



HAL
open science

Caractérisation des glycérolipides et de la dynamique de remodelage en chaînes acyles chez *Ostreococcus tauri*

Charlotte Degraeve Guilbault

► **To cite this version:**

Charlotte Degraeve Guilbault. Caractérisation des glycérolipides et de la dynamique de remodelage en chaînes acyles chez *Ostreococcus tauri*. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0825 . tel-01761866

HAL Id: tel-01761866

<https://theses.hal.science/tel-01761866>

Submitted on 9 Apr 2018

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 présentée
Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE VEGETALE

Par Charlotte DEGRAEVE-GUILBAULT

**CARACTERISATION DES GLYCEROLIPIDES ET DE
LA DYNAMIQUE DE REMODELAGE EN CHAINES
ACYLES CHEZ OSTREOCOCCUS TAURI**

Sous la direction de : Florence CORELLOU

Soutenue le 8 décembre 2017

Membres du jury :

M. HERNOULD, Michel	Professeur Université, INRA Bordeaux	Président
M. BEAUDOIN, Frédéric	Chercheur, Rothamsted Research	Rapporteur
M. REBEILLE, Fabrice	Chercheur, LPVC CEA Grenoble	Rapporteur
Mme DABOUSSI, Fayza	Directrice de recherche INRA, Toulouse	Examinatrice

Laboratoire de Biogénèse Membranaire, UMR5200 - 33140 Villenave d'Ornon

Caractérisation des glycérolipides et de la dynamique de remodelage en chaînes acyles chez *Ostreococcus tauri*

Résumé :

La picoalgue verte marine *Ostreococcus tauri* est un eucaryote minimal développé en système modèle et qui a servi de ressource de gènes en biologie des lipides. Des informations détaillées sur ces caractéristiques lipidiques étaient cependant manquantes. Lors de ma thèse j'ai caractérisé le glycérolipidome d'*O. tauri* et ai cherché à déterminer quelles sont les cibles enzymatiques responsables de la dynamique des acides gras (FA) et de la régulation du métabolisme lipidique en réponse à des modifications de l'environnement (carences nutritives et refroidissement). *O. tauri* présente des caractéristiques uniques de composition en lipides et en FA mixtes entre les algues vertes et les Chromalveolates, et a été validé comme espèce modèle pour la classe des Mamiellophyceae. L'acide docosahexaénoïque (DHA) est confiné dans les lipides présumés extraplastidiaux : le phosphatidyltriméthylpropanethiol (PDPT) et le bétaine-lipide diacylglyceryl-hydroxyméthyl-triméthyl- β -alanine (DGTA), tous deux marqueurs lipidiques des Chromalveolates. Les lipides plastidiaux de type procaryotique sont caractérisés par une prépondérance de FA polyinsaturés (PUFA) en C18 *n*-3, le 18:5 *n*-3 étant restreint aux galactolipides. Le 16:4 *n*-3, PUFA typique des galactolipides des microalgues vertes, est également un composant majoritaire des lipides extraplastidiaux chez *O. tauri*. Les triacylglycérols (TAG) présentent tout le panel d'acides gras d'*O. tauri* et leurs combinaisons moléculaires indiquent une origine plastidiale majoritaire. La carence azote provoque une forte accumulation de TAG, notamment des espèces présentant des combinaisons *sn*-1/*sn*-2 en 18:X/16:X et s'accompagne d'un transfert de carbone du phosphatidylglycérol (PG) et du monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) aux TAG ce qui indique une contribution croissante de la voie plastidiale à la synthèse des TAG. Des expériences préliminaires de RT-qPCR sur des gènes du métabolisme des TAG révèlent une forte activation transcriptionnelle de certaines diacylglycérol acyltransférases (DAGT). Les carences nutritives répriment sévèrement l'activité $\Delta 6$ désaturase, générant une inversion du ratio 18:3/18:4 dans les lipides plastidiaux qui se répercute dans les TAG. La régulation fine et dynamique de ce ratio suggère un rôle important du 18:3 et du 18:4 dans les membranes plastidiales. Le refroidissement engendre une augmentation spécifique du 18:5 des galactolipides. La recherche active de la désaturase responsable de ce phénotype par une approche d'expression de gènes candidats en systèmes homologue et hétérologues (*S. cerevisiae*, *N. Benthamiana*) a conduit à l'identification de deux $\Delta 6$ désaturases plastidiales jamais caractérisées dans d'autres systèmes. Celles-ci possèdent des spécificités non redondantes et originales entre elles et par rapport à l'acyl-CoA- $\Delta 6$ d'*O. tauri*.

Mots clés :

Ostreococcus tauri, glycérolipides, triacylglycérols (TAG), carence azote, acides gras polyinsaturés (PUFA), désaturases

Characterization of glycerolipid and associated acyl remodeling dynamics in *Ostreococcus tauri*

Abstract :

The marine green picoalga *Ostreococcus tauri* is a minimal eukaryote implemented as model system that has been used as gene resource for lipid biology. Detailed information about its lipidic features was however missing. During my PhD, I characterized *O. tauri* glycerolipidome and associated dynamics under environmental stresses such as nutrient starvations and chilling and investigated transcriptional variations of putative target enzymes responsible for these changes. *O. tauri* which could be validated as model for related species of the class Mamiellophyceae, was found to display unique lipidic features related to both green and Chromalveolates microalgae. Docosahexaenoic acid (DHA) is confined to presumed extraplastidial lipids i.e. phosphatidyl-dimethylpropanethiol (PDPT) and the betaine lipid diacylglycerol-hydroxymethyl-trimethyl- β -alanine (DGTA); all of these compounds are hallmarks of Chromalveolates. Plastidial lipids found to be of prokaryotic type are characterized by the overwhelming presence of C18 *n*-3 polyunsaturated FA (PUFA), 18:5 *n*-3 being restricted to galactolipids. C16:4 *n*-3, an FA typical of green microalgae galactolipids, also was a major component of *O. tauri* extraplastidial lipids. Triacylglycerols (TAGs) display the complete panel of FAs, and their molecular combinations designate a major plastidial origin of DAG precursors. Nitrate starvation greatly increases TAG content, in particular 18:X/16:X (*sn*-1/*sn*-2) combinations, and was associated with the transfer of carbon from phosphatidylglycerol (PG) and monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) to TAG indicating an increased contribution of the plastidial pathway to the TAG synthesis. Preliminary RT-qPCR experiments on TAG metabolism genes revealed an important transcriptional activation of some diacylglycerol acyltransferases (DGAT). Nutrient starvations severely repress Δ 6 desaturase activity and result in the inversion of the 18:3/18:4 ratio in plastidial lipids that was feedback into TAG. The fine-tuning and dynamic regulation of the 18:3/18:4 ratio suggests an important physiological role of these FAs in photosynthetic membranes. Chilling generates an increase of 18:5 in galactolipids. The active quest for the desaturases responsible for this phenotype was achieved by expressing candidate genes in homologous and heterologous (*S. cerevisiae*, *N. Benthamiana*) systems and led to the identification of two yet uncharacterized plastidial Δ 6 desaturases. These desaturases display original and non-redundant specificity between each other and with the previously characterized in *O. tauri* Δ 6 acyl-CoA desaturase.

Keywords :

Ostreococcus tauri, glycerolipids, Triacylglycerols, nitrogen starvation, PUFA, desaturases

*A ma famille et mes amis,
A mes collègues du LBM,*

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	5
-------------------------------------	----------

CONTEXTE.....	11
----------------------	-----------

1 Potentiel biotechnologique des microalgues.....	11
1.1 Essor biotechnologique des microalgues.....	11
1.2 Acides gras polyinsaturés	12
2 Les lipides en bref !	13
3 Quels modèles d'étude du métabolisme lipidique.....	15
3.1 Les systèmes modèles utilisés	15
3.2 <i>Ostreococcus tauri</i> nouveau modèle pour l'étude des lipides	18

PROJET DE RECHERCHE.....	19
---------------------------------	-----------

INTRODUCTION.....	21
--------------------------	-----------

1 Phylogénie des microalgues du phytoplancton eucaryote.....	21
2 Acides gras biomarqueurs des microalgues	24
3 <i>Ostreococcus tauri</i>.....	25
3.1 Découverte.....	25
3.2 Importance écologique et écotypes	26
3.3 Propriétés du génome d' <i>Ostreococcus tauri</i>	28
3.4 Outils génétiques et cellulaires	29
4 Métabolisme des glycérolipides	29
4.1 Synthèse des acides gras.....	30
4.2 Synthèse des glycérolipides.....	31
4.2.1 Acyl-transférases impliquées dans la synthèse <i>de novo</i> des glycérolipides	32
4.2.2 Synthèse des têtes polaires des glycérolipides	34
4.3 Edition des chaînes acyles	40
4.4 Synthèse des TAG	41
4.4.1 Origine des DAG.....	41
4.4.2 Origine de la chaîne acyle en position <i>sn-3</i>	43
4.4.3 Localisation de l'assemblage des TAG	45

5	Synthèse des acides gras polyinsaturés.....	46
5.1	Nomenclature des acides gras	46
5.2	Voies de biosynthèse de PUFA	46
5.3	Acides gras désaturases	48
5.3.1	Classification des désaturases.....	49
5.3.2	Spécificités des désaturases	51
5.4	Données fonctionnelles des désaturases d'acides gras	53
5.4.1	Les 'first' désaturases	53
5.4.2	Les oméga désaturases :	55
5.4.3	Les 'front-end' désaturases :	59

MATERIEL ET METHODES.....63

1	Matériel	63
1.1	Souches de microlagues utilisées	Erreur ! Signet non défini.
1.2.	Conditions de culture	Erreur ! Signet non défini.
2	Méthodes cellulaires	66
2.1	Analyse en cytométrie de flux	66
2.2	Changement de milieu de culture	66
2.3	Récolte.....	67
3	Méthodes biochimiques.....	67
3.1	Obtention de l'extrait lipidique	67
3.2	Chromatographie en couche mince	68
3.3	Identification des classes lipidiques	69
3.4	Analyse des Acyl-CoA (R. Haslam et O. Sayanova)	72
3.5	Charge des lipides à l'acétate radiomarqué (avec F. Corellou et D. Coulon).....	73
4	Méthodes de biologie moléculaire	73
4.1	Extraction des acides nucléiques	73
4.2	RT-qPCR.....	74
4.2.1	Transcription inverse	74
4.2.2	Réaction de polymérisation en chaîne.....	74
4.3	Suivi d'expression de gènes en PCR quantitative (J. Joubès).....	75
4.4	Clonage et Transformation	76
4.4.1	Clonage pour surexpression en système homologue (avec F. Corellou et K. Tuphile). 76	
4.4.2	Clonage Gateway pour expression en système hétérologue (F. Domergue, R. Gomez et J. Joubès).....	77
4.5	Expression des séquences codantes de désaturases en systèmes homologue et hétérologue 78	

4.5.1	Génération d' <i>Ostreococcus</i> surexpresseurs (F. Corellou)	78
4.5.2	Expression des gènes de désaturases chez <i>S. cerevisiae</i> (avec F. Domergue et R. Gomez) 78	
4.5.3	Expression transitoire de désaturases chez <i>N. benthamiana</i> (avec F. Domergue et R. Gomez) 79	
5	Méthode d'observation	80
5.1	Observation d' <i>O. tauri</i> en microscopie électronique à transmission (C. Bréhélin et F. Corellou) 80	
5.2	Observation de la localisation cellulaire de protéines d'intérêt d' <i>Ostreococcus</i> chez le tabac (avec J. Gronnier)	81

RESULTATS ET DISCUSSION.....83

Partie 1 : Caractérisation et dynamique des glycérolipides en carence nutritive : remodelage acyle et accumulation de TAG

1	Article : Caractérisation des glycérolipides et changements associées aux carences nutritives chez la picoalgue verte <i>Ostreococcus tauri</i>.....	85
2	Quelle(s) origine(s) pour les TAG générés en carence azote chez <i>O. tauri</i> ?	119
2.1	La carence azote provoque rapidement et efficacement l'accumulation des TAG par rapport à d'autres stress	120
2.2	Analyse positionnelle et quantification des espèces de TAG synthétisés en carence azote	122
2.2.1	Caractérisation des espèces de TAG	122
2.2.2	Dynamique des espèces de TAG en carence azote.....	126
2.2.3	Dynamique des espèces de lipides structuraux en carence azote	127
2.2.4	Dynamique de transfert du ¹⁴ C entre lipides structuraux et TAG.....	129
2.3	Régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme des TAG	132

Partie 2 : Identification fonctionnelle des désaturases impliquées dans le refroidissement

1	Remodelage des glycérolipides et de leurs chaînes acyles lors du refroidissement	141
1.1	Impact de l'adaptation au froid sur le glycérolipidome.....	141
1.1.1	Démarche expérimentale	141
1.1.2	Exploration et comparaison du glycérolipidome d' <i>O. tauri</i> cultivé à 24°C ou à 14°C	142
1.2	Cinétique des effets du refroidissement sur les FA totaux	146
2	Identification des désaturases impliquées dans la réponse au refroidissement	150
2.1	Identification <i>in silico</i> et phylogénie des désaturases présentes chez <i>O. tauri</i> : données génomiques.....	150

2.2	Réponse transcriptionnelle des gènes de biosynthèse des PUFA au cours du refroidissement	154
3	Caractérisation fonctionnelle des désaturases impliquées dans la gestion des PUFA en C18 : découverte de deux nouvelles $\Delta 6$ désaturases plastidiales	158
3.1	Etude de la localisation subcellulaire	158
3.2	Etude fonctionnelle préliminaire des désaturases candidates.....	161
3.2.1	Sélection des lignées surexpresseurs de désaturases candidates chez <i>O. tauri</i>	161
3.2.2	Spécificité de substrat potentielle des $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et $\Delta 6/\Delta 8S-2$ désaturases.....	168
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	179
1	Caractéristiques majeures du glycérolipidome d' <i>O. tauri</i>	179
2	Génération de la spécificité acyle des lipides.....	179
3	Rôle des C18 PUFA	182
	BIBLIOGRAPHIE.....	185
	ANNEXES.....	213

Liste des abréviations

Δ : Delta

ω : oméga

A

aa : acides aminés

AAPT : aminoalcool phosphotransférase

ACCase : acétyl-CoA carboxylase

ACP : protéine transporteur de chaînes acyles (pour 'acyl carrier protein')

ALA : acide α -linoléique (18:3 $\Delta^{9,12,15}$ *n*-3)

ARA : acide arachidonique (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ *n*-6)

B

BL : bétaine-lipide

BHT : hydroxytoluène butylé

C

CCA1 : CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1

cDNA : ADN complémentaire

CDP-DAG : cytidine diphosphate-diacylglycérol

CDS : CTP phosphatidate cytidyltransferase ou CDP-DAG synthase

CoA : Coenzyme A

CS : Score chloroplastidial

Cytb5 : cytochrome b5

D

DAG : diacylglycérol

DGCC : diacylglycéryl-carboxyhydrométhylcholine

DGAT : acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférase

DGDG : digalactosyldiacylglycérol

DGDS : DGDG-synthase
DGLA : acide γ -linoléinique (18:3 ^{Δ 6,9,12} *n*-6)
DGHS, diacylglycérylhomosérine
DGTA : diacylglycérylhydroxyméthyltriméthyl- β -alanine
DGTS : diacylglycéryltriméthylhomosérine
DHA : acide docosahexaénoïque (22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19} *n*-3)
DPA : acide docosapentaénoïque (22:5 ^{Δ 7,10,13,16,19} *n*-3)
DO : densité optique

E

Elo : élongases
ENR : énoyl-ACP réductase
EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17} *n*-3)
ETA : acide eicosatetraénoïque (20:5 ^{Δ 8,11,14,17} *n*-3)
ESI-MS : spectrométrie de masse à ionisation par électrospray

F

FA : acide gras (pour 'fatty acid')
FAD : FA-désaturases
FAE : FA-élongases
FAT : acide gras-ACP thioestérase
FFA : acides gras libres (pour 'free fatty acids')
FAMES : esters méthylés d'acides gras
FAS : enzyme de synthèse des acides gras (pour 'fatty acid synthase')
FSC : paramètre de taille (pour 'pour Forward scatter')

G

G : gentamycine
G3P : glycérol-3-phosphate
GC-FID : chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GLA : acide γ -linoléinique (18:3 ^{Δ 6,9,12} *n*-6)
GGGT : galactolipide:galactolipide galactosyltransférase

GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase

H

HAPT : transporteur à haute affinité pour le phosphate (pour 'high affinity phosphate transporter')

HD : 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase

HP : haute performance

HU : hydroxyurée

K

KAS : 3-kétoacyl-ACP synthase

KAR : 3-kétoacyl-ACP réductase

L

LA : acide linoléique (18:2^{Δ9,12} *n*-3)

LACS : acyl à longue chaîne-CoA synthétase

LD : jour/nuit

LL : lumière continue

LN : lipides neutres

LPA : acide lysophosphatidique

LPAAT : acide lysophosphatidique acyltransférase

M

MAG : 2-monoacylglycérol

Met : méthionine

MGAT : monoacylglycérol acyltransférase

MGDG : monogalactosyldiacylglycérol

MGDS : MGDG-synthase

O

OPA : acide octadécapentaénoïque (18:5^{Δ3,6,9,12,15}, *n*-3)

P

PA : acide phosphatidique

PAP : acide phosphatidique phosphatase

PC : phosphatidylcholine

PCA : analyse en composante principale

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PDCT : phosphatidylcholine : diacylglycérolcholinephosphotransférase

PDPT : phosphatidyl diméthylpropanethiol

PE : phosphatidyléthanolamine

PEAMT : phosphoéthanolamine méthyltransférases

PEG : polyéthylène glycol

PG : phosphatidylglycérol

PGD1 : plastidial galactolipid degradation 1

pHAPT : promoteur du transporteur à haute affinité pour le phosphate

PI : phosphatidylinositol

PL : lipide polaire

PLMT : phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférases

PS : phosphatidylsérine

PSII : photosystème II

PUFA : acide gras poly-insaturé (pour 'poly-unsaturated fatty acid')

Q

qPCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative

R

RE : reticulum endoplasmique

RCC : Collection de Culture de Roscoff

RLU : unité relative de luminescence

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène (pour 'reactive oxygen species')

RT : rétro-transcription

S

S : spectinomycine

SCD : sequence codante directe

SDA : acide stéaridonique (18:4^{Δ6,9,12,15} *n*-3)

SFR2 : SENSITIVE TO FREEZING

SQDG : sulfoquinovosyldiacylglycérol

sn : position stéréospécifique

SP : peptide signal

SSC : paramètre de granulométrie (pour 'Side Scatter')

T

TE : acyl-ACP thioestérase

Tic/Toc : protéine de traversée de la membrane externe/interne du chloroplaste (pour 'translocons of the outer/inner membrane of chloroplast')

TLC : chromatographie sur couche mince (pour 'thin layer chromatography')

V

VLC : très longue chaîne (pour 'very long chain')

W

WRI : WRINKLED

Y

YFP : protéine fluorescente jaune (pour 'yellow fluorescent protein')

Contexte

1 Potentiel biotechnologique des microalgues

1.1 Essor biotechnologique des microalgues

Les microalgues constituent un groupe extrêmement divers d'organismes unicellulaires eucaryotes (protistes) et photosynthétiques (ou l'ayant été) qui peuvent être photoautotrophes, mixotrophes ou hétérotrophes. Elles sont présentes dans tous les habitats dont les milieux aquatiques. Les microalgues sont réparties dans plusieurs groupes phylogénétiques, incluant les Archaeplastida (dont algues vertes et rouges) et les Chromalveolata (dont algues brunes et dorées) (Irigoiien et al., 2004). Les organismes photoautotrophes sont les producteurs primaires les plus abondants des systèmes aquatiques. En raison de sa capacité photosynthétique exceptionnelle, le phytoplancton marin fixe 30 à 60% du CO₂ atmosphérique alors qu'il ne représente que 1-2% de la biomasse planétaire (Behrenfeld et al., 2006, 2009). La culture de microalgues n'entre pas en compétition avec les surfaces arables ou l'eau potable et est réalisable en systèmes clos (contrôle du milieu, non dissémination des organismes génétiquement modifiés (OGM)). Les microalgues et les cyanobactéries ont longtemps été marginalisées comme modèles d'étude en biologie moléculaire et physiologie. Le regain d'intérêt pour ces organismes, en particulier pour leur composition et leur métabolisme lipidique, provient de leur fort potentiel biotechnologique. Les microalgues contiennent 30-70% (poids sec) de lipides totaux et produisent 10-50% « d'huile » (triacylglycérides (TAG)) valorisables après transformation par des procédés industriels dans l'alimentation humaine et animale, ou dans l'industrie chimique, pharmaceutique et des biocarburants (Domínguez, 2013). Parmi ces produits à haute-valeur ajoutée, les acides gras (FA pour 'fatty acids') notamment les acides gras polyinsaturés (PUFA pour 'polyunsaturated fatty acid') oméga (ω) 3 et 6, les pigments caroténoïdes et les phytostérols font l'objet d'une forte demande. Si l'exploitation industrielle des microalgues nécessite des améliorations technologiques (génie des procédés) et génétiques pour réduire les coûts de production, il existe déjà des 'pipelines' de production rentable et de nombreuses PME utilisant les microalgues (rapport Europe 2014). Une souche est classiquement exploitée pour un composé précis. Une stratégie alternative dite de bioraffinerie vise à augmenter la rentabilité de la culture d'une espèce donnée en diversifiant au maximum les composés produits et/ou en couplant la production de biomasse à des processus de dépollution (Fig. 1).

