "Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, 2002

N

Najafabadi AH, Malekzadeh M, Jalilian F, Vossoughi M, Pazuki G "Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions." *Bioresour Technol*, 2015

Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K, Ohta H "A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*." *The Journal of Biological Chemistry*, 2005

Nakamura Y, "NPC: Nonspecific Phospholipases C in plant functions." X, Wang (ed), *Phospholipases in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants*, 2014

Nano R, Cella R, Rezzani R, Rodella L, Gerzeli G "A qualitative and quantitative assay of dihydrofolate reductase in carrot cells resistant to methotrexate." *Basci Appl Histochem*, 1989

Napier JA, Usher S, Haslam RP, Ruiz-Lopez N, Sayanova O "Transgenic plants as a sustainable, terrestrial source of fish oils." *Eur J Lipid Sci Technol*, 2015

Nguyen HM, Baudet M, Cuiné S, Adriano JM, Barthe D, Billon E, Bruley C, Beisson F, Peltier G, Ferro M, Li-Beisson Y "Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism." *Proteomics*, 2011

Nigam S, Schewe T "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation." *Biochim Biophys Acta*, 2000

Nishida I, Murata N "Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1996

Nishiyama Y, Hardré-Liénard H, Miras S, Miège C, Block MA, Revah F, Joyard J, Maréchal E "Refolding from denatured inclusion bodies, purification to homogeneity and simplified assay of MGDG synthases from land plants." *Protein Expr Purif*, 2003

Niu YF, Zhang MH, Li DW, Yang WD, Liu JS, Bai WB, Li HY "Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*." *Marine Drug*, 2013

Noll F, May C, Kindl H "Phospholipid monolayer of plant lipid bodies attacked by phospholipase A2 shows 80 nm holes analyzed by atomic force microscopy." *Biophys. Chem*, 2000

O

Ohashi Y, Oka A, Rodrigues-Pousada R, Possenti M, Ruberti I, Morelli G, Aoyama T "Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation." *Science*, 2003

Ohlrogge J, Browse J "Lipid biosynthesis." *Plant Cell*, 1995

Okazaki Y, Shimojima M, Sawada Y, Toyooka K, Narisawa T, Mochida K, Tanaka H, Matsuda F, Hirai A, Hirai MY, Ohta H, Saito K "A chloroplastic UDP-glucose pyrophosphorylase from *Arabidopsis* is the committed enzyme for the first step of sulfolipid biosynthesis." *Plant Cell*, 2009

Okuley J, Lightner J, Feldmann K, Yadav N, Lark E, Browse J "*Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis." *Plant Cell*, 1994

JB, Bourassa L, Zhang D, Shockey JM, Gidda SK, Fosnot S, Chapman KD, Mullen RT, Dyer JM "Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway." *Journal of Biological Chemistry*, 2010

Osborne TF "Cholesterol homeostasis: clipping out a slippery regulator." *Curr Biol*, 1997

Osundeko O, Pittman JK "Implications of sludge liquor addition for wastewater-based open pond cultivation of microalgae for biofuel generation and pollutant remediation." *Bioresour Technol*, 2014

P

Pamplona R "Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity." *Biochim Biophys Acta*, 2008

Pan X, Chen G, Kazachkov M, Greer MS, Caldo KM, Zou J, Weselake RJ "In vivo and in vitro evidence for biochemical coupling of reactions catalyzed by lysophosphatidylcholine acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase, *J. Biol. Chem*, 2015

Pant BD, Burgos A, Pant P, Cuadros-Inostroza A, Willmitzer L, Scheible WR "The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* during phosphorus starvation." *J Exp Bot*, 2015

Paranjapea K, Leitea GB, Hallenbecka PC "Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol." *Bioresource Technology*, 2016

Park S, Gidda SK, James CN, Horn PJ, Khoo N, Seay DC, Keereetaweep J, Chapman KD, Mullen RT, Dyer JM "The alpha/beta hydrolase CGI-58 and peroxisomal transport protein PXA1 coregulate lipid homeostasis and signaling in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, 2013