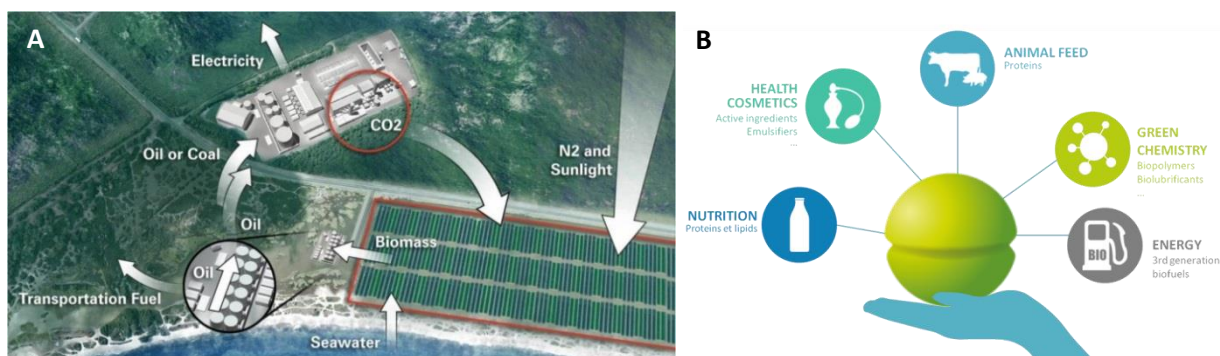


Figure 1 : Les microalgues, bio-ressources durables de produits à haute valeur ajoutée.

(A) Exemple d'utilisation des microalgues pour la production de biocarburant où la biomasse est couplée à la bioremédiation du CO₂ produit par une usine. (B). Illustration de la diversité des produits pouvant être produit en plus des biocarburants par bioraffinerie. (Crédit photo © Fermentalg)

Les microalgues constituent non seulement une bio-ressource durable de produits variés mais également un réservoir de gènes originaux sous-tendant des voies métaboliques inédites qui peuvent être utilisés pour l'ingénierie génétique d'autres systèmes biologiques dont la production est rentable et maîtrisée.

1.2 Acides gras polyinsaturés

Les microalgues présentent une variété inégalée et spécifique de PUFA ; cette variété est accrue pour les microalgues marines qui sont les producteurs primaires de PUFA à très longues chaînes (VLC pour 'very long chain') tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5^{Δ5,8,11,14,17}) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}). Ces FA absents de la majorité des microalgues d'eau douce et terrestres, transitent via la chaîne alimentaire océanique et s'accumulent dans les huiles de poissons gras (Parrish, 2013). L'EPA et le DHA sont essentiels à la santé humaine. Ils jouent des rôles essentiels dans la régulation des réponses immunitaires et anti-inflammatoires (Bazan et al., 2011; Simopoulos, 2002) et ont des effets bénéfiques contre les maladies cardiaques et oncogéniques (Lenihan-Geels et al., 2013; Simopoulos, 2008). Le DHA est indispensable au développement du système visuel, cognitif et à la reproduction animale (Tvrzicka et al., 2011). L'homme étant incapable de synthétiser efficacement ces FA essentiels (Burdge and Calder, 2005), ces derniers doivent être directement apportés par l'alimentation, notamment par la consommation de poissons gras (Strobel et al., 2012). Néanmoins, en raison de l'épuisement des ressources océaniques par la surpêche (en krill et en poisson) (Ward and Singh, 2005) et de risques sanitaires liés à la présence de contaminants chimiques dans l'huile de ces poissons (Bourdon et al., 2010; Mahaffey et al., 2008), les apports en poisson gras sont loin d'être suffisants au vu des recommandations nutritionnelles et de l'accroissement démographique (Martins et al., 2013). L'aquaculture nécessite que la nourriture des poissons soit elle-même riche en VLC-PUFA. Les microalgues marines ont donc été identifiées comme une source durable et alternative de VLC-PUFA. Les voies de synthèse des VLC-PUFA des microalgues sont spécifiques ainsi que la machinerie enzymatique associée; au centre de cette machinerie les FA-désaturases (Des) et FA-élongases (Elo)

jouent un rôle prépondérant. Leur caractérisation a permis la reconstruction de voie de biosynthèse de LC-PUFA chez des organismes hétérologues déjà cultivés. A l'heure actuelle, des essais en champ sont en cours pour une éventuelle mise sur le marché de l'espèce cultivée *Camelina sativa* transgénique pour la production de VLC-PUFA (Usher et al., 2017).

Si c'est l'intérêt biotechnologique des voies de biosynthèse des PUFA qui a suscité le plus d'attention pour les microalgues productrices de VLC-PUFA, il est important de noter que le rôle physiologique spécifique (s'il en est) de ces PUFA au sein des membranes des microalgues n'est que très peu étudié. Or l'influence de l'EPA et du DHA sur la structuration des biomembranes et donc leurs fonctions, est une question biologique fondamentale. Néanmoins les données actuelles démontrant l'importance des PUFA pour la physiologie par des approches fonctionnelles sont maigres et proviennent essentiellement d'études en systèmes artificiels (Mason et al., 2016; Shaikh et al., 2015).

2 Les lipides en bref !

Le terme lipide désigne plusieurs groupes de composés hydrophobes ou amphiphiles, structurellement et fonctionnellement différents mais qui ont en commun leur solubilité dans des solvants organiques et leur faible solubilité dans l'eau. Ces composés jouent une variété de fonctions biologiques dans les cellules, dont celui d'être les composants de base des membranes cellulaires (phosphoglycérolipides, galactolipides, stérols, sphingolipides), des molécules de réserve (TAG) et des molécules de signalisation (acide phosphatidique, phosphoinosites, sphingolipides) (pour revue Hou et al., 2016).

Les glycérolipides sont caractérisée par la présence d'un squelette glycérol portant au moins deux chaînes acyles en positions *sn*-1 et *sn*-2 (Fig. 2)

	Name	Structure	Nomenclature
Lipid	Phosphatidylcholine (PC)		PC 16:0/18:1 Ou PC 32:1

Figure 2 : Présentation des glycérolipides : exemple de la phosphatidylcholine.

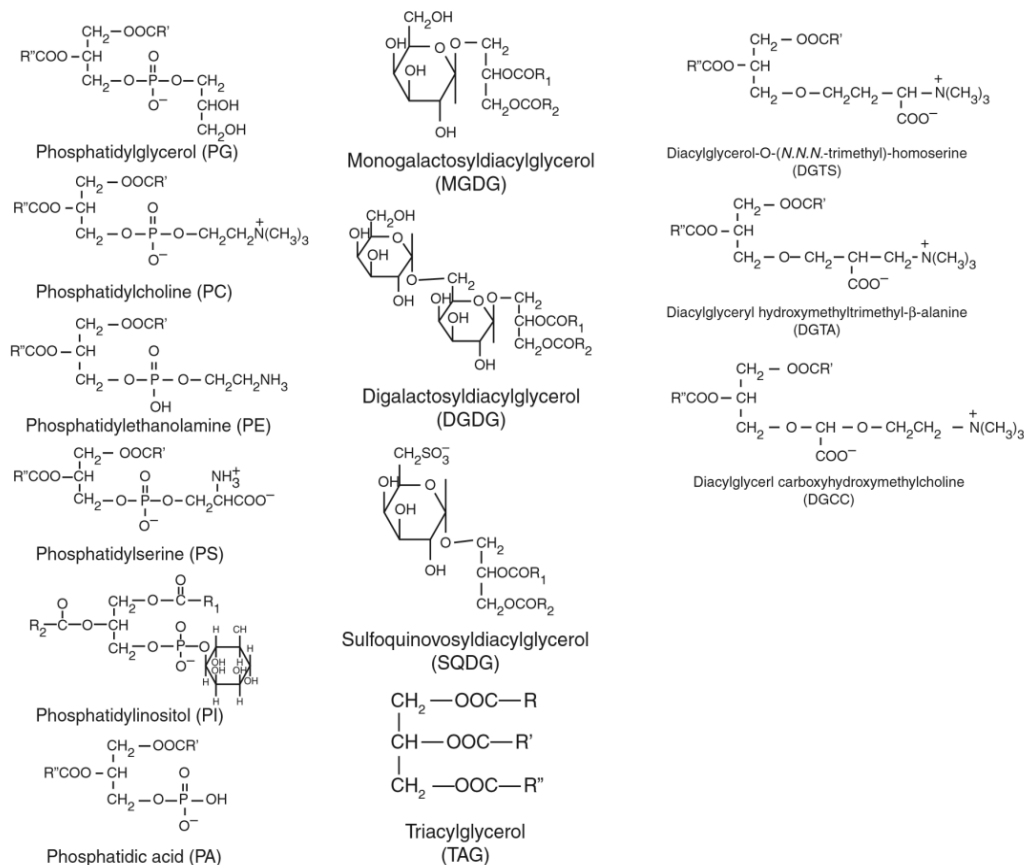


Figure 3 : Structure de glycérolipides retrouvés chez les microalgues

Dans le cas des glycérolipides structuraux, une tête polaire est liée en position *sn*-3 (Fig.2). Les glycérolipides plastidiaux, conservés au cours de l'évolution, sont les galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG)), le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG) (Fig. 3). L'importance de ce quatuor lipidique pour l'organisation des membranes thylakoïdales, et donc les fonctions photosynthétiques, est reconnu des cyanobactéries jusqu'aux plantes supérieures et repose essentiellement sur l'interaction de ces lipides avec les photosystèmes II (Boudière et al., 2014). Les phospholipides (PL) tels que la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les glycérolipides majoritaires des membranes extraplastidiales (Dorne et al., 1990; Künzler and Eichenberger, 1997) (Fig. 3). Une autre classe de lipides structuraux répandue chez les microalgues sont les bétaine-lipides (BL) (Cañavate et al., 2016; Dembitsky, 1996). Dans les BL, la tête polaire est liée au squelette glycérol par une liaison éther et non phosphoester comme dans les PL. Elle correspond soit à une sérine, soit une alanine ou soit une carboxycholine. Par conséquent, les bétaine-lipides sont respectivement appelés diacylglycéryltriméthylhomosérine (DGTS), diacylglycérylhydroxyméthyltriméthyl-β-alanine (DGTA) et diacylglycéryl-carboxyhydrométhylcholine (DGCC) (Fig. 3) (Kato et al., 1996). Chez les microalgues. Les BL ont été

localisés dans des membranes extrachloroplastiques (Künzler and Eichenberger, 1997) ; il a été démontré qu'ils se substituent aux phospholipides lors de carences phosphates aussi bien chez les procaryotes, les champignons que chez les microalgues (Hofmann and Eichenberger, 1996; Khozin-Goldberg and Cohen, 2006; Riekhof et al., 2014)

La synthèse des TAG résulte de l'acylation des diacylglycérols (DAG) sur le dernier groupe hydroxyle du squelette glycérol (position *sn-3*) (Fig. 2). Chez les microalgues les TAG s'accumulent en conditions de stress souvent associées à un ralentissement ou un arrêt de la division cellulaire mais ils sont néanmoins présents en faible quantité en conditions favorables (Sharma et al., 2012). Au-delà du rôle des TAG comme molécules de stockage d'énergie, de plus en plus de données suggèrent que, au moins chez les microalgues, les TAG servent également de réservoir d'acides gras. Les TAG pourraient être des régulateurs à part entière du remodelage en chaînes acyles des lipides structuraux à partir desquels ils sont en partie synthétisés en conditions de stress, et servir à une synthèse rapide et à moindre coût énergétique de lipides structuraux lors de la restauration des conditions de croissance (Cohen et al., 2000; Goncalves et al., 2016; Yoon et al., 2012). La synthèse des TAG chez les microalgues, quoique procédant dans les grandes lignes de mécanismes conservés chez les plantes, présente beaucoup de particularités révélées par une progression constante des connaissances dans ce domaine d'investigation à fort potentiel biotechnologique. La participation prédominante des lipides plastidiaux à la synthèse de TAG chez les microalgues est actuellement une des différences les plus frappantes par rapport aux plantes (Goncalves et al., 2016).

3 Quels modèles d'étude du métabolisme lipidique

3.1 Les systèmes modèles utilisés

La notion de système modèle qui a émergé en biologie correspond à un organisme choisi comme référence pour sa position phylogénétique et ses propriétés biologiques, en vue de répondre à une question biologique par une approche fonctionnelle. Il faut donc que les données génomiques soient disponibles et les outils expérimentaux développés. Les qualités pratiques d'un bon système modèle en biologie comportent : sa manipulation et son observation aisée, son cycle de vie court et le fait d'être génétiquement manipulable. Les avancées technologiques ont permis le séquençage de nombreux génomes d'organisme d'intérêt et l'accroissement des données de metagénomique (Tableau 1, page suivante). Différentes techniques de modifications génétiques ont émergé chez certains des organismes producteurs primaires de VLC-PUFA les hissant au rang de modèles fonctionnels pour l'étude du métabolisme des FA et des lipides (pour revue Stephens et al., 2015).

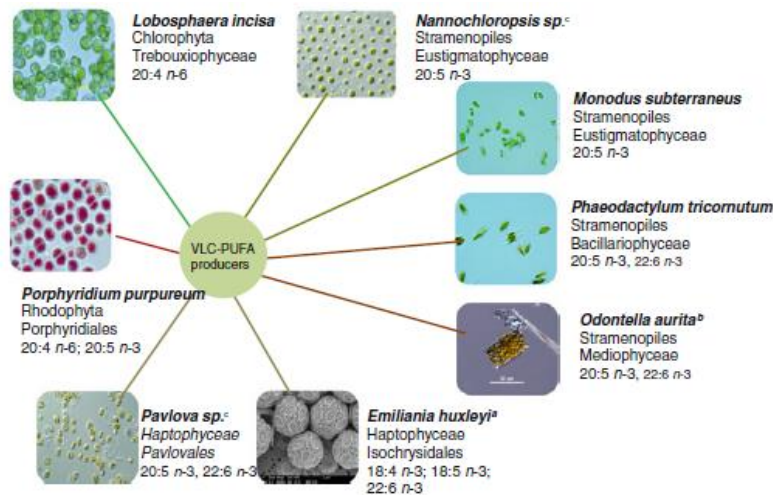


Figure 4 : Exemple de microalgues productrices de VLC-PUFA appartenant à différentes lignées (Khozin-Goldberg et al., 2016).

Des études pour appréhender le métabolisme des lipides chez les microalgues marines ont principalement été menées sur des espèces appartenant au supergroupe Chromalveolata. Les diatomées *Phaeodactylum tricornutum* et *Thalassiosira pseudonana* ainsi que l'Eustigmatophyte *Nannochloropsis gaditana*, une souche oléagineuse, ont particulièrement retenu l'attention (Abida et al., 2015; Mühlroth et al., 2013; Niu et al., 2016; Peng et al., 2014) (Fig. 4). Avant l'étude de leur métabolisme lipidique, les diatomées étaient connues pour leur implication dans le cycle du carbone (Bopp et al., 2005) et les propriétés de leur frustule de silice (Gross, 2012). *P. tricornutum* dont le génome a été séquencé en 2008 est une productrice efficace d'EPA, et d'un peu de DHA (Tableau 1, Fig. 4). De nombreuses études de son métabolisme lipidique ont été réalisées (Abida et al., 2015; Levitan et al., 2015; Popko et al., 2016), et elle est fréquemment utilisée pour l'ingénierie métabolique des LC-PUFA et des TAG (Hamilton et al., 2014; Xue et al., 2015). Pour la lignée verte le modèle dominant est *Chlamydomonas reinhardtii*, une microalgue terrestre du sol (Li-Beisson et al., 2015). Depuis les années 1960, cette Chlorophyte est un organisme modèle notamment pour étudier les gènes et mécanismes moléculaires impliqués dans la photosynthèse, la nutrition ou encore la motilité des flagelles. Le décryptage de son génome débuté en 2001 a été publié 6 ans plus tard (Merchant et al., 2007) et révèle une taille de 112 Mb codant 17 000 gènes. Grâce aux nombreux outils et ressources développées depuis des années, malgré un génome de taille relativement élevé, les problèmes de transformation nucléaire et la difficulté technique de la recombinaison homologue (Annexe 1), ce modèle a permis d'élucider de nombreuses voies de biosynthèse des lipides chez cette microalgue (pour revue Li-Beisson et al., 2015). Cependant, l'ingénierie génétique des modèles d'espèces de microalgues non-oléagineuses pour augmenter l'accumulation des lipides a rarement été réussi jusqu'à maintenant (Muto et al., 2015). L'Eustigmatophyte oléagineuse *Nannochloropsis gaditana* a alors retenu l'attention pour sa capacité à accumuler de grandes quantités de TAG (Doan and Obbard, 2011; Wang et al., 2014). Ces caractéristiques lui confèrent un fort potentiel industriel et elles ont conduit en 2012 au séquençage de

son génome de 27Mb (10 000 gènes), à sa transformation nucléaire (Kilian et al., 2011; Radakovits et al., 2012) et au remplacement de gènes homologue (Kilian et al., 2011) afin d'ouvrir de nouvelles possibilités d'étudier et d'amélioration des microalgues (Annexe 1). De plus d'autres modèles plus confidentiels comme les chlorelles, les espèces de *Dunaliella*, *Pavlova lutheri*, *Emiliana huxleyi*, *Lobophora incisa* pour lesquels la transformation n'est pas établie ou plus délicate sont étudiés par d'autres approches (omiques, radiolabelling etc...) et nourrissent la connaissance en révélant leur similitudes et leur particularités.

Tableau 1 : Génomes disponibles de microalgues (Adapté de Stephens et al., 2015).

Lors que la transformation nucléaire est disponible (yes) se reporter à l'annexe 1 pour les références bibliographiques.

Division, Class	Specie	Size (Mb)	Sequencing date	Nuclear transformation
Chlorophyta, Mamiellophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i>	13	2006 Derelle 2014	yes
	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	13.2	2007 Palenick	-
	<i>Ostreococcus sp.</i> RCC809	12	2008 Joint genome institute	-
	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	21	2007 (Worden 2009)	-
	<i>Micromonas pusilla</i> RCC299/NOUM17	22	2007 (Worden 2009)	-
	<i>Bathycoccus prasinos</i> BBAN7	15	2012 JGI	-
Chlorophyta, Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503 cw92 mt+	111	2007 Merchant	yes
	<i>Chlorella variabilis</i> NC64A	46.2	2010 Blanc	Yes for other sps of chlorella
	<i>Coccomyxa sp.</i> C-169	41	2007 (Blanc 2012)	-
	<i>Dunaliella salina</i> CCAP19/18	130	2014 JGI	yes
	<i>Volvox carteri</i>	131.2	2010 Prochnik 2010	yes
Glaucophyta	<i>Cyanophora paradoxa</i>	EST	2012 Price et al 2012	-
Rodophyta	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> Strain:10D	16.73	2004 Matsuki 2007	yes
	<i>Galdieria sulphuraria</i>	13.7	2005 2013 Schonknecht	-
	<i>Porphyridium purpureum</i>	19.7	2013 Bhattacharya	-
	<i>Pyropia yezoensis</i>	43	2013 Kasuza DNA Research Institute	-
Stramenopiles, Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira pseudonana</i> Strain:CCMP 1335	34.5	2004 Armbrust	yes
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Strain: CCAP1055/1	27.4	2008 Bowler	yes
	<i>Fragilariopsis cylindrus</i>	81	2017 JGI	-
Stramenopiles, Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	27.5	2012 Qingdao Inst. Bioe. Biop. Tech.	yes
Haptophyta	<i>Emiliana huxleyi</i> (CCMP1516)	141.7	2017 (168 Read et al 2013)	
Cryptophyta	<i>Guillardia theta</i>	87	2012 curtis 2012	

3.2 *Ostreococcus tauri* nouveau modèle pour l'étude des lipides

Considérant le cycle global du carbone, l'importance des espèces picoplanctoniques et en particulier des picoeucaryotes de la lignée verte, est hautement reconnue (Massana, 2011; Vaultot et al., 2008). Elles jouent le rôle d'une pompe biologique qui fixe le carbone et le séquestre en profondeur (Falkowski, 2012). *Ostreococcus tauri* une picoalgue verte marine a émergé en tant que modèle au cours des dix dernières années. Cet organisme a suscité l'intérêt de la communauté scientifique en raison de son extrême simplicité et de la compaction maximale de son génome (Blanc-Mathieu et al., 2014; Courties et al., 1994; Derelle et al., 2006). Il a été développé en système modèle pour étudier chez un organisme photosynthétique minimal (et de niche écologique particulière) différents mécanismes comme le cycle cellulaire, de la photosynthèse, de l'horloge circadienne, de l'absorption du fer (Cardol et al., 2008; Corellou et al., 2009; Monnier et al., 2010).

Jamais utilisé pour l'étude du métabolisme lipidique, ce picoeucaryote à la base de la lignée verte produit efficacement du DHA ce qui est exceptionnel au regard de sa phylogénie et est un avantage par rapport aux autres modèles de microalgues marines disponibles qui produisent essentiellement de l'EPA (Trentacoste et al., 2015; Wagner et al., 2010). Cela rend *O. tauri* attractif en tant que modèle pour l'étude du métabolisme des lipides dans la lignée verte et notamment en vue de comprendre la régulation de la biosynthèse des PUFA et leurs fonctions cellulaires.

Projet de recherche

Afin de découvrir les fonctions physiologiques des PUFA et de débloquent certains verrous pour en optimiser la production, les espèces du phytoplancton marin semblent être de bons modèles. Parmi les modèles de microalgues classiquement utilisés et pour lesquels la transformation génétique se fait en routine, *Ostreococcus tauri* est le seul représentant de la lignée verte qui contienne une diversité en PUFA où prédominent le DHA (Wagner et al., 2010) et les PUFA oméga-3 essentiels : l'acide α -linoléique (ALA, 18:3 ^{Δ 9,12,15} n-3) et l'acide stéaridonique (SDA, 18:4 ^{Δ 6,9,12,15} n-3). Si cet organisme a été utilisé comme ressource de gènes pour l'ingénierie de la synthèse des VLC-PUFA, les données concernant ses caractéristiques lipidiques propres et les changements dynamiques associés en réponse à des facteurs environnementaux n'existaient pas au début de ma thèse.

Les objectifs de ma thèse ont été (i) d'identifier les paramètres de culture engendrant des variations du profil en FA (ii) de caractériser le glycérolipidome d'*O.tauri* (iii) d'étudier les FA-désaturases impliquées dans la régulation dynamique des PUFA, ceci avec l'objectif à plus long terme d'appréhender l'impact des variations en FA sur la physiologie de l'organisme.