- Parthibane V, Rajakumari S, Venkateshwari V, Iyappan R, Rajasekharan R** "Oleosin is bifunctional enzyme that has both monoacylglycerol acyltransferase and phospholipase activities." *J Biol Chem*, 2012
- Pascual F, Soto-Cardalda A, Carman GM** "PAH1-encoded phosphatidate phosphatase plays a role in the growth phase- and inositol-mediated regulation of lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem*, 2013
- Pejchar P, Potocký M, Novotná Z, Veselková Š, Kocourková D, Valentová O, Schwarzerová K, Martinec J** "Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells." *New Phytologist*, 2010
- Peled E, Leu S, Zarka A, Weiss M, Pick U, Khozin-Goldberg I, Boussiba S** "Isolation of a novel oil globule protein from the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*)." *Lipids*, 2011
- Penno A, Hackenbroich G, Thiele C** "Phospholipids and lipid droplets." *Biochim Biophys Acta*, 2013
- Peters C, Li M, Narasimhan R, Roth M, Welti R, Wang C** "Nonspecific Phospholipase C NPC4 Promotes Responses to Abscisic Acid and Tolerance to Hyperosmotic Stress in *Arabidopsis*." *The Plant Cell*, 2010
- Peters C, Kim SC, Devaiah S, Li M, Wang X** "Non-specific phospholipase C5 and diacylglycerol promote lateral root development under mild salt stress in *Arabidopsis*." *Plant, Cell and Environment*, 2014
- Petroutsos D, Amiar S, Abida H, Dolch LJ, Bastien O, Rébeillé F, Jouhet J, Falconet D, Block MA, McFadden GI, Bowler C, Botté C, Maréchal E** "Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways--from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids." *Prog Lipid Res*, 2014
- Picou L, Boldor D** "Thermophysical characterization of the seeds of invasive Chinese tallow tree: importance for biofuel production." *Environ Sci Technol*, 2012
- Pizzorno G, Diasio RB, Cheng YC** "Pyrimidine and purine antimetabolite drugs." In *Cancer Medicine 6* (ed. J.F. Holland and E. Frei). BC Decker, 2003
- Pokotylo I, P Pejchar, Potocky M, Kocourkova D, Krckova Z, Ruelland E, Kravets V, Martinec J** "The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signaling." *Progress in Lipid research*, 2013
- Pomfret EA, daCosta KA, Zeisel SH** "Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon rat liver" *J Nutr Biochem*, 1990
- Pommier Y** "Pharmacological and therapeutics agents that target DNA replication", *DNA Replication in Eucaryotic Cells*, Cold Spring Harbor Press, 2nd Edition, 2006
- Porot P** "Les biocarburants de 2nd génération proches de l'industrialisation." *IFP Energies Nouvelles*, Juin 2015
- Post-Beittenmiller D, Jaworski JG, Ohlrogge JB** "In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach. Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis." *J Biol Chem*, 1991

Post-Beittenmiller D, Roughan G, Ohlrogge JB "Regulation of plant Fatty Acid biosynthesis: analysis of acyl-coenzyme A and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts." *Plant Physiology*, 1992

Potocky M, Elias M, Profotova B, Novotna Z, Valentova O, Zarsky V "Phosphatidic acid produced by phospholipase S is required for tobacco pollen tube growth." *Planta*, 2003

Poxleitner M, Rogers SW, Lacey Samuels A, Browse J, Rogers JC "A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination." *Plant Journal*, 2006

Q

Qin C, Wang X "The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine selective PLDz1 with distinct regulatory domains." *Plant Physiology*, 2002

Quinlivan EP, McPartlin J, Weir DG, Scott J "Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited." *FASEB Journal* 2000

R

Ravanel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rébeillé F, Douce R "Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol." *J Biol Chem*, 2004

Radakovits R, Jinkerson RE, Fuerstenberg SI, Tae H, Settlage RE, Boore JL, Posewitz MC "Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*." *Nat. Commun*, 2012

Rébeillé F, Jabrin S, Bligny R, Loizeau K, Gambonnet B, Van Wilder V, Douce R, Ravanel S "Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses." *PNAS*, 2006

Reddy VS, Rao DK, Rajasekharan R "Functional characterization of lysophosphatidic acid phosphatase from *Arabidopsis thaliana*." *Biochim Biophys Acta*, 2010

Rhee MS, Johnson TB, Priest DG, Galivan J "The effect of methionine on methotrexate metabolism in rat hepatocytes in monolayer culture." *Biochim Biophys Acta*, 1989

Rhodes D, Hanson AD "Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants". *Annu. Rev. Plant Physio*, 1993

Riekhof WR, Sears BB, Benning C "Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr." *Eukaryot. Cell*, 2005