La réalisation des deux premiers points a permis la publication d'un article qui fournit les bases essentielles de la connaissance et de la dynamique du glycérolipidome d'*O.tauri* en utilisant le scénario physiologique des carences nutritives. Sur la base de la réponse au refroidissement, le troisième point a permis une caractérisation préliminaire de nouvelles Delta(Δ)-6 désaturases qui sont plastidiales. Aucune autre (Δ)-6 désaturases plastidiale n'avait été rapportée à ce jour

Introduction

1 Phylogénie des microalgues du phytoplancton eucaryote

Le terme microalgue correspond à un groupe d'une grande diversité écologique et évolutive, composé d'organismes eucaryotiques, unicellulaires, photosynthétiques (ou l'ayant été) et le plus souvent aquatiques, même si certaines classes de microalgues de la lignée verte sont souvent rencontrées dans des écosystèmes air-terre (Holzinger and Karsten, 2013). Le phytoplancton fait référence aux unicellulaires indifféremment procaryotes et eucaryotes photosynthétiques des écosystèmes aquatiques.

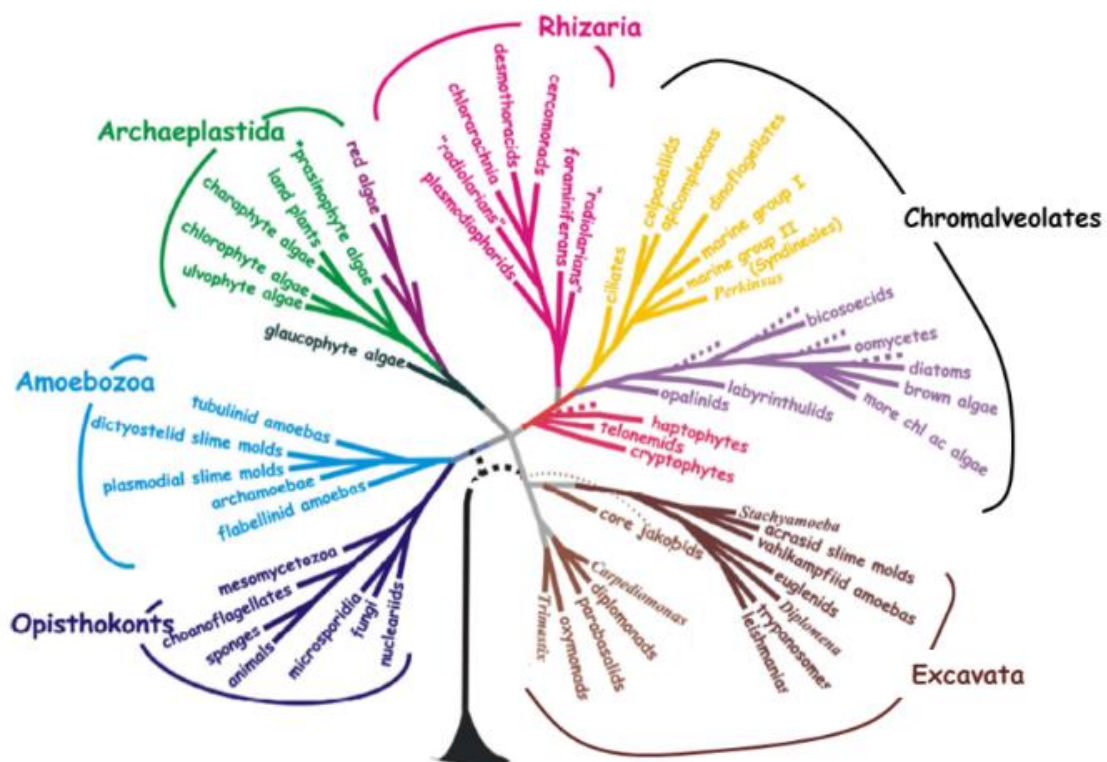


Figure 5 : Arbre phylogénétique représentant la distribution des taxons phytoplanctoniques parmi les 6 lignées eucaryotes (Adapté de Baldauf, 2008 d'après Burki, 2014; Not et al., 2012)
Les Chromalveolates regroupent les Alveolates (jaunes) et les Heterokontes ou stramenopiles (violet)

L'impressionnante diversité des microalgues tient à leur répartition dans cinq des six super-groupes (règnes) eucaryotiques dont les groupes majoritaires sont les Archeplastida et les Chromalveolata (Fig. 5). Le super-groupe Chromalveolata est exclusivement composé de microalgues et macroalgues. Il est le groupe évolutivement le plus diversifié et comprend les diatomées (embranchement Stramenopiles), les Eustigmatophytes, les dinoflagellés (embranchement des Alveolata) et les Haptophytes (Burki et al.,

2016). Les super-groupes Rhizaria et Excavata sont plus confidentiels (Archibald, 2005; Khozin-Goldberg et al., 2016; Nakayama and Archibald, 2012).

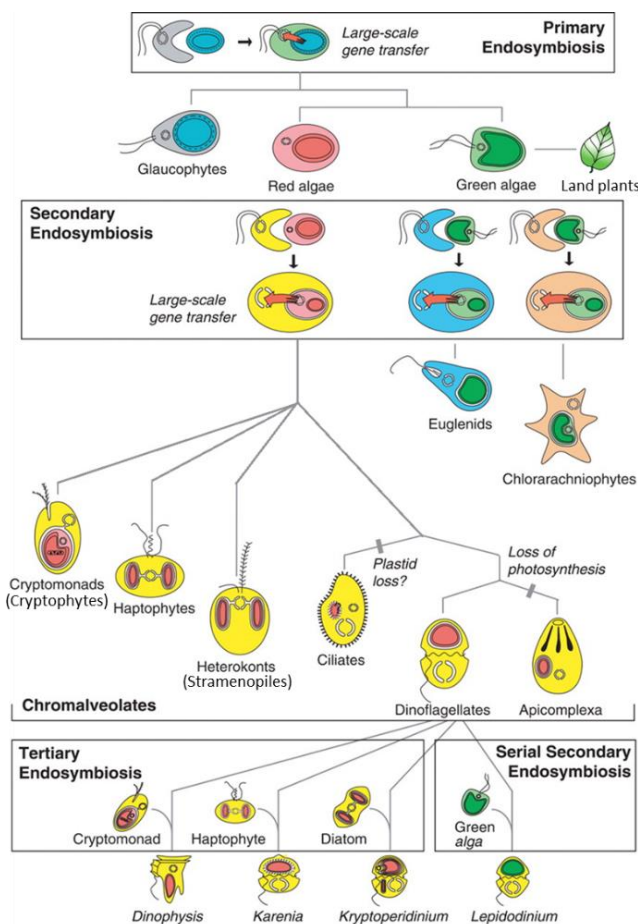


Figure 6 : Evolution des microalgues et dispersion des chloroplastes par les phénomènes d'endosymbiose (modifié d'après Keeling, 2010; Khozin-Goldberg et al., 2016; Paini, 2013; Tirichine and Bowler, 2011)

La phylogénie des microalgues retrace en filigrane l'origine évolutive des plastes. L'évolution des différents groupes de microalgues repose sur des phénomènes d'endosymbioses primaires, secondaires voire même tertiaires d'organismes photosynthétiques réalisés par des protistes ancestraux (Fig. 6). L'endosymbiose primaire survenue il y a 1,8 milliard d'années est un événement rare qui correspond à la capture d'une cyanobactérie par un eucaryote ancestral. La cellule résultante abrite alors un plastide photosynthétique entouré de deux membranes avec un génome réduit dérivé des cyanobactéries. (Gould et al., 2008; Kutschera and Niklas, 2005). Cette endosymbiose est à l'origine de l'évolution des organismes du règne Archeplastidia qui inclut les microalgues des embranchements Glaucophyta, Rhodophyta (algues rouges) et les Chlorophyta (algues vertes) ainsi que les plantes terrestres (Streptophyta) (Fig. 6) (McFadden and van Dooren, 2004; Rodríguez-Ezpeleta et al., 2005; Simon et al., 2009).

Des évidences ultra-structurales, biochimiques et génétiques ont révélé des endosymbioses additionnelles de microalgues vertes ou rouges qui auraient eu lieu de multiples fois. Selon ces études

l'émergence des euglènes (super groupe Excavata), des chlorarachniophytes (super-groupe Rhizaria) et d'un petit groupe de dinoflagellés est liée à l'endosymbiose secondaire d'une algue verte (Fig. 6) tandis que l'émergence du super-groupe des Chromalveolates est liée à l'endosymbiose secondaire voir tertiaire d'une microalgue rouge par un eucaryote ancestral (Delwiche and Palmer, 1996; Kutschera and Niklas, 2005, 2008). Ces endosymbioses secondaires donnent lieu à des plastes enveloppés de 3 ou 4 membranes. Des évidences d'endosymbiose secondaire cryptique de microalgue verte apparaissent chez les diatomées. En effet des gènes appelés « verts » ont été récemment découverts dans le génome de diatomées et semblent être évolutivement reliés à des ancêtres des prasinophytes (Moustafa et al., 2009)

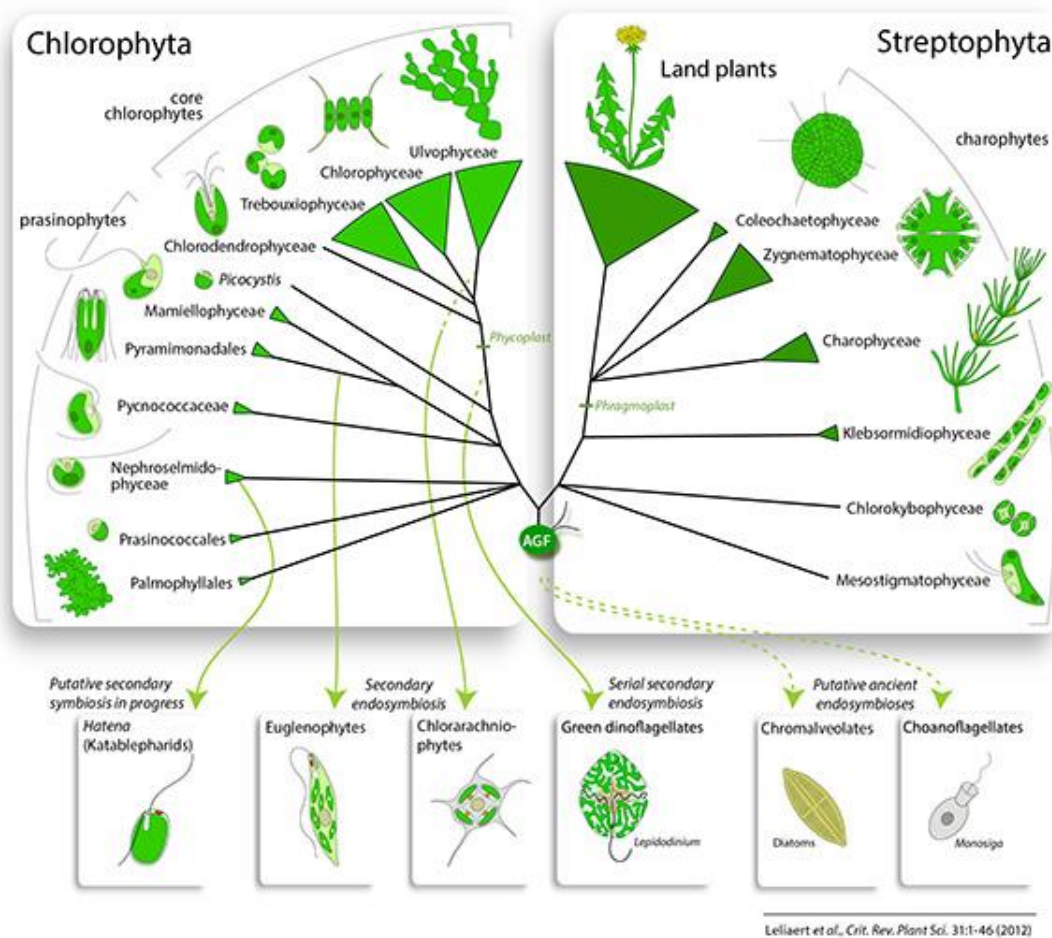


Figure 7 : Vue d'ensemble de la phylogénie de la lignée verte (en haut) et dispersion de gènes « verts » chez les autres eucaryotes (en bas) (Leliaert et al., 2012)

Les prasinophytes correspondent à un groupe paraphylétique qui ne comprend donc qu'une partie des descendants d'un ancêtre commun. Les prasinophytes englobent la majorité des espèces picoeucaryotes connues (organisme de diamètre inférieur à 2 ou 3 μm). Ce groupe a divergé à la base de la divergence entre Chlorophytes et Streptophytes dans la lignée verte (Fig. 7) (Leliaert et al., 2012). Les prasinophytes ont été originellement décrits comme des organismes recouverts d'écailles et pourvus de un à huit

flagelles (Mattox and Stewart, 1984). La phylogénie des prasinophytes a été révisée récemment et est en constante évolution (Marin and Melkonian, 2010)

2 Acides gras biomarqueurs des microalgues

L'étude des profils en FA totaux révèle des relations phylogénétiques au niveau des phylums et des classes permettant d'utiliser les FA comme biomarqueurs de certaines classes. Mais à des taxons phylogénétiques inférieurs, la distribution en FA ne permet pas de différencier des espèces proches (Khozin-Goldberg et al., 2016 (pour revue) ; Lang et al., 2011)

Les acides gras saturés et mono-insaturés présentent une abondance différente chez les groupes de microalgues (Hu et al., 2008). Le 14:0, 16:0 et 16:1^{Δ9} n-7 par exemple, sont communs aux Stramenopiles et Eustigmatophytes, tandis que le 16:0 et le 18:1^{Δ9} n-9 sont abondants chez les Chlorophytes qui sont dépourvues de 14:0. Les chlorophytes qui sont évolutivement proches des plantes terrestres, sont les seules à posséder l'acide hexadecatetraénoïque (16:4^{Δ4,7,10,13} n-3) qui est le composant acyle majoritaire des galactolipides du chloroplaste de *C. reinhardtii* (Lang et al., 2011; Zauner et al., 2012).

Le 18:4 et les VLC-PUFA sont absents des Chlorophytes marines tandis que la lignée des Chromalveolates se distinguent par la présence de FA en C18 insaturés (qui sont peu représentés chez les diatomées) et/ou de VLC-PUFA en C20 ou C22 (notamment chez les espèces marines de diatomées). Certaines microalgues présentent des FA particuliers par rapport aux plantes en général comme l'acide stéaridonique (18:4^{Δ6,9,12,15} n-3), qui est absent de la feuille de maïs, de pêche et d'épinard, et de l'huile de palme ou de ricin, mais qui est retrouvé abondant chez la microalgue *Isochrysis* sp. ou chez le phytoplancton marin comme *Olisthodiscus* sp. (Xanthophyceae) et *Amphidinium carterale* (Dinophyceae) (Li-Beisson et al., 2016). L'acide octadecapentaénoïque (OPA, 18:5^{Δ3,6,9,12,15} n-3) est quant à lui retrouvé dans les galactolipides de la coccolithophore marine *Emiliana huxleyi* représentante des Haptophytes (Sayanova et al., 2011) et chez les dinoflagellés (Dinophyceae) et étonamment chez certaines espèces de prasinophytes qui appartiennent pourtant à la lignée verte (Leblond et al., 2010a). Le clade des Straménopiles réunit un grand groupe de microalgues autotrophiques (diatomées, Eustigmatophytes, certains dinoflagellés) et hétérotrophiques (dinoflagellés, oomycètes, thraustochytrides, labyrinthulides) produisant les VLC-PUFA EPA et DHA dans des proportions variables et où l'EPA représente souvent le VLC-PUFA majoritaire (Khozin-Goldberg et al., 2016). L'EPA participe notamment à la composition des galactolipides chez ces microalgues. Chez les Rhodophytes et les Glaucophytes le DHA est absent, seuls les VLC-PUFA acide arachidonique (ARA, 20:4^{Δ5,8,11,14} n-6) et EPA sont retrouvés (Dunstan et al., 2005; Lang et al., 2011; Leblond et al., 2010a, 2010b). Les prasinophytes sont les seuls représentants de la lignée verte à présenter en quantité significatives pour certaines de l'EPA (*Tetraselmis chui*) ou du DHA (essentiellement actuelles

Mamiellales) (Dunstan et al., 1992). La synthèse des VLC-PUFA semble donc être un ancien trait, maintenu dans les divisions précoces des algues vertes prasinophytes et microalgues rouges et qui a ensuite été perdu ou conservé partiellement durant l'évolution de la lignée verte et des plantes supérieures (Khozin-Goldberg et al., 2016).

En sachant que la présence d'insaturations dans les chaînes acyles participe au maintien de la fluidité membranaire chez les animaux, les plantes et les cyanobactéries (pour revue Los et al., 2013), il est légitime de se poser la question du rôle des VLC-PUFA dans les membranes de leur équivalence entre des phylums éloignés qui pourraient utiliser des PUFA différents pour réaliser une même fonction..

3 *Ostreococcus tauri*

3.1 Découverte

Ostreococcus tauri a été le premier du genre *Ostreococcus* à être découvert en 1994 dans l'étang de Thau près de Sète grâce à l'analyse en cytométrie de flux (Fig. 8). Cette technique essentielle en océanographie permet d'analyser rapidement les populations phytoplanctoniques sur la base de leur taille, de leur granularité et de leur composition pigmentaire. Il s'avéra que la population picophytoplanctonique de l'étang de Thau était largement dominée par une population dont la signature ne correspondait pas à celle attendue pour des cyanobactéries. L'isolement de cette population par simple filtration permit de caractériser sur des critères morphologiques et pigmentaires un nouvel eucaryote photosynthétique de structure minimaliste: *Ostreococcus tauri*.

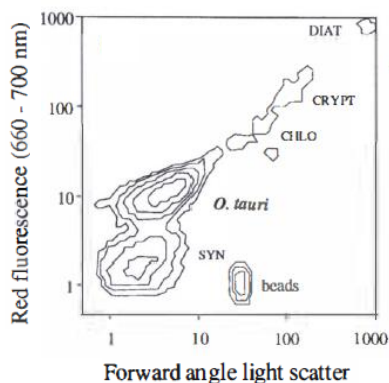


Figure 8 : Signature cytométrique d'*Ostreococcus tauri*. (adaptée de la figure 1-b de Chrétiennot-Dinet et al., 1995).

L'autofluorescence rouge d'*O. tauri* est supérieure à celles des cyanobactéries (ici *Synechococcus* sp. SYN) alors que sa taille évaluée sur le paramètre "Forward angle scatter" est de l'ordre des cyanobactéries et nettement inférieure à celle de microalgues chlorophytes (CHLO), cryptophytes (CRYPT) et des diatomées (DIAT). Le diamètre des billes (Beads) est de 0.96µm.

Ostreococcus tauri, premier du genre à avoir été découvert, est une cellule nue et coccoïde dépourvue de flagelles (Fig. 9). Avec une taille moyenne de 0,8-1,1 µm x 0,5-0,7 µm et un contenu cellulaire ADN de 33.31 fg, il correspond au plus petit eucaryote libre actuellement décrit supplantant *Nanochlorum eucaryotum* (taille 1,5 µm, ADN 60 fg/cellule), un picoeucaryote de la classe des Chlorophyceae découverte en 1982 (Wilhelm et al., 2014). Comme chez d'autres espèces des Mamiellales,

l'organisation des cellules d'*O. tauri* est minimale : elle ne possède qu'un chloroplaste et une mitochondrie (Fig. 9)

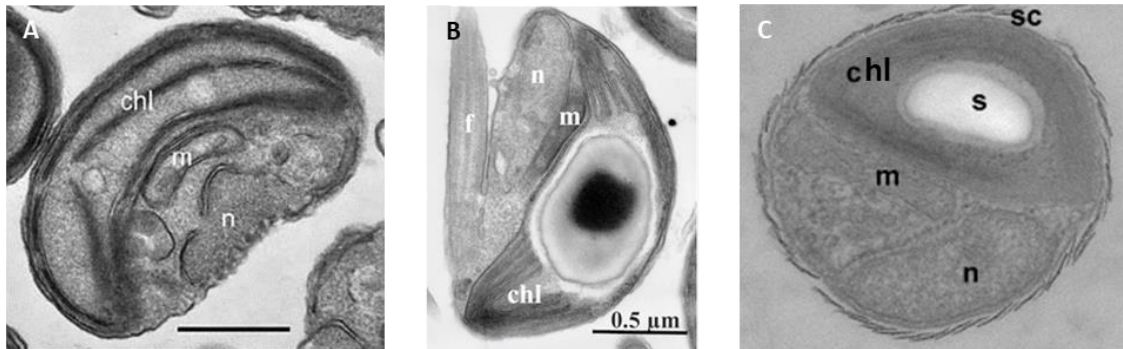


Figure 9 : Microscopie à transmission électronique (MET) d'espèces représentatives de l'ordre des Mamiellales. A. *Ostreococcus* sp. (Guillou et al., 2004) ; B. *Micromonas pusilla* (Vaulot et al., 2008) ; C. *Bathycoccus prasinos* (Moreau et al., 2012). Les sections MET révèlent les chloroplastes (chl), les noyaux (n), les mitochondries (m), le flagelle (f) de *M. pusilla* et les écailles (sc) de *B. prasinos*.

O. tauri a été classé originellement dans la classe des Prasinophyceae et proche de l'ordre des Mamiellales sur la base de ses caractéristique pigmentaires notamment l'identification de chlorophylle c-like (Mg-2,4-divinyl-phaeoporphyrin a5 monomethyl ester) et de la séquence de l'ARNr 18S. Une analyse phylogénétique moléculaire plus poussée des autres espèces/variétés du genre *Ostreococcus* ainsi que des représentants de genres proches *Micromonas* et *Bathycoccus* place à l'heure actuelle ces trois genres dans la classe des Mamiellophyceae (*classis nova*) et dans l'ordre des Mamiellales où ils prédominent (Marin and Melkonian 2010) (Fig. 9). *Micromonas pusilla*, première du genre à avoir été découverte en 1952) possède un flagelle (Fig. 9).

3.2 Importance écologique et écotypes

Les espèces des genres *Ostreococcus* et *Micromonas* sont ubiquistes et dominantes dans certaines zones. Cette ubiquité est vraisemblablement liée à une plasticité physiologique importante des picoeucaryotes (Schaum and Collins, 2014; Schaum et al., 2013). La miniaturisation des cellules eucaryotiques est en effet considérée comme un avantage écologique car elle confère un ratio surface : volume augmenté qui favorise l'absorption de nutriments dans les environnements pauvres.

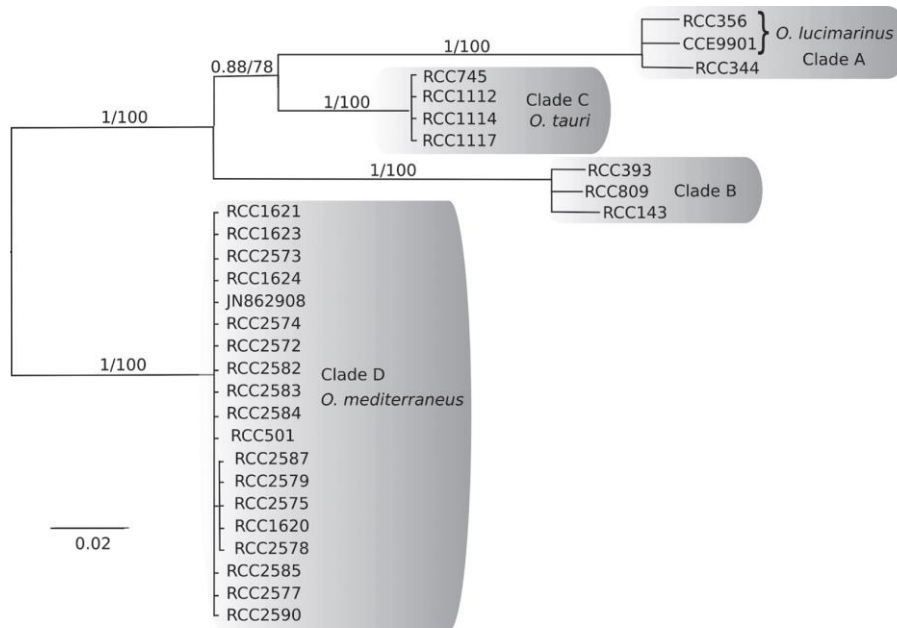


Figure 10 : Relations phylogénétiques entre les espèces des clades d'*Ostreococcus* basées sur les séquences génétiques de l'ARN ribosomal (18S ADNr ; Internal transcript spacer (ITS)1 ; 5.8S ADNr ; ITS2) (d'après Subirana et al., 2013).

Les espèces d'*Ostreococcus* de morphologies très similaires ont été isolées à partir de différents milieux aquatiques et identifiées sur la base de séquence de l'ADNr 18S et de leur caryotype. Trois espèces sont actuellement décrites : *O. tauri* isolée dans l'étang de Thau en 1994 (Chrétiennot-Dinet et al., 1995; Courties et al., 1994), *O. lucimarinus* isolée dans le Pacifique (Palenik et al., 2007) et *O. mediterraneus* récemment défini comme espèce (Subirana et al., 2013). En plus de ces espèces de surface, la souche RCC809 d'*Ostreococcus* correspond à un isolat effectué dans l'Atlantique à 100m de profondeur. En l'absence d'évidence de reproduction sexuée chez *Ostreococcus* (et Mamiellales) la notion d'espèce reste difficile à établir pour des souches ayant le même nombre de chromosomes et ne peut reposer que sur l'analyse de la phylogénie de gène. La généalogie de plusieurs gènes est nécessaire pour pouvoir définir une espèce d'un point de vue phylogénétique. Les phylogénies basées sur l'ADNr 18S révélèrent néanmoins qu'*Ostreococcus* et *Micromonas* sont répartis en plusieurs "clades" (Guillou et al., 2004) (Fig. 10) qui correspondent à différents écotypes voire à différentes espèces (Demir-Hilton et al., 2011; Rodríguez et al., 2005). Un clade correspond à un taxon monophylétique c'est à dire à un groupe phylétique regroupant un ancêtre commun et tous ses descendants. Cette notion de clade chez *Ostreococcus* repose également sur des caractéristiques éco-physiologiques : des clades différents se retrouvent rarement dans des niches identiques et des adaptations de l'appareil photosynthétique à l'irradiance ont été observées pour des représentants de différents clades. Parmi les quatre clades, le clade A est typique des eaux côtières de surface tandis que le clade B est associé aux eaux plus profondes des zones euphotiques et présente des stratégies de photo-adaptation (Cardol et al., 2008; Six et al., 2009). Les clades C et D sont des souches de surface correspondant respectivement aux espèces *O. tauri*

et *O. mediterraneus*, tous deux retrouvés dans les environnements méditerranéens. *O. tauri* et *O. lucimarinus* peuvent au contraire de RCC809 gérer de fortes irradiances (Six et al., 2009).

3.3 Propriétés du génome d'*Ostreococcus tauri*

Ostreococcus tauri possède un génome haploïde de petite taille (13 Mb), contenant de l'ordre de 7700 gènes répartis sur 20 chromosomes; il a été séquencé en 2006 (Derelle et al., 2006) et entièrement re-séquencé par illumina en 2014 (Blanc-Mathieu et al., 2014). Les caractéristiques génomiques issues de ces deux séquençages sont indiquées dans le tableau 2 et la comparaison des génomes de Mamiellales dans le tableau 3.

Tableau 2: Mise à jour des données génomiques d'*O. tauri* (Blanc-Mathieu et al., 2014)

Version	Total size (Mbp)	Nb CDS	Average gene length (bp)	Nb of genes with introns	Average intron size	Nb of TE
2006	12.5	7 890	1 290	3 186 (39%)	103	417
2013	12.9	7 699	1 387	1 440 (19%)	140	319

Tableau 3 : Caractéristiques des génomes nucléaires des Mamiellales (adapté de Moreau et al., 2012). Les caractéristiques génomiques d'*O. tauri* sont celles de Derelle 2006 et ont été complétées par un séquençage plus récent en 2014.

Family	Species	Genome size (Mb)	G+C (%)	Chromosome number	Gene number
Prasinophyceae	<i>Bathycoccus</i> sp. RCC1105	151	48	19	7,847
Prasinophyceae	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	20.9	64	17	10,286
Prasinophyceae	<i>Micromonas</i> sp. CCMP1545	21.9	65	19	10,587
Prasinophyceae	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> clade A	13.2	60	21	7,805
Prasinophyceae	<i>Ostreococcus</i> sp. RCC809 clade B	13.3	60	20	7,492
Prasinophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i> clade C	12.6	59	20	8,116

Ce génome extrêmement compact présente 81,6% de séquences codantes (densité génétique de 1,54 kb/gène et des régions intergéniques inférieures à 200 pb). On y retrouve peu de familles multigéniques, ce qui suggère une faible redondance fonctionnelle entre les gènes. Moins de 200 facteurs de transcription sont identifiés ce qui pourrait expliquer la co-régulation de clusters fonctionnels de gènes associés à des processus biologiques mis en évidence par une étude transcriptomique en cycle jour/nuit (Monnier et al., 2010). Les génomes de la mitochondrie et du chloroplaste d'*O. tauri* sont particulièrement dense avec 65 et 86 gènes codés respectivement par le génome mitochondrial et plastidial (Robbens et al., 2007). Le génome d'*O. tauri* a suscité rapidement un grand intérêt, a été, et continue à être largement étudié. Le séquençage d'espèces voisines a permis de mener des études comparatives importantes et également d'appréhender les aspects métaboliques liés au succès écologique des espèces dans certaines zones et plus globalement sur la place du picophytoplankton eucaryotes dans les systèmes océaniques.

3.4 Outils génétiques et cellulaires

Le développement de la transformation génétique stable chez *O. tauri* a permis de promouvoir cet organisme comme nouveau modèle biologique. Les vecteurs développés comprennent un vecteur permettant d'utiliser la luciférase en tant que rapporteur et un vecteur (décliné avec deux marqueurs de résistance différents) utilisant le promoteur HAPT (High Affinity Phosphate Transporter) pour exprimer en sens ou en antisens un gène d'intérêt (voir Matériel et Méthodes). Le promoteur est modulé en fonction de la concentration en phosphate dans le milieu. L'amélioration de l'efficacité de transformation a permis de découvrir que le remplacement de gène par recombinaison homologe s'effectue à haute fréquence (2 à 30 %) par la simple introduction du gène dont la phase de lecture est décalée par la cassette de résistance (Lozano *et al.* 2014). A l'époque de cette mise au point, aucun système de microalgue ne permettait d'obtenir aussi simplement le remplacement de gène au site par recombinaison homologe. Depuis, le seul système chez qui la recombinaison homologe est possible est *Nannochloropsis* (Tab. 1). La cryopréservation d'*O. tauri* a été également développée (Corellou résultats non publiés). La transformation génétique et la cryopréservation sont des méthodes délicates étroitement dépendantes des conditions de culture dont dépend la physiologie de l'organisme.

La faible redondance génétique, la compaction du génome, la simplicité de l'organisation cellulaire, la disponibilité de technique de transformation, font de cet organisme un très bon modèle pour l'étude fonctionnelle de processus complexes impliquant des réseaux de gènes. Cet organisme a permis de découvrir une horloge circadienne minimale et d'éclairer les liens entre le cycle cellulaire et l'horloge. Il est actuellement utilisé pour étudier des virus marins 'géants' et notamment le transfert de gène latéral, ainsi que de découvrir des mécanismes originaux de l'assimilation de Fer. Nous l'avons choisi pour éclairer la biologie des lipides des microalgues marines provenant de l'endosymbiose primaire.

4 Métabolisme des glycérolipides

Les glycérolipides sont les composants majoritaires des membranes biologiques. Les bases du métabolisme des glycérolipides et des acides gras chez les microalgues sont largement déduites des connaissances obtenues chez les plantes terrestres (Li-Beisson *et al.*, 2015; Mühlroth *et al.*, 2013). L'effort pour combler l'écart des connaissances est continu et de plus en plus de données permettent d'appréhender les similitudes et les divergences. Encore une fois, la diversité des microalgues est bien supérieure à celle des plantes terrestres et ce n'est qu'en étudiant plusieurs modèles que l'on peut espérer dégager éventuellement une tendance commune à ces protistes. La majorité des connaissances fonctionnelles actuelles repose essentiellement sur les trois modèles transformables *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum* et *Nannochloropsis gaditana* et sont alimentées par les autres

modèles y compris les analyses génomiques qui s'accumulent grâce au séquençage à haut débit (Misra et al., 2012).

4.1 Synthèse des acides gras

La biosynthèse des FA est une des voies primaires du métabolisme cellulaire parce qu'elle fournit la partie acide gras pour l'assemblage des acyle-lipides membranaires et des lipides de stockage (TAG) (Harwood and Guschina, 2009). Le chloroplaste est connu comme étant le site majeur de la synthèse des FA chez les plantes (Ohlrogge et al., 1979). Cette synthèse a lieu selon un système très similaire à celui des bactéries et est sans doute une fonction restante de l'ancêtre cyanobactérien du chloroplaste (White et al., 2005). La plupart des gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras ont été d'abord étudiés chez *A. thaliana* (Beisson et al., 2003) puis chez les microalgues notamment *C. reinhardtii* (Riekhof et al., 2005).

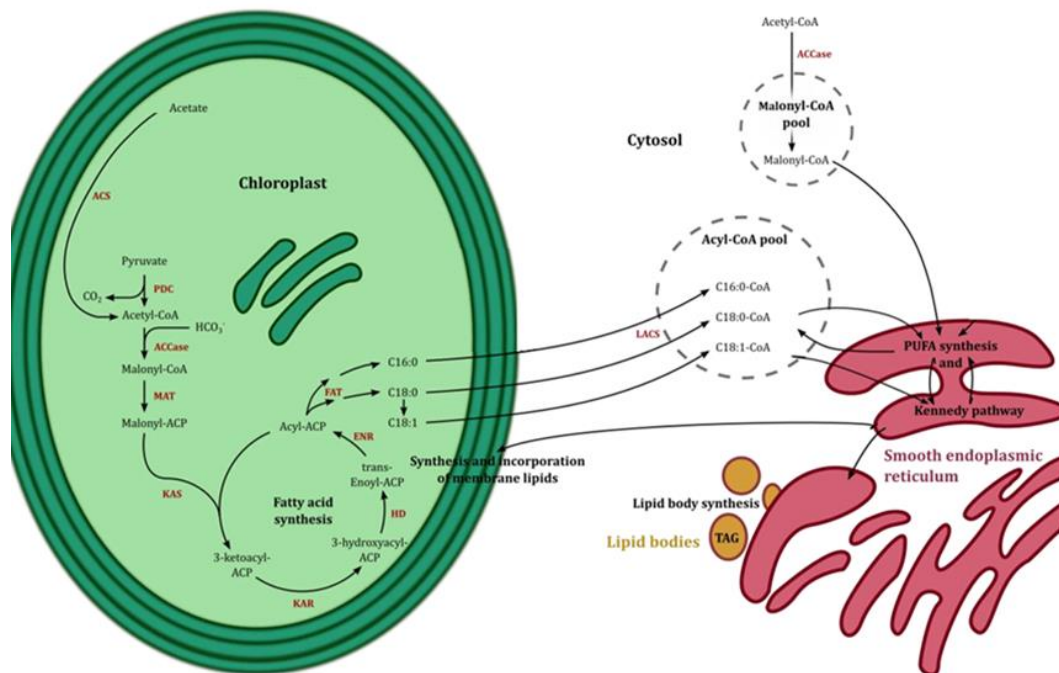


Figure 11. Présentation simplifiée de la voie de biosynthèse des acides gras et de son rôle dans la formation des PUFA et la synthèse de lipides (adapté selon Mühlroth et al., 2013).

Les enzymes impliquées sont en rouge : ACCase, acétyl-CoA carboxylase ; ENR, énoyl-ACP réductase; FAT, acide gras-ACP thioestérase; HD, 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase; KAR, 3-kétoacyl-ACP réductase; KAS, 3-kétoacyl-ACP synthase; LACS, longue chaîne acyl-CoA synthétase. Les substrats et de ces enzymes, les intermédiaires métaboliques et les produits finaux sont indiqués en noir : CoA, coenzyme A ; ACP, protéine transporteur de chaînes acyles ; PUFA, acides gras polyinsaturés ; TAG, triacylglycérols

Les chaînes acyles des glycérolipides proviennent de l'action de deux complexes enzymatiques évolutivement conservés : l'acétyl-Coenzyme A (CoA) carboxylase (ACCase) et la fatty acid synthase (FAS) (Fig. 11). L'ACCase plastidiale est une enzyme multimérique dissociable de type procaryotique (Cronan and Waldrop, 2002; Sato and Moriyama, 2007) qui catalyse de manière ATP dépendante la formation du malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA (Harwood, 1996, 2005). Cette étape est la voie

d'entrée dans la synthèse des FA et est considérée comme limitante dans la biosynthèse des acides gras (Reverdatto et al., 1999). Pourtant, l'augmentation de l'expression du gène *ACCI*, de l'ACCase plastidiale, chez les diatomées *Cyclotella cryptica* et *Navicula saprophila* n'engendre pas d'augmentation du contenu en FA. Cela indique que les processus de régulation de la synthèse des FA ne repose pas sur la simple activation transcriptionnelle de cette étape la plus en amont (Dunahay et al., 1996; Radakovits et al., 2012). Le malonyl-ACP (pour Acyl carrier protein) est le principal substrat du complexe multienzymatique de type procaryotique FASII et fournit des unités de deux carbones à chaque cycle du processus itératif de la synthèse des FA. A chaque itération, quatre réactions enzymatiques sont nécessaires (pour revue Li-Beisson et al., 2010). La première réaction est réalisée par une 3-ketoacyl-ACP synthase (KAS). KAS III condense un malonyl-ACP avec un acétyl-ACP, KAS I catalyse les réactions de synthèse de C4 à C16, enfin KAS II synthétise le 18:0-ACP à partir du 16:0-ACP (Pidkowich et al., 2007). Après la condensation du malonyl-ACP, trois étapes de réduction, déshydratation puis réduction se succèdent et terminent le cycle (Fig. 11). Les produits finaux sont généralement le 16:0-ACP et le 18:0-ACP (Ohlrogge et Browse 1995 ds Li. 2013). Les acyl-ACP sont les substrats d'acyl-ACP thioestérase (TE) qui génèrent des FA libres et terminent ainsi le cycle d'élongation (Ohlrogge and Browse, 1995). Les interactions entre KASII, la désaturase $\Delta 9$ et ces thioestérases sont déterminantes pour réguler la production des FA et leur export hors du plaste (Voelker and Kinney, 2001).

Les acides gras sous forme libre forment un pool marginal en raison de leur toxicité pour la cellule et de leur temps de demi-vie court. Ils sont rapidement exportés vers le RE et des études récentes tendent à favoriser un transport actif des acides gras libres du stroma du chloroplaste vers l'espace intermembranaire par le transporteur FAX1 (Li et al., 2015, 2016b). Les longues chaînes acyl-CoA synthétases (LACS) de la famille des acyl-CoA ligases participent à l'export des FA en activant les FA libres sous forme d'acyl-CoA (Fan et al., 2011; Mashek et al., 2007). L'import des acyl-CoA dans le réticulum fait intervenir des transporteurs ABC : la protéine membranaire ABC9A est impliquée dans l'import des acides gras dans le réticulum endoplasmique (Kim et al., 2013).

4.2 Synthèse des glycérolipides

Les voies de synthèse des glycérolipides canoniques sont présumées être conservées entre les plantes supérieures et les microalgues (Li-Beisson et al., 2015; Mühlroth et al., 2013). Les glycérolipides synthétisés dans le RE ainsi que dans le chloroplaste font intervenir des acyl-transférases responsables de l'acylation des précurseurs de lipides (synthèse *de novo*) et des lipides eux-mêmes (modification des chaînes acyles des lipides par l'action conjointe de lipases), puis des enzymes responsables de l'élaboration de la tête des lipides.

4.2.1 Acyl-transférases impliquées dans la synthèse *de novo* des glycérolipides

Tout d'abord une glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) plastidiale ou endoplasmique ajoute sur le glycérol-3-phosphate (G3P) un acide gras provenant du pool d'acyl-CoA cytosolique ou du pool d'acyl-ACP chloroplastique (Fig. 12). Cette acylation spécifiquement en position *sn*-1 du G3P génère de l'acide lysophosphatidique (LPA). La position *sn*-2 du squelette glycérol du LPA est ensuite acylée par une acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT) pour former l'acide phosphatidique (PA) (Fig. 12). Il a été montré chez plusieurs espèces de plantes terrestres, dont *A. thaliana*, que les acyltransférases impliquées dans la synthèse *de novo* des lipides membranaires et des DAG précurseurs de TAG ont une spécificité de substrats (acyl-donneur et acyl-receveur) différente selon leur localisation (Tab. 3).

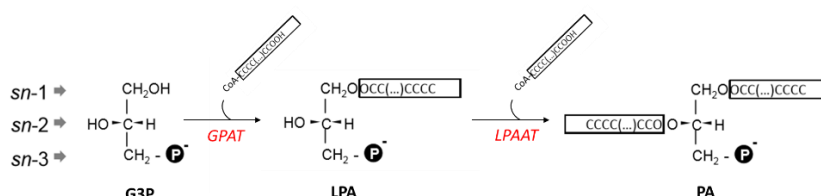


Figure 12 : Biosynthèse de l'acide phosphatidique (PA).

Les acyl-transférases glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT) estérifient spécifiquement les positions *sn*-1 et *sn*-2 du squelette du glycérol-3-phosphate (G3P) respectivement pour former successivement le lyso-PA puis le PA

Enzyme	Plastids	Microsomes
GPAT		
acyl acceptor	G3P	G3P
acyl donor	acyl-ACP	acyl-CoA
FA selectivity	18:1 ≥ 16:0, 18:0	16:0 > 18:1 > 18:0
LPAAT		
acyl acceptor	1-16:0-G3P = 1-18:1-G3P	1-18:1-G3P > 1-16:0-G3P
acyl donor	acyl-ACP	acyl-CoA
FA selectivity	16:0 > 18:1, 18:0	18:1 > 16:0 > 18:0

Tableau 3 : Comparaison des propriétés des GPAT et LPAAT plastidiales et microsomaux impliquées dans la synthèse des lipides membranaires (d'après Frentzen, 1998).

Abréviations : G3P : *sn*-glycerol-3-phosphate; FA ; acide gras

Ce sont des expériences de marquage radioactif sur des fractions membranaires subcellulaires qui ont permis de démontrer que dans les chloroplastes des plantes les GPAT possèdent une sélectivité plus ou moins marquée pour les chaînes acyles 18:1, tandis que les LPAAT (LPAAT de type 1) dirigent exclusivement des 16:0 en position *sn*-2 du glycérol (Frentzen et al., 1983) (Tab. 3). A l'inverse, les GPAT microsomaux de plante ont une modeste préférence pour le 16:0 et les LPAAT microsomaux (LPAAT de type 2) présentent une forte sélectivité pour le 18:1 en tant qu'acyl-donneur mais également estérifié au G3P soit en tant qu'acyl-accepteur (Tab. 3). Des spécificités prononcées des LPAAT résultent qu'un FA en C16 en *sn*-2 est la signature d'une synthèse dans le chloroplaste (voie procaryotique) tandis qu'un C18:X en *sn*-2 est la marque d'une synthèse dans le RE (voie eucaryotique ou Kennedy) (Fig. 12). Basé sur cette distinction entre lipides plastidiaux et microsomaux, il a été démontré que le transfert de squelette glycérol, vraisemblablement via la PC, du RE au chloroplaste a lieu chez les plantes dites plantes en C18:3, conférant aux galactolipides une signature microsomale

(18:3 en *sn*-2) ; ces plantes sont dépourvues de PAP phosphatase chloroplastique contrairement aux plantes en C16:3 dont les galactolipides sont aussi bien d'origine procaryotique (16:3 en *sn*-2) qu'eucaryotique (Fig. 13) (Somerville and Browse, 1991).