Rolletschek H, Borisjuk L, Sanchez-Garcia A, Gotor C, Romero LC, Martinez-Rivas JM, Mancha M "Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds." *J Exp Bot*, 2007

Roston RL, Wang K, Kuhn LA, Benning C "Structural determinants allowing transferase activity in SENSITIVE TO FREEZING 2, classified as a family glycosyl hydrolase." *J Biol Chem*, 2014

Rudolph M, Schlereth A, Körner M, Feussner K, Berndt E, Melzer M, Hornung E, Feussner I "The lipoxygenase-dependent oxygenation of lipid body membranes is promoted by a patatin-type phospholipase in cucumber cotyledons." *J. Exp. Bot*, 2011

Ryu SB "Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipases A in plants." *Trends in Plant Science*, 2004

S

Saidani N, Botté CY, Deligny M, Bonneau AL, Reader J, Lasselin R, Merer G, Niepceron A, Brossier F, Cintrat JC, Rousseau B, Birkholtz LM, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, Mercier C, Vial H, Lopez R, Maréchal E "Discovery of compounds blocking the proliferation of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* in a chemical space based on piperidinyl-benzimidazolone analogs." *Antimicrob Agents Chemother*, 2014

Sakaki T, Ohnishi J, Kondo N, Yamada M "Polar and neutral lipid changes in spinach leaves with ozone fumigation: triacylglycerol synthesis from polar lipids." *Plant Cell Physiol*, 1985

Sakaki T, Kondo N, Yamada M "Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves." *Plant Physiology*, 1990

Salas JJ, Ohlrogge JB "Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases." *Arch Biochem Biophys*, 2002

Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L "LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters*, 2005

Sathasivam S "Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis." *Nature Clinical Practise Neurology*, 2008

Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM "Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell." *Plant Physiology*, 1998

Scherer GFE, Paul RU, Holk A, Martinec J "Down-regulation by elicitors of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C and up-regulation of phospholipase A in plant cells." *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2002

Schiff PB, Horwitz SB "Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins." *Biochemistry*, 1981

Schlame M, Rua D, Greenberg ML "The biosynthesis and functional role of cardiolipin." *Prog Lipid Res*, 2000

Bibliographie

Schmelzle T, Beck T, Martin DE, Hall MN "Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast." *Mol Cell Biol*, 2004

Schmidt MA, Herman EM "Suppression of soybean oleosin produces micro-oil bodies that aggregate into oil body/ ER complexes." *Mol Plant*, 2008

Schnurr JA, Shockey JM, de Boer GJ, Browse JA "Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*." *Plant Physiology*, 2002

Schuetz JD, Collins JM, Wallace HJ, Diasio RB "Alteration of the secondary structure of newly synthesized DNA from murine bone marrow cells by 5-fluorouracil." *Cancer Res*, 1986

Shekar S, Tumaney AW, Rao TJ, Rajasekharan R "Isolation of lysophosphatidic acid phosphatase from developing peanut cotyledons." *Plant Physiology*, 2002

Shelp BJ, Walton CS, Snedden WA, Tuin LG, Oresnik IJ, Layzell DB "Gaba shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia." *Physiol Plant*, 1995

Shimajima M, Madoka Y, Fujiwara R, Murakawa M, Yoshitake Y, Ikeda K, Koizumi R, Endo K, Ozaki K, Ohta H "An engineered lipid remodeling system using a galactolipid synthase promoter during phosphate starvation enhance soil accumulation in plants." *Frontiers in Plant Science*, 2015

Shintani DK, Ohlrogge J "Feedback inhibition of fatty acid synthesis in tobacco suspension cells." *The Plant Journal*, 1995

Shockey JM, Fulda MS, Browse J "*Arabidopsis* contains a large superfamily of acylactivating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases." *Plant Physiology*, 2003

Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan JC, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ Mullen RT, Dyer JM "Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, 2006

Shockey J, Regmi A, Cotton K, Adhikari N, Browse J, Bates PD "Identification of *Arabidopsis* GPAT9 (At5g60620) as an Essential Gene Involved in Triacylglycerol Biosynthesis." *Plant Physiology*, 2016

Siloto RM, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL, Moloney MM "The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, 2006

Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Maréchal E, Finazzi G, Morosinotto T "The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus." *Eukaryot Cell*, 2013

Singer SD, Chen G, Mietkiewska E, Tomasi P, Jayawardhane K, Dyer JM, Weselake RJ "*Arabidopsis* GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids." *J Exp Bot*, 2016