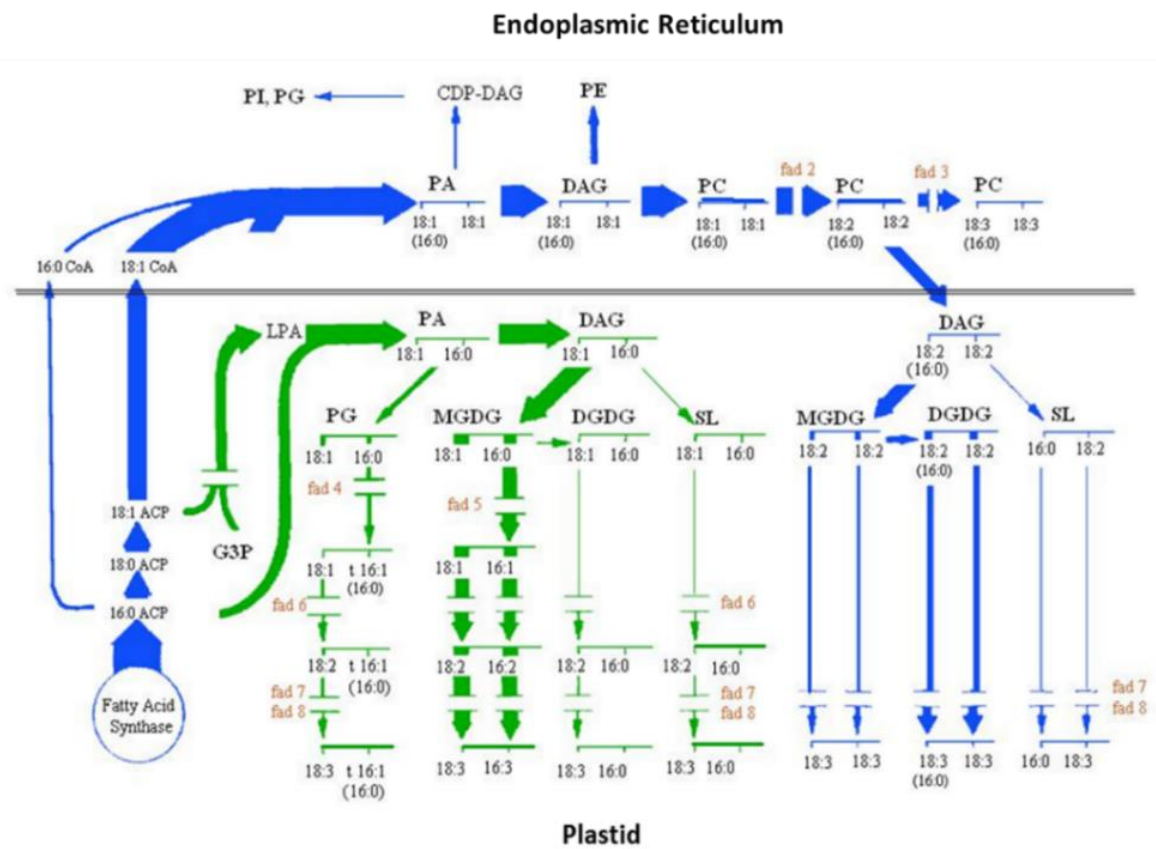


Figure 13. Voie de synthèse des glycérolipides chez *Arabidopsis thaliana* (Somerville and Browse, 1991)
 Les sélectivités de chaînes acyles des LPAAT plastidiales et microsomales confèrent aux lipides de la voie dite procaryotique (en vert) et de la voie eucaryotique (en bleu) un acide gras en *sn*-2 respectivement en C16 ou en C18:X.

Chez *A. thaliana*, 10 gènes de GPAT (*ATSI* et *GPAT1-9*) et 6 gènes de LPAAT sont annotés. *ATSI*, correspond à la GPAT soluble et plastidiale assumant la synthèse des lipides plastidiaux et *GPAT9*, codant une GPAT membranaire et microsomale, a récemment été identifiée comme le meilleur candidat pour assumer la même fonction dans le RE (Kunst et al., 1988; Singer et al., 2016). Parmi les LPAAT qui sont toutes membranaires, on distingue la LPAAT1 qui est la seule LPAAT plastidiale et la LPAAT2 qui est dans le RE et ubiquiste. Les autres LPAAT ont des expressions tissus-spécifiques. Récemment, une LPAAT soluble a été identifiée chez *A. thaliana* (Ghosh et al., 2009; Misra et al., 2014). Cette LPAAT soluble est plastidiale et possède *in vitro* une large spécificité pour les donneur d'acyl-CoA incluant le 16:0-CoA (Ghosh et al., 2009).

Par analyse génomique un seul gène de GPAT a été identifié chez *O. tauri*, *C. reinhardtii*, *Chlorella sp.* et *P. tricornutum* (Fig. 14) (Misra et al., 2012, 2014; Zienkiewicz et al., 2016) mais par alignement de séquence, nous retrouvons deux séquences pouvant correspondre à des GPAT chez *O. tauri*

(communication F. Corellou) : la séquence de GPAT annotée comme GPAT chloroplastique, (CAL52024.1) prise en compte dans la littérature (Ouyang et al., 2016) et une séquence supplémentaire (CEG00561.1) annotée comme une phospholipide/glycérol acyltransférase de forte homologie avec les GPAT de type 3 et la GAPT9 d'*A. thaliana* (plus de 50% d'identité pour une couverture de séquence supérieur à 80%).

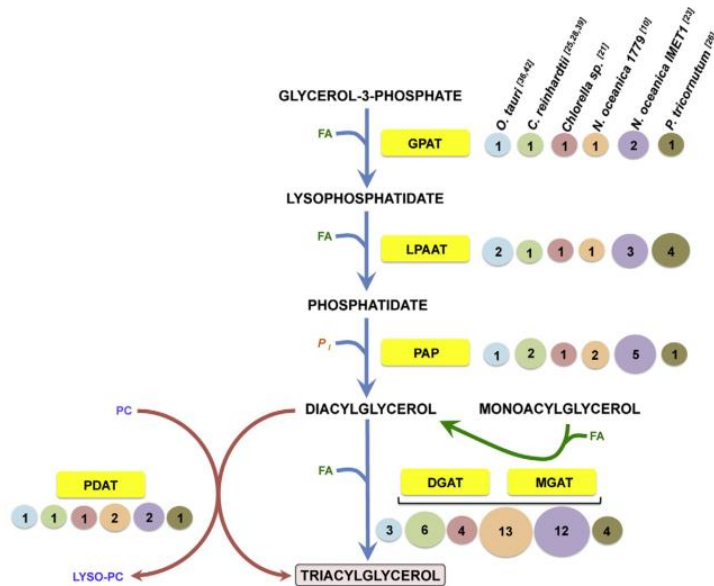


Figure 14 : Nombres de gènes prédicts impliqués dans la voie de biosynthèse des TAG chez les microalgues modèles (Zienkiewicz et al., 2016).

Chez *O. tauri* le nombre de gènes identifiés GPAT est de deux et de LPAAT est de un (voir texte principal).

Etonnamment, chez les microalgues, les analyses génomiques n'identifient pas de LPAAT de type 2 (RE) mais des homologues de LPAAT de type 1 (chloroplastique), et mettent en évidence l'ubiquité d'un seul gène homologue de LPAAT soluble récemment identifié chez *A. thaliana* (Misra et al., 2014). Chez *O. tauri* un seul gène de LPAAT1 est identifié (après vérification par nos soins et contrairement à la figure 14). Au contraire, l'espèce oléagineuse *N. oceanica* et la diatomée *P. tricornutum* possèdent selon les sources de cette revue respectivement 3 et 4 gènes codant des homologues de LPAAT (Zienkiewicz et al., 2016) (Fig. 14). Chez les microalgues la spécificité de substrat de ces enzymes n'a pas été étudiée à l'exception de la LPAAT1 plastidiale chez *C. reinhardtii* qui, *in vitro*, préfère le 16:0 acyl-CoA au 18:1 acyl-CoA (Yamaoka et al., 2016).

4.2.2 Synthèse des têtes polaires des glycérolipides

Le PA permet la synthèse de DAG et de cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG) qui servent de précurseurs à la synthèse de tous les glycérolipides (Fig. 13 et 15). La composition en acides gras aux positions *sn-1* et *sn-2* de leur squelette glycérol reflète donc l'origine plastidiale ou endoplasmique du PA utilisé initialement pour leur synthèse.

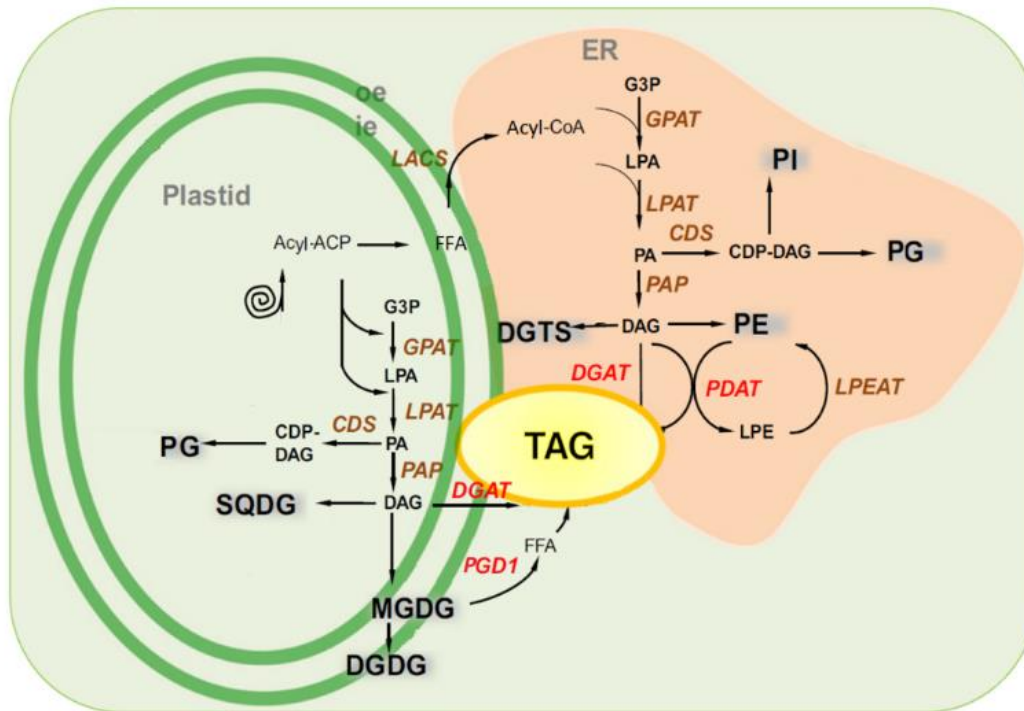


Figure 15 : Biosynthèse de novo des lipides chez l'algue verte *C. reinhardtii* (adapté d'après Goncalves et al., 2016; Li-Beisson et al., 2015)

Le DAG sert de précurseurs aux lipides plastidiaux : SQDG, MGDG (MGDG → DGDG) et aux lipides du RE : PE et DGTS absent chez *A. thaliana* et remplacé par la PC chez *A. thaliana* (Harwood and Guschina, 2009; Ohlrogge and Browse, 1995; Thompson, 1996). Le CDP-DAG permet la synthèse du PG (Andrews and Mudd, 1985) et de PI (et PS absente chez *C. reinhardtii* mais présente chez les plantes) qui sont minoritaires (Ohlrogge and Browse, 1995). Par souci de clarté pour le lecteur, les voies de biosynthèse de lipides ne sont pas détaillées. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de lipides structuraux et celles impliquées dans la biosynthèse des TAG sont respectivement indiquées en marron et en rouge. Abréviations : GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransferase, LPAT : lysophosphatidic acid acyltransferase, PAP : acide phosphatase, CDS : cytidine diphosphate-diacylglycérol synthase, LPEAT : lyso-phosphatidyléthanolamine acyltransferase, DGAT : diacylglycérol acyltransferase, PDAT : Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, PGD1 :

Le DAG synthétisé *de novo* est la forme déphosphorylée du PA et est obtenue par l'action d'une phosphatidic acid phosphatase (PAP) qui enlève le groupement phosphate en position *sn*-3 (Fig. 12 et 15). Le CDP-DAG est synthétisé grâce à l'action d'une CTP phosphatidate cytidyltransferase ou CDP-DAG synthase (CDS) qui catalyse la réaction entre les molécules de PA et CTP pour former du CDP-DAG et du pyrophosphate (Fig. 15).

4.2.2.1 Glycérolipides plastidiaux

Les principales voies de synthèse des lipides plastidiaux (MGDG, DGDG, SQDG et PG) seraient conservées entre *A. thaliana* et *C. reinhardtii* (Li-Beisson et al., 2015). Cependant contrairement aux plantes, la voie de biosynthèse de ces lipides plastidiaux chez *C. reinhardtii* est supposée autonome car aucun d'entre eux ne possèdent la signature *sn*-2 C18 retrouvée chez les lipides extraplastidiaux de *C. reinhardtii* (Giroud et al., 1988; Harwood and Guschina, 2009; Li-Beisson et al., 2015).

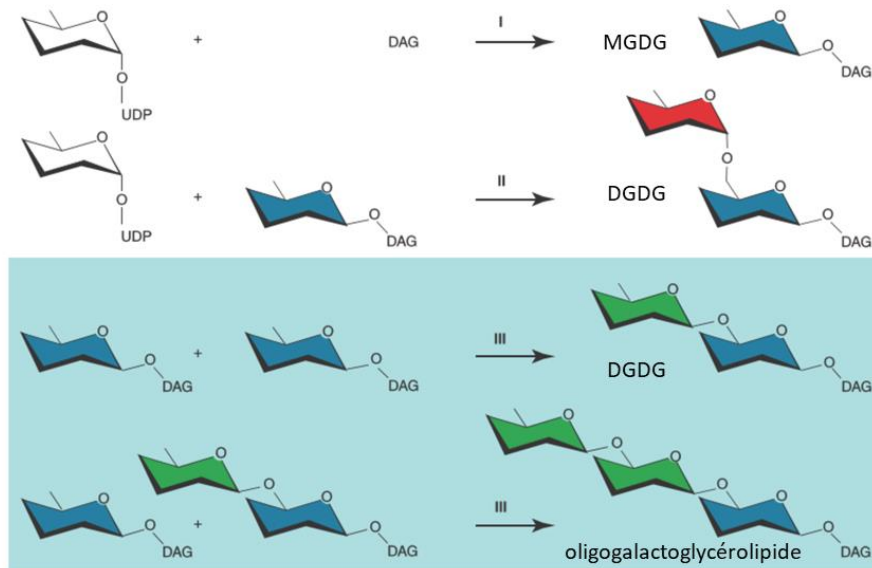


Figure 16 : Biosynthèse des galactolipides et remodelage chez *Arabidopsis thaliana* (Moellering and Benning, 2011). La voie dépendante de l'UDP-Gal (fond blanc) est initiée par les MGDG synthases (I) MGDG2/3 pour former le MGDG qui est ensuite utilisé comme substrat par les DGDG synthases (II) DGD1/2. Les galactoses du DGDG sont en conformation α et β . La voie indépendante de l'UDP-Gal (fond bleu) résulte d'un transfert d'un galactose d'un MGDG à un MGDG ou un DGDG par la GGT(III). Les produits des transglycosylation sont du DAG et DGDG ou un oligogalactoglycérolipide selon le substrat accepteur. Les galactoses du DGDG issu de cette réaction sont en conformation β par l'activité processive la GGT produit des oligogalactoglycérolipides tri- et tétragalacto-DAG. Les parties galactosyles des galactolipides sont colorées en fonction de leur origine biosynthétique et de l'anométrie de leur carbone de liaison : bleu, MGD1/MGD2/MGD3 [Gal β (1-3) *sn*-glycérol] ; rouge, DGD1/DGD2 [Gal α (1-6)Gal] ; et vert, GGT [Gal β (1-6)_n Gal]

Le MGDG est synthétisé dans l'enveloppe du chloroplaste par l'action d'une MGDG-synthase (MGDS, codée par *MGD1* ou *MGD2/3*) qui transfère le groupement galactose (Gal) d'un UDP-Gal sur un DAG (Awai et al., 2001) (Fig. 16). Le MGDG peut à son tour servir de substrat à une DGDG-synthase (DGDS, codée par *DGD1* ou *DGDG2*) qui lui transfère un galactose provenant d'un UDP-Gal et forme ainsi du DGDG. MGD2/3 et DGD2 composent une voie alternative UDP-Gal-dépendante induite chez *A. thaliana* en carence phosphate (Fig. 16). Une autre voie non dépendante de l'UDP-Gal identifiée chez *A. thaliana* permet de synthétiser le DGDG à partir de deux molécules de galactolipides via l'action de la galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (GGGT), une protéine de la famille des glycosyl-hydrolase de type 1, codée par le gène *SENSITIVE TO FREEZING (SFR2)* (Moellering et al., 2010). Les co-produits de cette réaction sont des DAG assimilées à des précurseurs de TAG (Fig. 16). Cette voie particulière est activée lors du gel (Fourrier et al., 2008; Thorlby et al., 2004) et de traitement à l'ozone (Sakaki et al., 1990a, 1990b).

Le MGDG et le DGDG sont les lipides structuraux dominants des membranes photosynthétiques des thylakoïdes. En fonction de la quantité de protéines dans les membranes, le ratio de ces galactolipides est important pour la stabilisation des bicouches et leur fonctionnement. En effet, la tête polaire du MGDG, relativement petite et fréquemment associée à 2 PUFA lui confère une structure conique qui a tendance à déstabiliser les bicouches (Lee, 2000). Ainsi l'augmentation de la proportion de MGDG hautement insaturé peut augmenter la courbature des membranes thylacoïdales des microalgues sous

différentes conditions environnementales (Khozin-Goldberg, 2016). A l'opposé, le DGDG est un lipide capable de former des bicouches, comme la plupart des phospholipides, en absence de protéines (Khozin-Goldberg, 2016; Lee, 2000; Li-Beisson et al., 2015). Chez *A. thaliana*, il a été démontré qu'en carence phosphate le DGDG est exporté hors des chloroplastes et remplace, dans la membrane plasmique et celle d'autres organelles, les phospholipides qui sont dégradés pour fournir du phosphate (Flügge et al., 2003; Härtel et al., 2000; Jouhet et al., 2004). Chez *A. thaliana*, le DGDG exporté a une combinaison en FA particulière ressemblant à celle des phospholipides extraplastidiaux (Li-Beisson et al., 2010).

La synthèse du SQDG à partir du DAG a été élucidée chez *A. thaliana* (Essigmann et al., 1998; Somerville et al., 2000), et chez les microalgues vertes (*C. reinhardtii*) grâce à des approches biochimiques de radiomarquage et génétiques par l'utilisation de mutant (Riekhof et al., 2003). Via l'action de deux enzymes SQD1 et SQD2, le SQDG est assemblé dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste (Benning, 2008).

Le PG est majoritairement retrouvé dans les thylakoïdes du chloroplaste (Block et al., 1983) même s'il peut être retrouvé dans les membranes extraplastidiales du RE et de la mitochondrie ou de la membrane plasmique (Dörmann, 2005; Khozin-Goldberg, 2016; Xu et al., 2002). La synthèse du PG est proposée être présente dans les trois compartiments (plaste, mitochondrie et RE) et fait intervenir le précurseur CPG-DAG issu du PA (Wada and Murata, 2007). La charge anionique du PG ainsi que sa distribution asymétrique au niveau des thylakoïdes (Unitt and Harwood, 1985) contribuent à maintenir un potentiel électrique au niveau des membranes qui régule la circulation d'électrons et par là même la photosynthèse. Le PG du chloroplaste est caractérisé par l'importante fréquence de la présence de l'acide gras 16:1^{Δ3trans}, uniquement en position *sn*-2. Cette espèce moléculaire du PG est impliquée dans le maintien de la photosynthèse (McCourt et al., 1985; Siegenthaler and Trémolières, 1998).

Comme le PG, le SQDG est chargé négativement grâce au groupe sulfoquinovosyl composant sa tête polaire. Lors d'une carence en phosphate, la tête polaire du PG est recyclée par la cellule et sa perte est compensée par le SQDG jusqu'à un certain degré (Yu and Benning, 2003; Yu et al., 2002).

4.2.2.2 *Glycérolipides extraplastidiaux*

PC, PE d'une part et PI, PS de l'autre, sont respectivement les composants majoritaires et minoritaires des membranes cellulaires extraplastidiales des plantes. Chez les microalgues, les bêtaine-lipides, dépourvus de phosphate, sont largement répandus et remplacent soit partiellement soit complètement les phospholipides dans les membranes extraplastidiales (Khozin-Goldberg, 2016).

Chez les plantes, plusieurs voies de formation permettent la synthèse de la PE. La voie majoritaire utilise la sérine (Fig. 17) tandis qu'une voie minoritaire passe par la décarboxylation de la tête polaire de la PS

(Rontein et al., 2001; Voelker, 1997). Chez *C. reinhardtii*, en absence de PS, la PE est uniquement synthétisée par la première voie à partir de la sérine (Sato et al., 2016). La CTP:phosphoéthanolamine cytidyltransférase de *C. reinhardtii* a été caractérisée biochimiquement en l'exprimant chez *E. coli* (Yang et al., 2004).

La PC peut être synthétisée par trois voies différentes chez les plantes. La première voie de formation *de novo* de la PC est initiée par la choline et est similaire à la voie de biosynthèse de la PE avec qui elle partage l'enzyme aminoalcool phosphotransférase (AAPT). Cette dernière ne semble pas avoir de préférence moléculaire pour l'un ou l'autre de ses substrats (Hocquellet et al., 2005; Khozin-Goldberg, 2016) (Fig. 17). La seconde est spécifique des végétaux et est la voie de synthèse principale chez les plantes. Elle passe par un intermédiaire de la voie de la synthèse de la PE et implique les phosphoéthanolamine méthyltransférases (PEAMT) (Fig. 17). La dernière voie fait intervenir des phosphatidyléthanolamine N-métyltransférases (PLMT) (Fig. 17). Chez les plantes la PC sert à la fois de lipide structural des membranes et aussi d'intermédiaire central pour la génération de la diversité des chaînes acyles et la synthèse des TAG (Introduction, §4.4). Chez *C. reinhardtii*, la PC n'est pas produite notamment du fait de l'absence de gènes codant notamment la PEAMT (Sakurai et al., 2014). Chez *O. tauri*, les gènes nécessaires à la synthèse de PC sont également absents (Sato et al., 2016).