Slack CR, Campbell LC, Browse JA, Roughan PG "Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo." *Biochim. Biophys. Acta*, 1983

Somerville C, Browse J "Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes." *Science*, 1991

Sperling P, Linscheid M, Stöcker S, Mühlbach HP, Heinz E "In vivo desaturation of cis-delta 9-monounsaturated to cis-delta 9,12-diunsaturated alkenylether glycerolipids." *J Biol Chem*, 1993

Stahl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang BQ, Banas W, Banas A, Stymne S "Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*." *Plant Physiology*, 2004

Stalberg K, Neal AC, Ronne H, Stahl U "Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *S. cerevisiae*." *J. Lipid Res*, 2008

Sut D, Chutia R, Bordoloi N, Narzari R, Kataki R "Complete utilization of non-edible oil seeds of *Cascabela thevetia* through a cascade of approaches for biofuel and by-products." *Bioresour Technol* 2016

Svardal AM, Ueland PM, Berge RK, Aarsland A, Aarsaether N, Lønning PE, Refsum H "Effect of methotrexate on homocysteine and other sulfur compounds in tissues of rats fed a normal or a defined, choline-deficient diet." *Cancer Chemother Pharmacol*, 1988

T

Tabuchi T, Kawaguchi Y, Azuma T, Nanmori T, Yasuda T "Similar regulation patterns of choline monooxygenase, Phosphoethanolamine N-Methyltransferase and S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia L.*" *Plant Cell*, 2005

Tai H, Jaworski JG "3-Ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach (*Spinacia oleracea*) is not similar to other condensing enzymes of fatty acid synthase." *Plant Physiology*, 1993

Tair, The Arabidopsis Information Resource: <https://www.arabidopsis.org/>

Tasseva G, Richard L, Zachowski A "Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Letters*, 2004

Tejera N, Vauzour D, Betancor MB, Sayanova O, Usher S, Cochard M, Rigby N, Ruiz-Lopez N, Menoyo D, Tocher DR, Napier JA, Minihane AM "A Transgenic Camelina sativa Seed Oil Effectively Replaces Fish Oil as a Dietary Source of Eicosapentaenoic Acid in Mice." *J Nutr*, 2016

Testerling C, Munnik T "Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants." *Trends in plant science*, 2005

Thazar-Poulot N, Miquel M, Fobis-Loisy I, Gaude T "Peroxisome extensions deliver the *Arabidopsis* SDP1 lipase to oil bodies." *PNAS*, 2015

Bibliographie

Then RL "Antimicrobial dihydrofolate reductase inhibitors-achievements and future options: review." *J Chemother*, 2004

Theodoulou FL, Holdsworth M, Baker A "Peroxisomal ABC transporters." *FEBS Letters*, 2006

Thompson J, Taylor C, Wang TW "Altered membrane lipase expression delays leaf senescence." *Biochem Soc Trans*, 2000

Titarenko E, Rojo E, León J, Sánchez-Serrano JJ "Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Physiology*, 1997

Tjellström H, Yang Z, Allen DK, Ohlrogge JB "Rapid kinetic labeling of *Arabidopsis* cell suspension cultures: implications for models of lipid export from plastids." *Plant Physiology*, 2012

Tjellström H, Strawsine M, Ohlrogge JB "Tracking synthesis and turnover of triacylglycerol in leaves." *J Exp Bot*, 2015

To A, Joubes J, Barthole G, Lecureuil A, Scagnelli A, Jasinski S, Lepiniec L, Baud S "WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*." *Plant Cell*, 2012

Tsai CH, Warakanont J, Takeuchi T, Sears BB, Moellering ER, Benning C "The protein Compromised Hydrolysis of Triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*." *PNAS*, 2014

Tsai CH, Zienkiewicz K, Amstutz CL, Brink BG, Warakanont J, Roston R, Benning C "Dynamics of protein and polar lipid recruitment during lipid droplet assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Journal*, 2015

Tsukagoshi H, Morikami A, Nakamura K "Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings." *PNAS*, 2007

Tuma DJ, Barak AJ, Sorrell MF "Interaction of methotrexate with lipotropic factors in rat liver" *Biochemical Pharmacology*, 1975

U

Unitt MD, Harwood JL "Sidedness studies of thylakoid phosphatidylglycerol in higher plants." *Biochem J*, 1985

Uzbekov R, Roingeard P "Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections." *BMS Research Notes*, 2013

V

van Erp H, Bates PD, Burgal J, Shockey J, Browse J “*Castor* Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase facilitates efficient metabolism of hydroxy fatty acids in transgenic *Arabidopsis*.” *Plant Physiology*, 2011

Vanhercke T, Wood CC, Stymne S, Singh SP, Green AG “Metabolic engineering of plant oils and waxes for use as industrial feedstocks.” *Plant Biotechnol J*, 2013

Vanhercke T, El Tahchy A, Liu Q, Zhou XR, Shrestha P, Divi UK, Ral JP, Mansour MP, Nichols PD, James CN, Horn PJ, Chapman KD, Beudoin F, Ruiz-López N, Larkin PJ, de Feyter RC, Singh SP, Petrie JR “Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like TAG yields from plant leaves.” *Plant Biotechnol J*, 2014

Vance DE, Walkey CJ “Roles for the methylation of phosphatidylethanolamine.” *Curr Opin Lipidol*, 1998

Van Leeuwen W, Okresz L, Bögre L, Munnik T “Learning the lipid language of plant signaling.” *Trends in Plant Science*, 2004

Van Wilder V, De Brouwer V, Loizeau K, Gambonnet B, Albrieux C, Van Der Straeten D, Lambert WE, Douce R, Block MA, Rebeille F, Ravanel S “C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status.” *New Phytologist*, 2009

Varela-Moreiras G, Ragel C, Pérez de Miguelanz J “Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats.” *The American College of Nutrition*, 1995

Vaughan MA, Vaughn KC “Carrot microtubules are dinotroaniline resistant. Cytological and cross-resistance studies.” *Weed Res*, 1987

Vieler A, Brubaker SB, Vick B, Benning C “A lipid droplet protein of *Nannochloropsis* with functions partially analogous to plant oleosins.” *Plant Physiology*, 2012

Vieler A, Wu G, Tsai CH, Bullard B, Cornish AJ, Harvey C, Reza IB, Thornburg C, Achawanantakun R, Buehl CJ, Campbell MS, Cavalier D, Childs KL, Clark TJ, Deshpande R, Erickson E, Armenia Ferguson A, Handee W, Kong Q, Li X, Liu B, Lundback S, Peng C, Roston RL, Simpson SJP, Terbush A, Warakanont J, Zauner S, Farre EM, Hegg EL, Jiang N, Kuo MH, Lu Y, Niyogi KK, Ohlrogge J, Osteryoung KW, Shachar-Hill Y, Sears BB, Sun Y, Takahashi H, Yandell M, Shiu SH, Benning C “Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779.” *PLoS Genet*, 2012

Voelker T, Kinney AJ “Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids.” *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 2001

W

- Wada H, Murata N** "The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis." *Photosynth Res*, 2007
- Wahlroos T, Soukka J, Denesyuk A, Wahlroos R, Korpela T, Kilby NJ** "Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells." *Genesis*, 2003
- Wallis JG, Browse J** "Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids." *Progress in Lipid research*, 2002
- Wang Y, Kent C** "Identification of an inhibitory domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase." *J Biol Chem*, 1995
- Wang X** "Lipid Signaling" *Curr Opin Plant Biol*, 2004
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R** "Signaling functions of phosphatidic acid." *Prog. Lipid Res* 2006
- Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ** "CO₂ bio-mitigation using microalgae." *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008
- Wang ZT, Ullrich N, Joo S, Waffenschmidt S, Goodenough U** "Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*." *Eukaryot Cell*, 2009
- Wang X, Proud CG** "mTORC1 signaling: what we still don't know." *J Mol Cell Biol*, 2011
- Wang L, Shen W, Kazachkov M, Chen G, Chen Q, Carlsson AS, Stymne S, Weselake RJ, Zou J** "Metabolic interactions between the Lands cycle and the Kennedy pathway of glycerolipid synthesis in *Arabidopsis* developing seeds." *Plant Cell*, 2012
- Wang Z, Xu C, Benning C** "TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein." *Plant Journal*, 2012
- Wang Z, Benning C** "Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER-plastid membrane contact sites." *Biochem Soc Trans*, 2012
- Wang Z, Anderson NS, Benning C** "The phosphatidic acid binding site of the *Arabidopsis* trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts." *J Biol Chem*, 2013
- Wang L, Kazachkov M, Shen W, Bai M, Wu H, Zou J** "Deciphering the roles of *Arabidopsis* LPCAT and PAH in phosphatidylcholine homeostasis and pathway coordination for chloroplast lipid synthesis." *Plant Journal*, 2014
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT** "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*." *J Am Chem Soc*, 1971
- Weaver BA** "How Taxol/paclitaxel kills cancer cells." *Mol Biol Cell*, 2014
- Wickramaratna AD, Siloto RM, Mietkiewska E, Singer SD, Pan X, Weselake RJ** "Heterologous expression of flax phospholipid:diacylglycerol cholinephosphotransferase