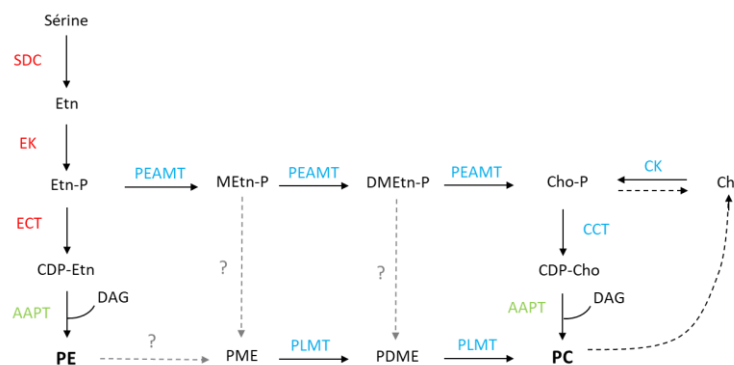


Figure 17 : Voies de biosynthèse des têtes polaires de la PE (rouge) et de la PC (bleu) chez *A. thaliana thaliana* (adapté de Khozin-Goldberg, 2016; Sato et al., 2016).

La choline (Cho) est obtenue chez les plantes par déphosphorylation de la phosphocholine (P-Cho) ou recyclage de la tête polaire de la PC (flèches pointillées noires) et l'éthanolamine (Etn) est obtenue par décarboxylation d'une sérine par la sérine décarboxylase (SDC). La Cho et de l'Etn sont phosphorylées par l'action respective d'une choline kinase (CK) et d'une éthanolamine kinase (EK) (Dykes et al., 1976). A partir de la phosphocholine (Cho-P) et phosphoéthanolamine (Etn-P), les activités séquentielles de la cholinephosphate cytidylyltransférase (CCT) et de l'éthanolaminephosphate cytidylyltransférase (ECT) forment respectivement la cytidine 5'-diphosphate (CDP) Cho et CDP-Etn. Celles-ci réagissent avec un 1,2-DAG pour former respectivement de la PC ou de la PE grâce à l'action de l'ainoalcool phosphotransférase (AAPT). L'Etn-P, intermédiaire de la synthèse de la PE, peut subir trois méthylations successives par des phosphoéthanolamine méthyltransférases (PEAMT) et donner de la Cho-P (Eastmond et al., 2010). La phosphatidylmonométhyléthanolamine (PME) peut être méthyliée par des phosphatidyléthanolamine N-métyltransférases (PLMT) formant de la PC par l'ajout de 2 groupements méthyles supplémentaires (BeGora et al., 2010; Keogh et al., 2009). Les intermédiaires de la première voie, catalysés par les PEAMT, pourraient également être utilisés comme substrats dans la voie catalysée par les PLMT mais les enzymes réalisant cet échange sont inconnues (Tasseva et al., 2004) (flèches pointillées grises).

C. reinhardtii contient du DGTS, un bétaine-lipide donc un lipide dépourvu de phosphate (Riekhof et al., 2005). Il est supposé que les similarités structurales des BL et des PL (Fig. 18) permettraient aux BL d'avoir des fonctions similaires au PL. Il a été démontré que les BL remplacent les PL dans les

membranes de divers microorganismes en carence phosphate (Hofmann and Eichenberger, 1996; Khozin-Goldberg and Cohen, 2006; Riekhof et al., 2014; Van Mooy et al., 2009). La synthèse du DGTS, identifiée initialement chez la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* relève de l'activité enzymatique de deux protéines indépendantes : une *S*-adénylméthionine:diacylglycérol 3-amino-3-carboxypropyl transférase (codée par *BtaA*) et une *S*-adénylméthionine-dépendent *N*-méthyltransférase (codée par *BatB*) qui ensemble catalysent le transfert de trois groupes 3-amino-3-carboxypropyl de la *S*-adénylméthionine à la tête polaire du DGTS (Hofmann and Eichenberger, 1996; Klug and Benning, 2001). Chez les microalgues, ces deux activités indépendantes sont prises en charge par une enzyme bi-fonctionnelle, la betaine-lipide synthase codée par le gène *BTA1* et caractérisée chez *C. reinhardtii* (Riekhof et al., 2005) (Fig. 18).

Parmi les différentes classes de BL, le DGTS et le DGTA ne diffèrent que par la position d'un groupement carboxyle sur la tête polaire (isomères) (Fig. 3). Le DGTS est le précurseur présumé de la biosynthèse du DGTA qui serait issu de la décarboxylation puis recarboxylation du DGTS (Vogel and Eichenberger, 1992).

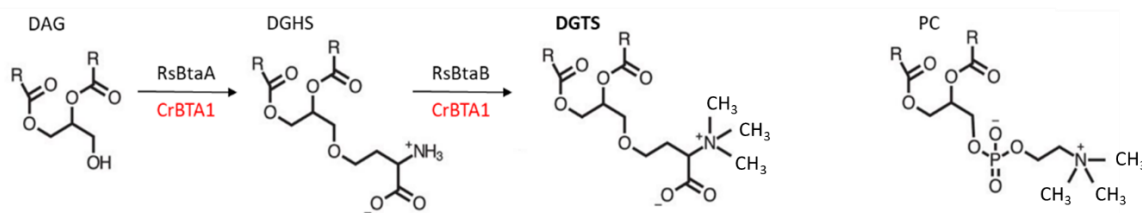


Figure 18 : Schéma réactionnel de la biosynthèse du DGTS déterminé chez *Rhodobacter sphaeroides* et *C. reinhardtii* (adapté de Riekhof et al., 2005).

Les réactions bactériennes (noir) sont menées par deux protéines individuelles BtaA et BtaB lors de carence P, tandis que *Chlamydomonas* (rouge) exprime constitutivement la protéine BTA1 qui est une fusion des domaines BtaA-like et BtaB-like. La structure de La PC est montrée pour comparaison avec le DGTS illustrant leur similarité structurelle. Abréviation : DGHS, diacylglycérylhomosérine

La co-occurrence des PL et des BL est variable selon les espèces avec, par exemple, la présence de PC et DGTS chez les espèces de *Dunaliella* et *Chlorella*, et la seule présence de DGTS chez *C. reinhardtii* (Dembitsky, 1996). La distribution des trois BL DGTS, DGTA et DGCC parmi les microalgues est variable: certaines ne contiennent que du DGTA (*Rhodomonas baltica*), du DGTS (*Picochlorum atomus*), du DGCC (*Chaetoceros gracilis*) alors que d'autres présentent en combinaison du DGTS et du DGTA (*Ochromonas. danica*), ou bien du DGTS et du DGCC (*Thalassiosira pseudonana*) ou encore du DGCC et du DGTA (*Pavlova lutheri*) (Cañavate et al., 2016; Eichenberger and Gribi, 1997; Vogel and Eichenberger, 1992). Enfin, *Diacronema vlkianum* est la seule microalgue pour laquelle la présence simultanée des trois BL a été rapportée (Armada et al., 2013). Des études utilisant des radiomarquages (oléate et acétate) en conjonction avec une analyse positionnelle des chaînes acyles des lipides, chez *P. lutheri* et chez *O. danica*, ont montré respectivement que le DGCC et le DGTS jouent le rôle d'accepteurs primaires de FA néosynthétisés et permettraient leur édition et leur redistribution à d'autres

lipides (Eichenberger and Gribo, 1997; Vogel and Eichenberger, 1992). Le DGTA qui est de manière générale, le plus insaturé de tous les BL, serait chez *O. danica* issu de la conversion du DGTS (espèces majoritaires 14:0/18:1 et 14:0/18:2) en DGTA à partir duquel les modifications des chaînes acyles conduisent aux espèces comprenant majoritairement du 22:5. De manière similaire, chez *P. lutheri*, le DGCC riche en C20:5 transfère ce FA au DGTA qui est hautement enrichi en 22:6. Le transfert de radioactivité du 18:1 au 22:6 observé sur le DGTA indique, de surcroît, que le DGTA est également un substrat pour les désaturases intervenant dans la conversion de l'oléate-DGTA au DHA-DGTA. Par ailleurs, chez cette même espèce, les acides gras du DGCC, qui sont allongés et désaturés jusqu'au 20:5, servent également à la biosynthèse du MGDG. L'ensemble de ces données indiquent que le DGTA est l'accepteur de VLC-PUFA voire même le substrat utilisé pour leur synthèse. (Armada et al., 2013; Cañavate et al., 2016; Dembitsky, 1996; Eichenberger and Gribo, 1997; Vogel and Eichenberger, 1992)

4.3 Edition des chaînes acyles

Comme chez la levure, la PC des plantes est le siège d'un renouvellement actif des chaînes acyles qui fait intervenir des réactions de dé-acétylation de la PC et ré-acétylation de la lyso-PC (LPC). Ce cycle, appelé cycle de Land, permet de diversifier les espèces de PC et d'alimenter la PC en chaîne acyles néosynthétisées qui sont ensuite modifiées notamment par désaturation préférentiellement en position *sn*-2 et sont utilisées pour la production de TAG dans les graines de plantes (Fig. 19).

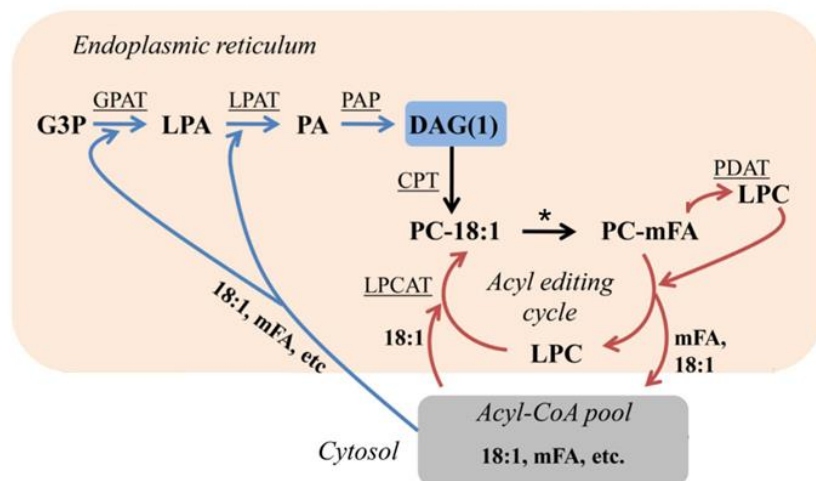


Figure 19 : L'édition des chaînes acyles chez *A. thaliana* génère de la PC porteuse d'acide gras modifiés (mFA) pour la synthèse de DAG/ TAG de novo (Bates 2012).

Les flèches bleues indiquent les réactions impliquées dans la synthèse de DAG (1) *de novo*. Les flèches rouges indiquent les réactions impliquées dans l'édition des acides gras. Abréviations de substrat : DAG, diacylglycérol ; G3P, glycérol-3-phosphate ; LPA, lyso-acide phosphatidique ; LPC, lyso-phosphatidylcholine ; mFA, acide gras modifié ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; TAG, triacylglycérol. Les enzymes sont soulignées : CPT, CDP-choline:DAG cholinephosphotransférase ; DGAT, acyl-CoA:DAG acyltransférase ; GPAT, acyl-CoA:G3P acyltransférase ; LPAT, acyl-CoA:LPA acyltransférase ; LPCAT, acyl-CoA:LPC acyltransférase ; PAP, PA phosphatase ; PDAT, phospholipide:DAG acyltransférase. L'étoile (*) correspond aux modifications des acides gras estérifiés à la PC.

Le cycle de Lands débute par la libération de chaîne acyles en position *sn*-2 de la PC générant la LPC. La phospholipase A2 a été initialement proposée être à l'origine de la formation de LPC qui réacylée par l'acyl-CoA : lysophosphatidylcholine acyl-transférase (LPCAT) pour donner une nouvelle espèce de PC; depuis, chez les graines de plantes, d'autres activités enzymatiques ont été caractérisées comme pouvant intervenir dans la production de LPC. Ces activités comprennent en plus des phospholipases, l'activité inverse de la LPCAT (Lager et al., 2013; Stymne and Stobart, 1984), ou (2) d'une phospholipase (Bafor et al., 1991; Bates and Browse, 2012; Chen et al., 2011) ou encore (3) de l'activité de la phospholipase:diacylglycérol acyltransférase (PDAT) qui intervient lors de la formation de TAG (Banaś et al., 2013). La ré-estérification de la lyso-PC (LPC) par la LPCAT ou potentiellement la lysophosphatidylcholine transacylase (LPCT) (Lager et al., 2013, 2015), régénère la PC et complète le cycle de Lands. Cet événement ne conduit pas à une synthèse nette de PC, mais il permet d'enrichir le pool d'acyl-CoA en FA modifiés (Fig. 19). Sous forme acyl-CoA, la chaîne des acide gras peut également être allongée par des élongases. Chez les microalgues aucune évidence d'édition des acides gras n'a été démontrée.

4.4 Synthèse des TAG

Les TAG servent de plateforme de stockage d'énergie et de FA pour les lipides structuraux. Après avoir été synthétisés, les TAG sont déposés dans des structures sphériques : les gouttelettes lipidiques. Ces gouttelettes sont localisées dans le cytoplasme et éventuellement le chloroplaste (plastoglobules) (Zienkiewicz et al., 2016) et s'accumulent notamment en condition de stress (carence, température, intensité lumineuse). Des études récentes sur les microalgues (notamment *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana* et *Phaeodactylum tricornutum*) ont montré l'existence de mécanismes distincts permettant l'accumulation des TAG. Plusieurs voies enzymatiques sous-tendent ces mécanismes complexes. Chez les microalgues, la présence de gènes homologues à ceux impliqués dans la synthèse de TAG chez les plantes, complétée par des approches expérimentales, a permis d'éclairer les mécanismes de biosynthèse des TAG dont certains mettent en évidence des spécificités par rapport aux plantes. Une spécificité majeure est la contribution majeure de la voie chloroplastique de la synthèse des TAG qui a initialement mise en évidence chez *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011).

4.4.1 Origine des DAG

Présente chez les plantes (Bates and Browse, 2012) et les microalgues (Zienkiewicz et al., 2016), la voie canonique de la synthèse des TAG dans le RE est issue de la synthèse des DAG *de novo* selon la voie Kennedy. L'acylation du DAG en position *sn*-3 forme le TAG *de novo* (Fig. 20). Les DAG précurseurs des TAG peuvent également avoir une autre origine que celle des DAG synthétisés par la voie du G3P. En effet certains DAG sont dérivés de la PC par une réaction d'échange de tête polaire : la phosphatidylcholine : diacylglycérolcholinephosphotransférase (PDCT, (Lu et al., 2009)) transfère le

groupement phosphocholine de la PC au DAG générant de nouvelles espèces moléculaire de DAG et de PC sans production nette de ces deux molécules (Fig. 20). Ce nouveau DAG dépendant de la PC peut à son tour servir à la synthèse de TAG (Bates and Browse, 2011). Ce mécanisme a été caractérisé chez la levure et les plantes (Dahlgvist et al., 2000; Zhang et al., 2009a) mais chez les microalgues aucun homologue de la PDCT n'a été rapporté. Les BL étant des analogues fonctionnels de la PC, l'existence d'une enzyme capable de rompre la liaison éther de la tête polaire des BL (plus solide que la liaison phosphate de la PC) et de réaliser un échange de tête vers un DAG pose toujours question. Néanmoins chez *P. tricornutum* (Pt4), l'analyse des espèces moléculaires des lipides membranaire ayant un squelette glycérol similaire à celui des espèces TAG nouvellement formé en carence azote suggère une conversion du DGTS en TAG (Popko et al., 2016).

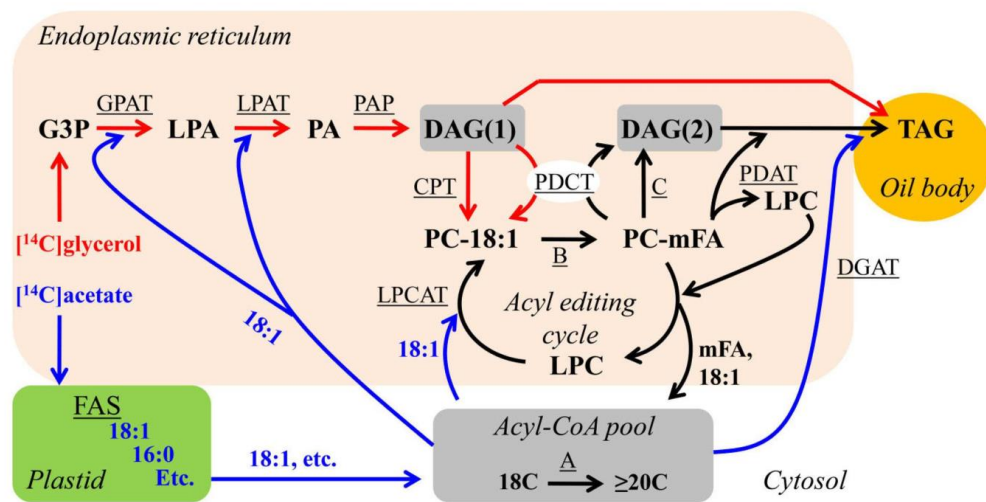


Figure 20 : Voie de synthèses des DAG et des TAG chez *A. thaliana* et les flux de radiomarquage (Bates 2012).

Les flèches rouges indiquent les possibles flux initiaux de métabolites marqués au ^{14}C glycérol. Les flèches bleues indiquent les flux initiaux de métabolites marqués au ^{14}C acétate. Les flèches noires représentent des flux qui ne sont pas initialement marqués ni par le ^{14}C glycérol ni par le ^{14}C acétate mais qui accumulent des métabolites radio-marqués au cours du temps.

Abréviations : Les substrats : DAG, diacylglycérol ; G3P, glycérol-3-phosphate ; LPA, lyso-acide phosphatidique ; mFA, acide gras modifié ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; TAG, triacylglycérol. Les réactions enzymatiques sont soulignées : A, élongation des FA ; B, modification des FA estérifiés à la PC ; C, CPT réversible ou phospholipase C ou phospholipase D/PAP ; CPT, CDP-choline:DAG cholinephosphotransférase ; DGAT, acyl-CoA:DAG acyltransférase ; FAS, synthèse des acides gras (fatty acid synthase) ; GPAT, acyl-CoA:G3P acyltransférase ; LPAT, acyl-CoA:LPA acyltransférase ; LPCAT, acyl-CoA:LPC acyltransférase ; PAP, PA phosphatase ; PDAT, phospholipide:DAG acyltransférase ; PDCT, PC:DAG cholinephosphotransférase.

Une autre voie générant des DAG pour la synthèse de TAG est la voie du 2-monoacylglycérol (MAG). La synthèse du MAG *de novo* dans les cellules de plante a été précédemment décrite (Reddy et al., 2010; Yang et al., 2010) et est catalysée par des GPAT particulières ayant une spécificité *sn*-2 (GPAT4 et GPAT6) (Yang et al., 2012). Le *sn*-2 MAG est alors converti en DAG par une monoacylglycérol acyltransférase (MGAT). Ces *sn*-2 MAG étaient initialement considérés comme précurseurs de la synthèse de polymères de cire ; cependant leur conversion en DAG a été rapportée dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* (Petrie et al., 2012) et récemment dans les fruits de *Myrica pensylvanica* (Simpson and Ohlrogge, 2016). Chez les microalgues les MGAT ne sont pas prédites car il est impossible de les distinguer des DGAT2 en se basant uniquement sur leur séquence. Il est donc possible

que plusieurs des DGAT2 prédites soient en fait des MGAT. Enfin, l'hydrolyse des TAG, par différentes lipases, génère aussi bien des DAG que des MAG.

Chez les plantes, dans des conditions plus particulières en l'occurrence le gel, les DAG précurseurs de TAG peuvent provenir de l'action de la GGGT codée par le gène *SFR2* (Moellering et al., 2010) (Fig. 16). Les TAG produits présentent en *sn-2* la même composition en FA que le MGDG. Aucun gène de type *SFR2* n'est retrouvé par homologie de séquence chez *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011). Cependant, chez *C. reinhardtii* des travaux récents suggèrent fortement que le MGDG (*sn-1/ sn-2* 18:3/ 16:4) est converti, par un mécanisme inconnu, en DAG qui présente la même signature acyle puis en TAG *sn-1/sn-2/sn-3* 18:3/16:4/18:3. Ce TAG s'accumule en réponse à une augmentation de la température (Légeret et al., 2016). Une étude de Popko et al., (2016) chez *P. tricornutum* n'exclut pas non plus la participation du MGDG à la synthèse des TAG, comme c'est le cas chez une autre souche de *P. tricornutum* (Abida et al., 2015).

4.4.2 Origine de la chaîne acyle en position *sn-3*

Les acides gras estérifiés en position *sn-3* du squelette glycérol des TAG peuvent être tout d'abord issus du pool d'acyl-CoA du cytoplasme. En carence N, les chaînes acyles retrouvées dans les TAG sont principalement issues de la synthèse *de novo* des FA (Abida et al., 2015; Simionato et al., 2013).

Les acyl-CoA : diacylglycérol acyltransférases (DGAT) permettent l'acylation du DAG en position *sn-3* par des acyl-CoA formant ainsi le TAG *de novo* (Fig. 20). Deux différents types de DGAT sont identifiés et présentent des séquences non similaires : DGAT1 et DGAT2 (ou DGTT). Elles ont probablement évoluées séparément mais par un phénomène de convergence évolutive, elles catalysent des réactions similaires mais dans des domaines différents du RE des plantes (Shockey et al., 2006; Turchetto-Zolet et al., 2011). La position stratégique de ces enzymes dans la voie de biosynthèse des TAG en font des candidats essentiels d'étude pour l'optimisation de la quantité de TAG et la composition en FA des huiles. Le critère initial pour sélectionner les DGAT d'intérêt chez les microalgues est leur profil d'expression lors de l'induction de la synthèse de TAG en carence azote.