Bibliographie

(PDCT) increases polyunsaturated fatty acid content in yeast and *Arabidopsis* seeds." BMC Biotechnol, 2015

Wimalasekera R, Pejcharb P, Holka A, Martine J, Scherer GFE "Plant Phosphatidylcholine-Hydrolyzing Phospholipases C NPC3 and NPC4 with Roles in Root Development and Brassinolide Signaling in *Arabidopsis thaliana*." Molecular Plant, 2010

Wong DM, Franz AK "A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy." J Microbiol Methods, 2013

Wu J, James DW Jr, Dooner HK, Browse J "A Mutant of *Arabidopsis* Deficient in the Elongation of Palmitic Acid." Plant Physiology, 1994

Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN "TOR signaling in growth and metabolism." Cell, 2006

X

Xiao S, Chye ML "Overexpression of *Arabidopsis* ACBP3 enhances NPR1-dependent plant resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000." Plant Physiology, 2011

Xiong Y, Sheen J "Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants." J Biol Chem, 2012

Xu C, Härtel H, Wada H, Hagio M, Yu B, Eakin C, Benning C "The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity." Plant Physiology, 2002

Xu C, Fan J, Froehlich JE, Awai K, Benning C "Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*." Plant Cell, 2005

Xu C, Moellering ER, Muthan B, Fan J, Benning C "Lipid Transport Mediated by *Arabidopsis* TGD Proteins is Unidirectional from the Endoplasmic Reticulum to the Plastid." Plant Cell Physiology, 2010

Xu J, Carlsson A, Francis T, Zhang M, Hoffmann T, Giblin M, Taylor D "Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2." BMC Plant Biol, 2012

Xue HW, Hosaka K, Plesch G, Mueller-Roeber B « Cloning of *Arabidopsis thaliana* phosphatidylinositol synthase and functional expression in the yeast *pis* mutant. » Plant Mol Biol, 2000

Xue C, Shanklin J « Triacylglycerol metabolism, function, and accumulation in plant vegetative tissues. » Annu. Rev. Plant Biol, 2016

Y

Yamaoka Y, Yu Y, Mizoi J, Fujiki Y, Saito K, Nishijima M, Lee Y, Nishida I "Phosphatidylserine synthetase 1 is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*." Plant Journal, 2011

Yang Y, Yu X, Song L, An C "ABI4 Activates DGAT1 Expression in *Arabidopsis* Seedlings during Nitrogen Deficiency." Plant Physiology, 2011

Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, Beisson F, Pollard M, Ohlrogge JB "A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, sn-2 preference and evolution." Plant Physiology, 2012

Yatsu LY, Jacks TJ "Spherosome membranes: half unit-membranes." Plant Physiol, 1972

Yazd Pershing "An overview of Folate Antagonists in cancer chemotherapy : the molecular basis of 5-fluorouracil, MTX, Aminopterin, Trimetrexate, Lometrexol, Pemetrexed, Leucovorin, and Thymitaq a novel lipophilic TS inhibitor." Support de cours, Medical University of South Carolina, 2002

Yu B, Xu C, Benning C "*Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth." PNAS, 2002

Yuan S, Zhou X, Chen R, Song B "Study on modelling microalgae growth in nitrogen-limited culture system for estimating biomass productivity." Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014

Z

Zienkiewicz K, Du ZY, Ma W, Vollheyde K, Benning C "Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae - Molecular, cellular and physiological insights." Biochim Biophys Acta, 2016

Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB "DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development." Plant Cell, 2009

Zhang J, Liu H, Sun J, Li B, Zhu Q, Chen S, Zhang H "*Arabidopsis* fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth." PloS One, 2012

Zhou X, Yuan S, Chen R, Song B "Modelling microalgae growth in nitrogen-limited continuous culture." Energy, 2014

Zhu X, Xu Y, Yu S, Lu L, Ding M, Cheng J, Song G, Gao X, Yao L, Fan D, Meng S, Zhang X, Hu S, Tian Y "An Efficient Genotyping Method for Genome-modified Animals and Human Cells Generated with CRISPR/Cas9 System." Scientific Report, 2014

Bibliographie

Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB "Endosymbiotic theory for organelle origins." *Curr Opin Microbiol*, 2014

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011

Zulu N, Popko J, Feussner I "Improving TAG accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*." International Symposium on Plant Lipids, Juillet 2016, Göttingen, Allemagne.

Annexe

Publications:

Abida H*, Dolch LJ*, Meï C*, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, Rébeillé F, Petroutsos D, Jouhet J, Maréchal E "Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornutum*." Plant Physiology, 2015. *Contribution égale

Meï C, Michaud M, Cussac M, Albrieux C, Gros V, Maréchal E, Block MA, Jouhet J, Rébeillé F "Levels of polyunsaturated fatty acids correlate with growth rate in plant cell cultures." Scientific Reports, 2015.

Goreleva V, De Lepelire J, Van Daele J, Pluim D, Meï C, Cuypers A, Leroux O, Viane R, Rebeille F, Schellens JHM, Blancquaert D, Stove CP, Van Der Straeten D "Dihydrofolate reductase/thymidylate synthase fine-tunes the folate status and controls redox homeostasis in plants." En cours de soumission, 2016

Meï C, Cussac M, Richard Haslam, Beaudoin F, Wong YS, Maréchal E, Rébeillé F "C1 metabolism inhibition and nitrogen deprivation trigger triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and highlight a role of NPC in phosphatidylcholine-to-triacylglycerol pathway." En cours de soumission, 2016

Brevet:

M. Conte, L-J. Dolch, C. Meï, C. Barette, D. Petroutsos, D. Falconet, J. Jouhet, F. Rebeille, J-C. Cintrat, E. Maréchal "Inhibitors of sterol metabolism for their use to accumulate triglycerides in microalgae, and method thereof." WO 2015/111029 A1.

Communications:

Présentation d'un **poster** au congrès "Meeting Plastids: differentiation and communications", 27 et 28 Novembre 2014, Grenoble-France

Meï C, Drogue Q, Cussac M, Maréchal E, Rébeillé F "Interplay between cell division and TAG accumulation in *A. thaliana*."

Invitation à donner une **conférence** à la Gordon Research Seminar (GRS) "Plants lipids : structure, metabolism and function", 31 Janvier et 1^{er} Février 2015, Galveston-USA.

Meï C "Interplay between cell division and TAG accumulation in *A. thaliana* cells."

Présentation d'un **poster** à la Gordon Research Conference (GRC) "Plants lipids : structure, metabolism and function", 1^{er} au 6 Février 2015, Galveston-USA.

Meï C, Drogue Q, Cussac M, Maréchal E, Rébeillé F "Interplay between cell division and TAG accumulation in *A. thaliana*."

Invitation à donner une **conférence** durant le "The 7th European Symposium on Plant Lipids", 5 au 8 Juillet 2015, Harpenden-UK.

Meï C "Interplay between cell division and TAG accumulation in *A. thaliana* cells."

Présentation d'un **poster** durant le "22nd International Symposium on Plant Lipids", 3 au 8 Juillet 2016, Göttingen-Allemagne.

Meï C, Cussac M, Haslam R, Beaudoin F, Wong YS, Maréchal E, Rébeillé F "C1 metabolism inhibition & Nitrogen deficiency highlight a NPC role during TAG accumulation in *A. thaliana* cells."

Etude des relations entre division cellulaire et métabolisme des triglycérides chez les plantes et les algues