Il est intéressant d'observer que les gènes codant ces DGAT, notamment les DGAT2, sont présents en un plus grand nombre de copies chez les microalgues par rapport aux plantes. Ainsi *A. thaliana* ne possède qu'une DGAT1 et qu'une DGAT2 tandis que *N. oceanica* en possède respectivement deux et douze (Fig. 14 et 21). Toutes les DGAT ne restaurent pas le phénotype d'accumulation de TAG dans la souche de levure *BY4741 lro1Δ dga1Δ* et elles possèdent une spécificité de substrat différente (Wagner et al., 2010; Zienkiewicz et al., 2016).

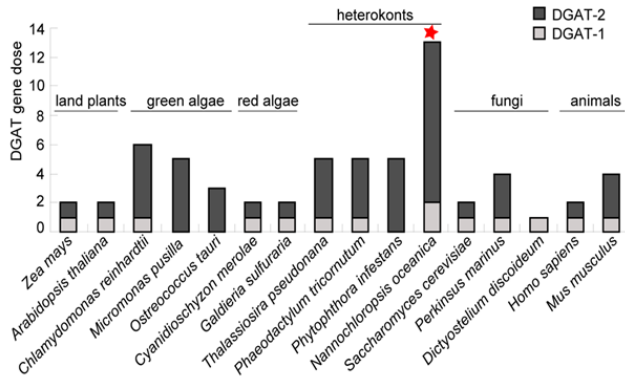


Figure 21 : Figure 5. Nombre de copies de gènes des DGAT1 et DGAT2 chez plusieurs organismes modèles de règnes différents (Wang et al., 2014). Le nombre de DGAT1 et DGAT2 est illustré par différentes couleurs respectivement gris clair et gris foncé. *N. oceanica* est indiquée par une étoile rouge.

Les acides gras ajoutés en position *sn*-3 des DAG font également intervenir des mécanismes indépendants de la synthèse des acides gras. En effet, un autre aspect de l'édition des acides gras est le transfert direct d'un FA de la PC sur un DAG conduisant à la formation de TAG par la phospholipide : diacylglycérol acétyltransférase (PDAT, (Dahlqvist et al., 2000)). Plus précisément, la PDAT transfère la chaîne acyle de la position *sn*-2 de la PC sur la position *sn*-3 du DAG générant un TAG avec une chaîne acyle précédemment modifiée sur la PC et une LPC (Xu et al., 2012). L'activité de la PDAT chez les plantes a été mise en évidence dans quelques espèces accumulant des huiles cependant sa contribution à la synthèse des TAG varie entre ces espèces (Banaś et al., 2013; Li et al., 2010). Par contre chez les microalgues, les PDAT et les DAGT sont considérées comme les deux enzymes majeures impliquées dans les étapes finales de la synthèse des TAG. Chez *C. reinhardtii*, il a été démontré que l'activité de la PDAT est responsable de 25% de la synthèse de TAG en carence N et que cette PDAT catalyse la synthèse des TAG par deux voies : la transacylation du DAG avec une chaîne acyle d'un phospholipide ou d'un galactolipides, et une transacylation DAG:DAG (Yoon et al., 2012). Zienkiewicz et al (2016) rapportent que les microalgues *O.tauri*, *C. reinhardtii*, *Chlorella sp.* et *P. tricornutum* possèdent une copie du gène prédit pour la PDAT et que *N. oceanica* (souche IMET1 et 1779) en possède deux. Les PDAT de microalgues sont divergentes des PDAT des plantes supérieures et forment un clade séparé (Pan et al., 2015). Cette divergence pourrait être liée à l'existence de mécanismes différents et/ou à l'absence de PC chez les microalgues. Jusqu'à présent, seul un rôle direct dans la synthèse des TAG de la PDAT de *C. reinhardtii*, CrPDAT, a été rapporté et les analyses fonctionnelles concernant les PDAT manquent. L'expression de CrPDAT est induite en carence et sa répression par silencing induit une réduction du contenu en TAG aussi bien en condition de carence N et qu'en conditions standard de croissance (Boyle et al., 2012). Les mutants perte de fonction *CrPADT* sont néanmoins toujours capables de synthétiser de faibles quantités de TAG suggérant une coopération fonctionnelle avec les DGAT.

De nouveaux éléments ont émergés récemment en ce qui concerne les glycérolipides donneurs de chaînes acyles pour la synthèse des TAG. Le rôle des lipides membranaires polaires, principalement du MGDG dans la synthèse des TAG a été montré pour le mutant *PLASTIDIAL GALACTOLIPID DEGRADATION 1 (pgd1)* de *C. reinhardtii* caractérisé pour la perte de fonction d'un gène codant une

protéine qui hydrolyse le MGDG en son lyso-lipide dérivé (Fig. 22). L'étude de la spécificité de cette lipase montre une préférence pour les espèces matures de MGDG avec peu de doubles liaisons de type 18:1^{Δ9}/16:0 et une préférence pour les chaînes acyles en position *sn*-1 (Li et al., 2012). De même, en carence N chez *P. tricornutum* (Abida et al., 2015), comme chez *N. gaditana* (Simionato et al., 2013), le MGDG contribue à fournir les TAG en chaîne acyles. Abida et al., (2015) posent l'hypothèse que la dégradation du MGDG fournit le pool d'acyl-CoA en FA particulier (ici EPA) qui sont ensuite stockés dans les TAG.

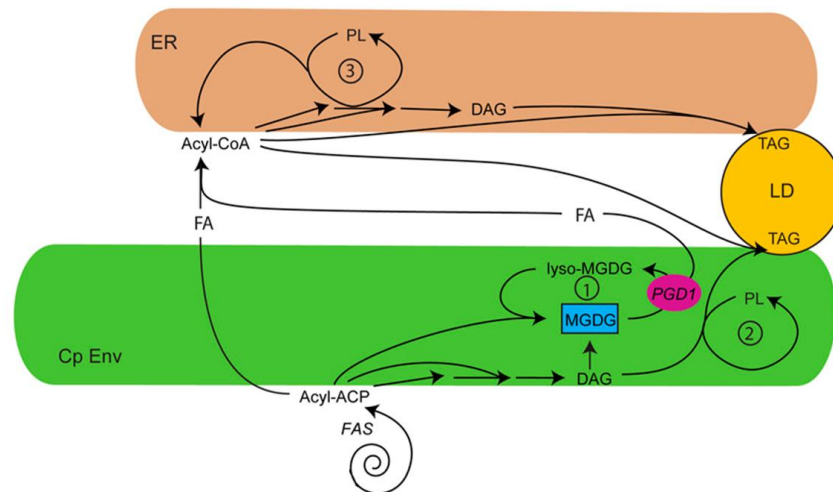


Figure 22 : Hypothèse plaçant PGD1 dans le contexte du métabolisme lipidique cellulaire et expliquant son rôle dans la biosynthèse des TAG (Li et al 2012).

Pour des raisons de simplicité, une seule gouttelette lipidique est montrée se formant au RE (ER) ou à l'enveloppe du chloroplaste (Cp env) et tous les intermédiaires de réactions ne sont pas montrés. Trois mécanismes de turn-over lipidique sont indiqués par des numéros : 1. Turn-over du MGDG nouvellement synthétisé. 2. Turn-over de MGDG mature et d'autres lipides thylacoïdaux aux niveaux des membranes plastidiales. 3. Modification des chaînes acyl et turn-over des lipides dans le RE. Les enzymes et les complexes protéiques sont indiqués en italiques : FAS : fatty acid synthase, PGD1 : plastidial galactolipid degradation 1. Les substrats et les produits sont les suivants : DAG : diacylglycérol, FA : acide gras, PL : lipide polaire.

Enfin, une étude récente a montré que chez *C. reinhardtii* lors de stress induit par la chaleur, les TAG s'accumulent (Légeret et al., 2016). Les auteurs suggèrent cette fois-ci, que par l'action d'une phospholipase A2, le donneur de chaînes acyles sur la position *sn*-3 du DAG serait le DGTS ou la PE étant donné que leur lyso-lipides respectifs sont augmentés.

4.4.3 Localisation de l'assemblage des TAG

Dans la voie de biosynthèse conventionnelle des TAG des plantes et des animaux, les TAG sont assemblés dans le RE via l'activité d'acyltransférases microsomiales et sont déposés exclusivement dans les gouttelettes lipidiques du cytosol (Li-Beisson et al., 2010). Néanmoins un assemblage des TAG *de novo* dans le chloroplaste a récemment été proposé chez *C. reinhardtii*, étant donné l'évidente contribution de la voie chloroplastique dans cette étude contrairement à ce qui est connu chez les plantes (Fan et al., 2011). Les données génomique indiquent que bon nombre d'acyltransférases putatives

impliquées dans la synthèses des TAG seraient localisées au plaste ce qui supporte l'importance de la voie chloroplastique pour la synthèse des TAG chez ces organismes (Li et al., 2014; Vieler et al., 2012).

5 Synthèse des acides gras polyinsaturés

5.1 Nomenclature des acides gras

Les FA portés par le squelette glycérol des glycérolipides sont caractérisés par leur longueur et leur degré d'insaturation. Une longueur de chaîne acyle inférieure ou égale à 14 carbones correspond aux FA à moyenne chaîne, entre 16 et 18 carbones aux FA à longue chaîne (LC) et plus de 18 carbones aux FA à très longues chaînes (VLC). La position des insaturations des FA est numérotée soit à partir de l'extrémité carboxyle (nomenclature en 'α' ou 'Δ') soit à partir de l'extrémité méthyle (nomenclature en 'ω' ou 'n') (Fig. 23).

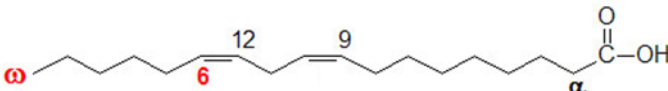
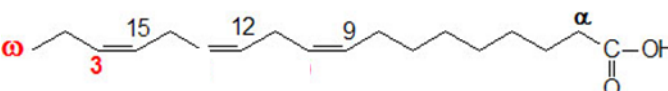
	Name	Structure	Nomenclature
ω-6 or n-6 fatty acid	Linoleic acid (LA)		18:2 ^{Δ9,12} n-6
ω-3 or n-3 fatty acid	α-Linolenic acid (ALA)		18:3 ^{Δ9,12,15} n-3

Figure 23 : Nom, structure et nomenclature des acides gras, exemple de l'acide linoléique et de l'acide α-linolénique.

5.2 Voies de biosynthèse de PUFA

Les FA prédominants des microalgues sont les FA polyinsaturés (PUFA) pouvant contenir jusqu'à 4 ou 5 doubles liaisons (en ce qui concerne les glycérolipides). Les animaux peuvent, à l'instar des microalgues, synthétiser des VLC-PUFA mais cette synthèse nécessite l'apport de 18:2 *n*-6 et 18:3 *n*-3, acides gras essentiels uniquement synthétisés par les végétaux à partir du 18:1, et qui sont les précurseurs de la voie oméga-6 et oméga-3 (Fig. 24).

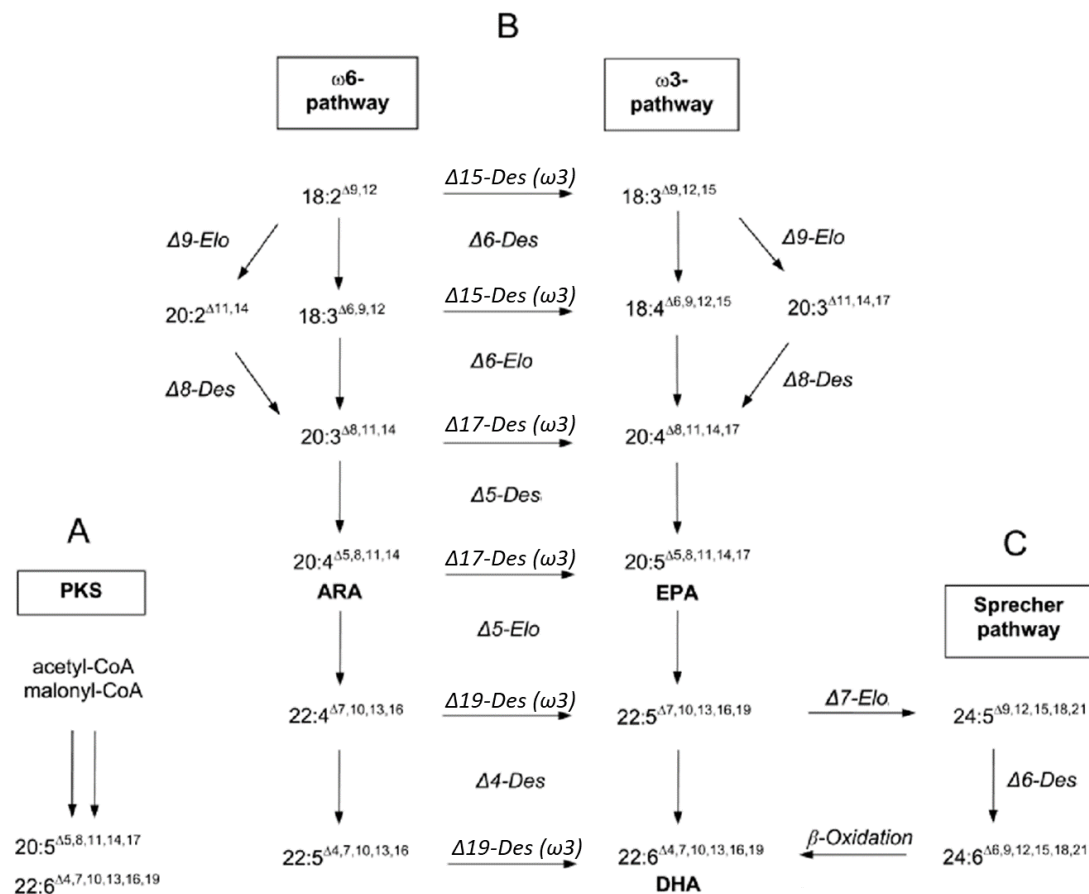


Figure 24 : Voies de production de (V)LC-PUFA chez les microorganismes, plantes et animaux (d'après Meyer et al., 2003; Shi (史海粟) et al., 2015).

(A) Systèmes des polyketide synthases (PKS) produisant l'EPA et le DHA dans les bactéries marines. Cette voie a également été découverte dans certains eucaryotes hétérotrophiques de la famille des Thraustochytriaceae (Metz et al., 2001). La voie des PKS ne nécessite pas de désaturation aérobie contrairement aux doubles liaisons introduites durant le processus de production des FA. (B) Voies ω-3 et ω-6 de biosynthèse des (V)LC-PUFA, incluant la voie alternative utilisant la Δ9-élongase et la Δ8-désaturase. (C) La voie de Sprecher existe chez les mammifères et remplace l'étape de conversion directe du 22:5 au 22:6 (Sprecher, 2000). Le passage des ω-3 aux ω-6 n'est pas une alternative universelle. Il a lieu fréquemment chez les eucaryotes inférieurs (algues, champignons, mousses, vers) mais pas chez les mammifères car ils ne possèdent pas d'ω-6 et d'ω-3 désaturases.

La synthèse des VLC-PUFA dépend d'étapes d'élongation et de désaturation réalisées par des FA élongases et désaturases. C'est notamment de l'efficacité des désaturases que dépend l'efficacité de toute la voie. L'acide linoléique (LA, 18:2^{Δ9,12} n-6) et l'acide α-linoléique (ALA, 18:3^{Δ9,12,15} n-3) sont des acides gras essentiels pour les vertébrés et sont les précurseurs de l'acide arachidonique (ARA, 20:4^{Δ5,8,11,14} n-6), de l'EPA et du DHA (Das, 2006; Tocher, 2010) (Fig. 24). Chez l'homme, l'efficacité de la désaturase Δ6, qui catalyse deux réactions dans la voie de biosynthèse du DHA à partir de l'ALA, est limitante (Burdge and Calder, 2005). Chez les microalgues, comme chez autres eucaryotes primitifs, les désaturases ont pour substrats les lipides, sauf rare exception, alors que les élongases ont pour substrats les acyl-CoA. Ceci fait intervenir des étapes supplémentaires de transfert de la chaîne acyle du lipide au CoA, et inversement, qui sont effectuées par des acyl-transférases. Il est admis que ces transferts limitent l'efficacité des voies de synthèse dans les microalgues ou dans les plantes transgéniques (Domergue et al., 2003; Sayanova et al., 2012). C'est chez *Ostreococcus tauri* que la première Δ6 acyl-CoA désaturase

d'origine végétale a été identifiée (Domergue et al., 2005). Des homologues de cette acyl-CoA désaturase ont été également identifiés chez des espèces proches (Petrie et al., 2010; Shi (史海粟) et al., 2015). Cette caractéristique offre un intérêt en biotechnologie pour l'ingénierie métabolique de plantes ou de microalgues produisant des VLC-PUFA. L'utilisation d'enzymes dépendantes de l'acyl-CoA avec la bonne spécificité de substrat permet de s'affranchir de la dichotomie de substrats entre élongases et désaturases et de n'être ainsi plus limité par la vitesse d'échange de chaîne acyle entre le pool d'acyl-CoA et les lipides (Petrie et al., 2010; Sayanova et al., 2012). La $\Delta 6$ acyl-CoA désaturase a donc été largement utilisée pour la reconstruction de voie de biosynthèse des VLC-PUFA en système hétérologue (Hoffmann et al., 2008).

5.3 Acides gras désaturases

Les réactions de désaturations sont catalysées par des oxydoréductases appelées FA désaturases (FAD pour 'fatty acid desaturase'). Elles introduisant des doubles liaisons par déshydratation à des positions spécifiques de la chaîne acyle (Los and Murata, 1998; Shanklin and Cahoon, 1998). Ces enzymes contiennent un centre non-hème actif di-ferrique (diiron enzyme) qui recrute et active l'oxygène moléculaire nécessaire à la réaction de déshydrogénation (Shanklin et al., 2009). Les donneurs d'électrons sont les cytochromes b5 (Cytb5) pour les désaturases microsomaux alors que dans le chloroplaste, à l'instar des cyanobactéries, ce sont des ferrédoxines qui transfèrent les électrons aux désaturases plastidiales (Fig. 25) (Sperling et al., 2003). Cette règle a été remise récemment en question par la découverte chez *C. reinhardtii* d'une $\Delta 4$ plastidiale fusionnée à un domaine cytochrome b5 et localisée dans l'enveloppe du chloroplaste (Zauner et al., 2012).

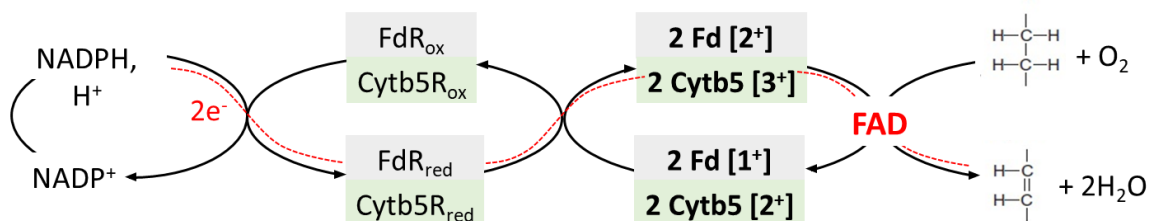


Figure 25 : Représentation simplifiée du flux d'électrons lors d'une réaction de désaturation aérobie chez les plantes.

Les donneurs d'électrons sont typiquement les cytochromes b5 dans le RE et les ferrédoxines (Fd) dans le chloroplaste. Cytb5, cytochrome b5 ; Cytb5R, cytochrome b5 réductase ; FdR, ferrédoxine oxydoréductase ; Fd, ferrédoxine.

Plus de 25 années de travaux sur les désaturases ont permis d'assigner une fonction à ces enzymes pour la plupart membranaires et de ce fait difficiles à aborder d'un point de vue biochimique. Comme pour les autres gènes du métabolisme de lipides, les études des désaturases chez les microalgues se sont initialement fortement appuyées sur les résultats provenant d'*A. thaliana* et dans une moindre mesure sur les études menées chez les cyanobactéries (Los and Mironov, 2015; Los et al., 2013; Murata and

Wada, 1995). Ce sont essentiellement des approches de génétique qui ont permis de caractériser la fonction des désaturases et c'est sur la base conjointe de recherche d'homologues et de création de mutant et/ou d'expression en système hétérologue, que les désaturases de microalgues sont actuellement étudiées. C'est encore chez *C. reinhardtii* qui contient 13 séquences de désaturases (Li-Beisson et al., 2015) que le plus d'études fonctionnelles ont été conduites et que la vision globale de la synthèse des PUFA est la plus claire (voir ci-après, pour revue Li-Beisson et al., 2015). Chez *P. tricornutum*, une étude *in silico* (Dolch and Maréchal, 2015) a permis d'identifier 11 ou 12 gènes homologues de désaturases dont seulement certains ont été étudiés de manière fonctionnelle (Domergue, 2003; Domergue et al., 2002; Peng et al., 2014). D'autres désaturases spécifiques des VLC-PUFA ont été identifiées et caractérisées chez d'autres microalgues telles que *O. tauri* (Domergue et al., 2005), *O. lucimarinus* (Ahmann et al., 2011), *M. pusilla* (Petrie et al., 2010; Shi (史海粟) et al., 2015) et *E. huxleyi* (Kotajima et al., 2014).

5.3.1 Classification des désaturases

Il existe deux types de désaturases ; solubles et membranaires, dont les origines évolutives sont très distinctes.

Les désaturases solubles correspondent aux stéaroyl-ACP-désaturases (SAD) végétales qui sont localisées dans le stroma des chloroplastes (Shanklin and Somerville, 1991). La première structure moléculaire de désaturase provient de la SAD de ricin (Lindqvist et al., 1996; Schneider et al., 1992). Les désaturases membranaires sont très largement majoritaires et se regroupent dans des sous-familles évolutivement distantes.

Les séquences des désaturases membranaires contiennent quatre domaines transmembranaires et trois motifs histidine (His) box [HX3-4H, HX2-3HH et (H/Q)X2-3HH] qui sont cruciaux pour leur activité (Shanklin et al., 1994). Parce que la purification de protéines enchâssées dans les membranes est difficile, la caractérisation fonctionnelle des désaturases membranaires s'est basée sur leur expression dans différents organismes hôtes (levure, cyanobactéries). Mais récemment, deux premières structures de désaturases membranaires ont pu être cristallisées : la stéaroyl-CoA désaturase de souris (Bai et al., 2015) et celle de l'homme (Wang et al., 2015) (Fig. 26).