Trouver des solutions aux carburants fossiles est un des grands challenges du XXIème siècle. Les plantes et les microalgues sont capables de produire de l'huile, facilement convertible en biodiésel. Afin d'optimiser la production de biocarburant, il est essentiel de connaître les mécanismes cellulaires menant à la formation de ces lipides de réserve aussi appelés TAG (triacylglycérides). En condition physiologique, le flux de lipide est naturellement orienté vers la synthèse de lipides membranaires qui permettent de créer de nouvelles membranes lors de la division cellulaire. Le manque de nutriments disponibles est une condition souvent rencontrée par les végétaux terrestres et les microalgues. Chez ces dernières, lors d'une carence d'azote, la croissance cellulaire est ralentie et les TAG s'accumulent. Le flux de lipides, normalement orienté vers la synthèse de nouvelles membranes, est-il alors basculé vers la synthèse des lipides de réserve ? Pour vérifier cette hypothèse, une gamme de composés connus pour arrêter la croissance cellulaire a été testée sur la plante supérieure *Arabidopsis thaliana* selon une stratégie de génétique chimique. Quel que soit le traitement, l'inhibition de la croissance est toujours accompagnée par une augmentation de la teneur en TAG. Parmi les inhibiteurs, le méthotrexate, qui réprime l'enzyme dihydrofolate réductase impliquée dans le métabolisme C1, induit une augmentation des lipides de réserve jusqu'à 15 fois la valeur du contrôle. Ce traitement a été comparé à une carence en azote, qui dans nos conditions expérimentales, ralentie la croissance cellulaire et augmente d'un facteur 60 la teneur en TAG. L'analyse des profils lipidiques révèle que la déficience en azote engendre une diminution des classes de lipides membranaires -phospholipides et galactolipides, au profit des TAG, tandis que le traitement méthotrexate n'est pas associé à un remaniement membranaire. Néanmoins, les deux conditions partagent des similitudes, comme le taux d'insaturation des acides gras et l'expression des gènes des désaturases qui sont modifiés. La forte expression des gènes codant pour les Non Spécific Phospholipases C (*NPC4/5*), ainsi que des expériences de pulse-chase avec de la phosphatidylcholine (PC) marquée, ont mis en évidence que ce phospholipide est plus utilisé pour produire des TAG dans les deux traitements, qu'en condition contrôle. Afin d'évaluer plus finement l'importance des enzymes NPC4 et 5 dans le métabolisme d'accumulation des lipides de réserve, la construction de lignées mutantes d'*A. thaliana* (surexprimeur ou knock-out) a été amorcée. Les microalgues sont des modèles puissants pour les biocarburants de 3ème génération. Pour cette raison nous avons testé l'effet d'une déficience minérale et l'impact de différents inhibiteurs de croissance sur l'accumulation de TAG chez la microalgue *Phaeodactylum tricorutum*. Les résultats préliminaires suggèrent que la sensibilité aux inhibiteurs peut être différente chez les diatomées et les plantes supérieures.

Alternatives to fossil fuel are one of the biggest challenges of the 21st century. Plants and microalgae are able to produce oil which is easily convertible in biodiesel. In order to optimise the biofuel production it is necessary to know the cellular mechanisms leading to the setting up of these storage lipids or TAG (triacylglycerides). In its physiological condition, the lipid flux is naturally orientated towards the membrane lipid synthesis, which allows the creation of new membranes which occurs during the cell division. Nitrogen deficiency, a condition often encountered by plants and algae, is known to induce cell growth to slow down and an accumulation of TAG in microalgae models. Is the lipid flux, which is conventionally orientated towards new membrane synthesis, tipped over the storage lipid synthesis? To check this hypothesis, a range of compounds known to stop the cell growth was tested on the higher plant model *Arabidopsis thaliana*, according to a chemical genetic strategy. All treatments showed a rise of the TAG content associated to a cell growth inhibition. Among them, the methotrexate inhibit the dihydrofolate reductase enzyme involved in the C1 metabolism and induced a TAG accumulation up to 15 times the control. This treatment was compared to a nitrogen starvation condition, which in our experiments slowed down the cell growth and induced an increase of 60 times to the TAG content. The lipid profile analysis revealed that the nitrogen deficiency led to a decrease of membrane lipids -phospholipids and galactolipids, in favour to TAG, whereas the methotrexate treatment was not associated to any membrane remodelling. Nevertheless, both conditions shared similarities, as the modifications of the fatty acid insaturation profile and the expression of desaturase genes. The strong gene expression of Non Specific phospholipases C (*NPC4/5*) and pulse-chase experiments performed with a labelled phosphatidylcholine (PC), highlighted the predominant involvement of this phospholipid in the TAG production which occurs during the two treatments. In order to evaluate the NPC role in the storage lipid metabolism more closely, *A. thaliana* mutant lines for NPC4 and NPC5 (over-expressers and knock-out) were initiated. Microalgae are powerful models for the third generation of biofuels. For this reason we tested the impact of a nutrient deficiency as well as the effect of different growth inhibitors on the TAG accumulation in the marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum*. Preliminary results suggested that the inhibitor sensibility can be different between diatoms and higher plants.