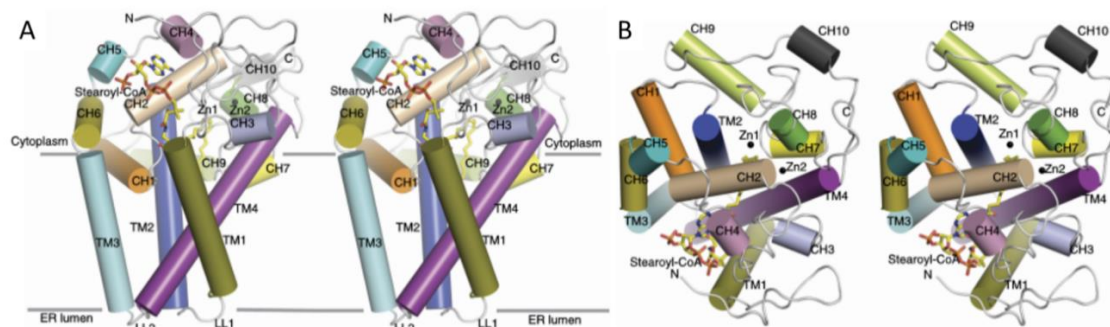


Figure 26 : Vue de la structure de la Stéaroyl-coenzyme A désaturase-1 (SCD1) humaine (Wang 2015).
 (A) Vue montrant l'orientation de SCD1 selon le plan de la membrane. (B) Vue mettant en évidence les domaines cytoplasmiques de SCD1.

Les résultats d'une analyse portant sur une cinquantaine d'eucaryotes représentatifs permettent de dégager quatre familles principales de déaturases basées sur leur spécificité par rapport à la double liaison introduite, soit la régiospécificité (Hashimoto et al., 2008):

- Les 'first' désaturases : catalysent la formation de la première double liaison sur une chaîne acyle saturée conduisant à la formation de FA monoinsaturés (18:1, 16:1). Quelques $\Delta 9$ -désaturases-like sont retrouvées chez les plantes (origine plastidiale) mais elles sont nombreuses chez les animaux, les champignons et les bactéries (Gostincar et al., 2010).
- Les 'methyl ou omega' désaturases : ajoutent une double liaison entre une insaturation préexistante et l'extrémité méthyle de la chaîne acyle. Elles comprennent les $\Delta 12/\omega-6$ désaturases et également les $\Delta 15/\omega-3$. Ces oméga-désaturases aussi appelées $\Delta 12$ désaturases-like sont retrouvées chez les plantes, les champignons et les bactéries mais absentes chez les mammifères (Gostincar et al., 2010).
- Les 'front-end' désaturases : ajoutent une double liaison entre une insaturation pré-existante et l'extrémité carboxyle de la chaîne acyle. Ce sont les $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 8$ désaturases. Elles sont retrouvées dans tous les règnes eucaryotiques mais prédominent chez les animaux et les microorganismes (Gostincar et al., 2010; Meesapyodsuk and Qiu, 2012). Les front-end désaturases, ou $\Delta 6$ désaturases-like, des organismes eucaryotes ont la particularité de présenter un Cytb5 en N-terminal (Napier et al., 2003).
- Les sphingolipides désaturases : catalysent la désaturation en $\Delta 4$ ou en $\Delta 8$ de sphingolipides et ne sont pas connues pour avoir d'autre spécificité de substrat.

Ces résultats sont corroborés par ceux de (Li et al., 2016a) qui classent 5000 séquences de désaturases selon leur fonction et leur spécificité putative de tête basée sur l'homologie avec des désaturases connues. Cependant les études fonctionnelles sont absolument nécessaires pour préciser la spécificité de substrat des désaturases. La classification actuelle atteint ses limites en ce qui concerne les désaturases terminales de la voie des VLC-PUFA ($\Delta 5/\Delta 4$) pour lesquelles il n'existe pas de variation

suffisante de séquences qui permette de les distinguer par rapport à leurs différentes spécificités de substrats (Li et al., 2016a). Ceci est également vrai pour les $\Delta 8$ sphingolipide-désaturases et les $\Delta 6$ lipide-désaturases qui malgré des fonctions bien différentes ne se démarquent pas les unes des autres sur la base de leur séquences (Song et al., 2013). Cette spécificité de substrat, principalement déterminée par des approches génétiques, ne dépendrait pas seulement de la partie acyle du lipide mais également de la tête du lipide.

5.3.2 Spécificités des désaturases

Hormis leur fonction commune de désaturation des chaînes acyles, les désaturases se distinguent entre elles par leurs différences de spécificité à plusieurs niveaux : spécificité de substrat (type de chaîne acyle et porteur de chaîne acyle), régiosélectivité (position de l'insaturation) et stéréospecificité (orientation de l'insaturation *cis* ou *trans* mais également potentiellement la position de la chaîne acyle sur le squelette glycérol : position *sn-1/sn-2*). Hormis l'exception de la synthèse du 16:1 ^{$\Delta 3$ trans} du PG (Gao 2009), la majorité des désaturases génèrent des doubles liaisons orientées en *cis* dans les chaînes acyles. Par contre leur spécificité de substrat et leur régiosélectivité sont très variables.

Différentes désaturases ont pu être montrées comme étant dépendantes du porteur de chaîne acyl : (i) les lipide-dépendantes agissent notamment sur la PC et/ou le MGDG spécifiquement en position *sn-2* ou *sn-1* ; (ii) les acyl-CoA-dépendantes. Des essais *in vitro* avec des microsomes de *Mucor circinelloides* (Jackson et al., 1998) et de *Borago officinalis* (Stymne and Stobart, 1986) ainsi que par expression hétérologue chez la levure de désaturases de champignons (*Mortierella alpina*), de microalgues (*P. tricornutum*), de mousses (*Physcomitrella patens* et *Ceratodon purpureus*) et d'animaux inférieurs (*Caenorhabditis elegans*) (Domergue et al., 2003), ont montré que respectivement, les $\Delta 6$ désaturases et les $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases de ces différentes organismes sont lipide-dépendantes et agissent principalement en position *sn-2* de la PC. De même les analyses positionnelles de la PC chez la microalgue *Euglena gracilis* révèlent que la proportion de produits désaturés par la $\Delta 4$ désaturase est 20 fois plus importante en *sn-2* qu'en position *sn-1* (Meyer et al., 2003). Dans ce cas de désaturases dépendant de la tête polaire de la PC, une question se pose chez les microalgues ne possédant pas de PC sur l'identité du/des lipides permettant la désaturation des chaînes acyles. Des observations suggèrent que dans ce cas et en présence de BL, l'acide oléique radiomarqué transite dans le DGTA avant d'être désaturé (Vogel and Eichenberger, 1992). D'autres désaturases peuvent agir spécifiquement sur les lipides plastidiaux comme le MGDG ou le PG. Ainsi chez les cyanobactéries, les $\Delta 6$ désaturases utilisent uniquement comme substrat la chaîne acyle en position *sn-1* du MGDG (Reddy et al., 1993; Wada and Murata, 2006). La Cr $\Delta 4$ FAD plastidiale de *C. reinhardtii*, qui produit du 16:4 à partir du 16:3, est un autre exemple de désaturase MGDG spécifique comme le suggère la présence exclusive des chaînes acyles 16:4 en position *sn-2* du MGDG (Zauner et al., 2012). Enfin FAD4, quant à elle, est

responsable de la synthèse du 16 :1^{Δ3trans} uniquement en position *sn*-2 du PG (Gao et al., 2009). Cette enzyme est lipide-spécifique mais indépendante de la longueur de chaîne comme l'ont montré Fritz et al., (2007). Contrairement à toutes ces désaturases lipide-dépendantes, la Δ6-Des d'*O.tauri* est la première acyl-CoA Δ6-Des de plante à être caractérisée biochimiquement *in vivo* par Domergue et al. (2005). Auparavant ce type de Δ6 désaturases dépendante de l'acyl-CoA avait été caractérisé biochimiquement *in vitro* chez le rat (Okayasu et al., 1981).

La régiospécificité des désaturases a été rapporté être dépendante de leur localisation sub-cellulaire chez *A. thaliana* (Heilmann et al., 2004) : la palmitoyl-MGDG Δ7-désaturase (FAD5), qui catalyse la désaturation en Δ7 de chaînes acyles du MGDG lorsqu'elle possède son signal de localisation chloroplastique, mais lorsque ce peptide est délété et qu'elle se retrouve par défaut dans les membranes cytosoliques, donc en présence de PC, elle catalyse la désaturation en Δ9 de la chaîne acyle. Ceci est également vérifié lorsque cette désaturase est exprimée chez *S. cerevisiae* conjointement à la MGDG synthase (ce qui permet d'avoir un substrat MGDG en levure). Inversement l'ajout de la séquence de localisation chloroplastique aux Δ9 désaturases microsomaux provoque une commutation de leur spécificité de Δ9 en Δ7. Ces expériences démontrent que la nature même du substrat lipidique est capable d'influencer la régiosélectivité des désaturases. La littérature rapporte l'existence de désaturases bi-fonctionnelles comme les Δ12/ω-3 de champignon et *C. elegans* (Damude et al., 2006) et la Δ5/Δ6 désaturase du poisson zèbre (Hastings et al., 2001). D'autres désaturases ont une régiosélectivité stricte mais sont flexibles quant à la longueur de chaîne. Par exemple, chez les microalgues la Δ4 désaturase d'*Euglena gracilis* montre une stricte régiosélectivité en Δ4 et nécessite la présence d'une double liaison Δ7 dans le substrat mais son activité n'est pas limitée aux acides gras en C22 ; elle peut également désaturer efficacement les acides gras en C16 (Meyer et al., 2003). De la même manière, la Δ9 lipide-désaturase des C1 de *Prochlorothrix hollandica* (cyanobactérie), caractérisée dans la levure, présente une efficacité équivalente sur les acides gras de 14 à 18 carbones indiquant que la longueur de la chaîne chez *P. hollandica* est déterminée par l'activité de la FAS et que la chaîne est désaturée en position Δ9 de manière non-spécifique à sa longueur (Starikov et al., 2017).

Les différentes spécificités de chaîne acyle ou de porteur de chaîne des désaturases sont en partie liées à leur séquence en acides aminés (aa) mais sont difficiles à déterminer. Les résultats de Libisch et al., (2000) montrent que les hélices 1 et/ou 2, proches de la 1^{ère} boîte His, sont impliquées dans la formation de la poche hydrophobe de liaison au substrat et contribuent à la sélection de celui-ci. Shi (史海粟) et al., (2015) ont indiqué plus récemment que les Δ6 désaturases, 37 aa entre les boîtes His I et II sont en partie responsables de la préférence de chaîne acyle en ω3 ou en ω6. Il a été également reporté que la séquence entre les boîtes His I et II est impliquée dans la régiosélectivité des ω-3 et ω-6 désaturases de la levure *Pichia pastoris* (Zhang et al., 2009b) et du champignon *Aspergillus niger* (Hoffmann et al., 2007) mais également dans la préférence de longueur de chaîne carbonée de la Δ6 désaturase du

champignon *Mucor rouxii* (Na-Ranong et al., 2006). Parce que toutes les désaturases membranaires contiennent les 3 boîtes His, la séquence entre la boîte I et II peut être une zone clé interagissant avec les FA et dicte la préférence de substrat.

5.4 Données fonctionnelles des désaturases d'acides gras

5.4.1 Les 'first' désaturases

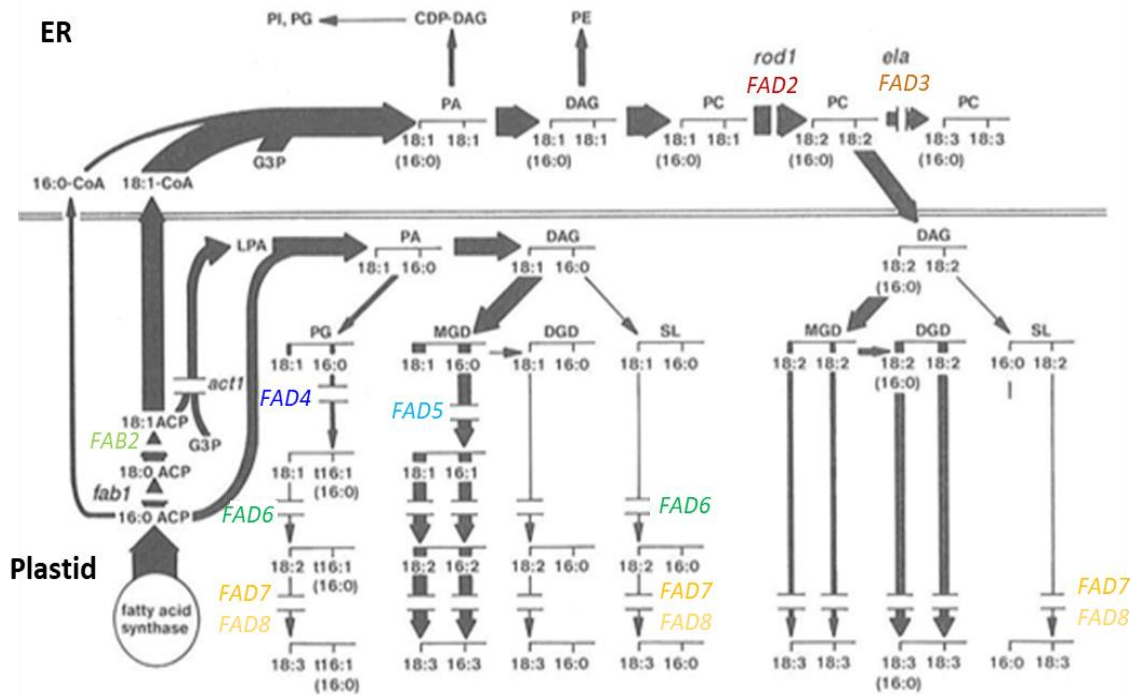
Chez les végétaux, et non chez les mammifères ou la levures, les 'first' désaturases ou $\Delta 9$ -like désaturases plastidiales catalysent la formation de FA monoinsaturés à partir d'acyl-ACP (pour le 18:1) et à partir d'acyl-lipide (pour le 16:0) (Fig. 27).

Synthèse du 18 :1^{Δ9} par la stéaroyl-ACP désaturase soluble

Sept SAD sont présentes chez *A. thaliana*, tandis qu'une seule copie est présente chez *C. reinhardtii*, *P. tricornutum* (Phatraft_9316) et *O. tauri* (Dolch and Maréchal, 2015; Li-Beisson et al., 2015; Misra et al., 2012). La SAD de *C. reinhardtii* (CrFAB2) a été clonée et sa surexpression en système homologue engendre une augmentation de 2,4 fois le contenu en acide oléique (18:1^{Δ9}) (Hwangbo et al., 2013). De plus, la surexpression de CrFAB2 induit l'expression de CrFAD2 (désaturase suivante dans la voie) et la synthèse de 18:2 produit par cette désaturase (Fig. 27). Dans ces lignées le contenu en FA totaux est augmenté de 28% par rapport au contrôle indiquant que la SAD a une action déterminante pour la production de C18 mono et diénoïque (Hwangbo et al., 2013). Une $\Delta 9$ désaturase prédite soluble et localisée dans le chloroplaste a également été caractérisée chez une autre microalgue verte, *Myrmecea incisa*. Lorsque le gène est exprimé chez la levure mutante *OLE1* (stéaroyl-CoA-désaturase) dépourvue de FA monoinsaturés, il restaure le phénotype soit la production du 16:1^{Δ9} et du 18 :1^{Δ9}.

Chez *P. tricornutum* le 18:1^{Δ9} est un FA minoritaire tandis que le 16:1^{Δ7} est le second FA majoritaire (après l'EPA et avant le 16:3). Il a été proposée que l'acyl-ACP de *P. tricornutum* ait pour substrat préférentiel le palmitoyl-ACP par rapport au stéaroyl-ACP et soit responsable de la formation du 16 :1^{Δ7} (Abida et al., 2015; Domergue, 2003)

A



B

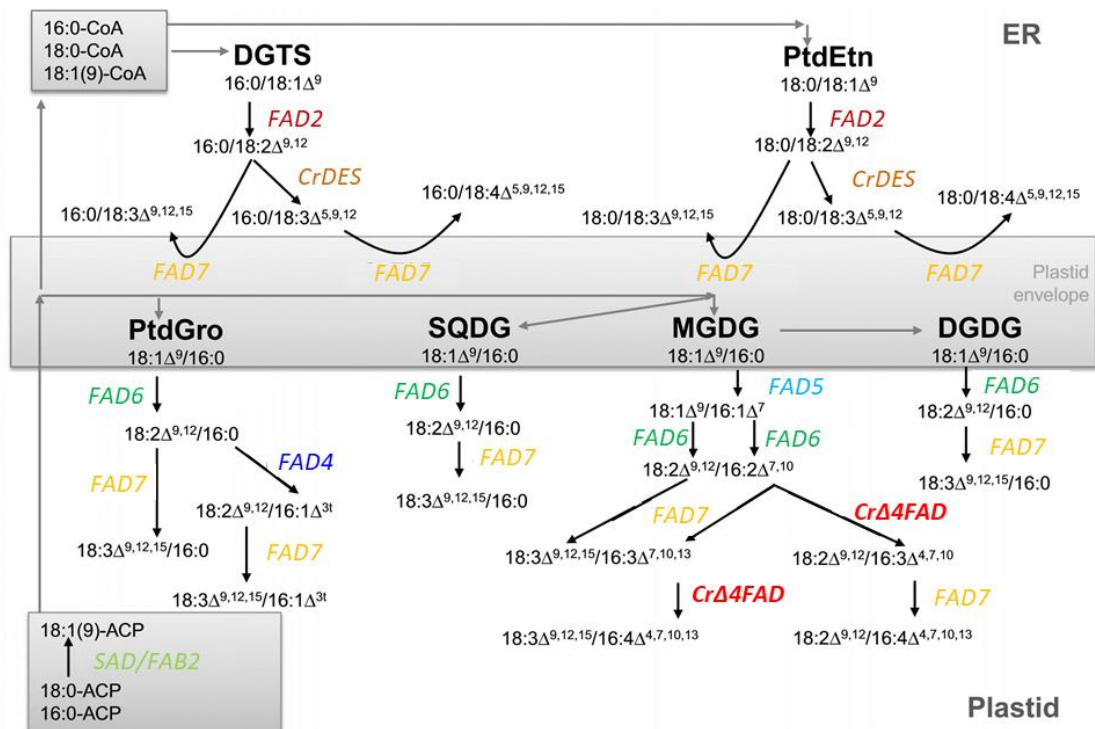


Figure 27 : Comparaison des voies de désaturation des FA chez *A. thaliana* (A) (adapté d'après Somerville and Browse, 1991) et chez *C. reinhardtii* (B) (adapté d'après Li-Beisson et al., 2015).

Au moins un homologue correspondant à une désaturase membranaire de plante a été annoté dans le génome de *Chlamydomonas*. Les désaturations en aval de SAD/FAB2 ont lieu sur les lipides membranaires. Des évidences expérimentales de la spécificité des désaturases ont été fournies pour CrFAD2 (Chi et al 2008), CrFAD6 (Sato 1997), CrFAD7 (Nguyen 2013, Pflaster 2014), CrΔ4FAD (Zauner 2012) et CrDES (Kajikawa 2006). Les fonctions pour l'homologue de la Δ3 désaturase spécifique du PG (FAD4) (Gao et al 2009) et de la désaturase palmitate Δ7 spécifique du MGDG (FAD5) Heilamnn 2004) restent à être démontrées.

Synthèse du 16:1 par la $\Delta 7$ MGDG- ou la $\Delta 3$ PG-FA désaturases

En fonction du lipide plastidial sur lequel il est estérifié en *sn*-2, le devenir du 16:0 est différent car il est pris en charge par différentes 'first' désaturases membranaires. Lorsque l'acide palmitique 16:0 est en position *sn*-2 du MGDG, il peut être pris en charge par FAD5 une palmitoyl-MGDG $\Delta 7$ -désaturase, pour donner du 16:1 $^{\Delta 7}$ (Fig. 27). L'activité spécifique de FAD5 a été caractérisée chez *A. thaliana* (At3g15850) par Heilmann (2004) mais reste à être caractérisée chez *C. reinhardtii*. Chez *A. thaliana* le MGDG est riche en 16:3 $^{\Delta 7,10,13}$ sur sa position *sn*-2, alors que le DGDG qui dérive du MGDG est riche en 16:0. Il a été proposé que le 16:3-MGDG ne puisse pas être utilisé comme substrat pour la synthèse du DGDG et corresponde à un "verrouillage" afin de limiter la conversion du MGDG (Boudière et al., 2012; Petroustos et al., 2014).

Tous les organismes photosynthétiques partagent la désaturation particulière 16:0 en position *sn*-2 du PG pour donner le PG 16:1 $^{\Delta 3trans}$ qui joue un rôle essentiel dans les fonctions photosynthétiques. Contrairement à la majorité des désaturations qui se font en *cis*, cette désaturation spécifique sur le PG se fait en *trans*. La désaturase spécifique du PG caractérisée chez *A. thaliana* par Gao et al (2009) et nommée FAD4 présente une localisation plastidiale (Fig. 27). Sa séquence possède deux motifs His mais est éloignée des autres désaturases membranaires (Gao et al., 2009). Les homologues de FAD4 ont été identifiés notamment chez *O. tauri* (CAL55480) (Gao et al., 2009), chez *P. tricornutum* Phatr_41301) chez qui elle est prédite plastidiale et utilisant la Fd comme accepteur d'électrons (Dolch and Maréchal, 2015) et chez *C. reinhardtii* (Cre16.g673001.t2) (Gao et al., 2009). Cependant aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée.

5.4.2 Les oméga désaturases :

Les oméga désaturases ajoutent une double liaison entre une insaturation préexistante et l'extrémité méthyle de la chaîne acyle. Elles comprennent les $\Delta 12/\omega 6$ désaturases et les $\Delta 15/\omega 3$ (Fig 28).

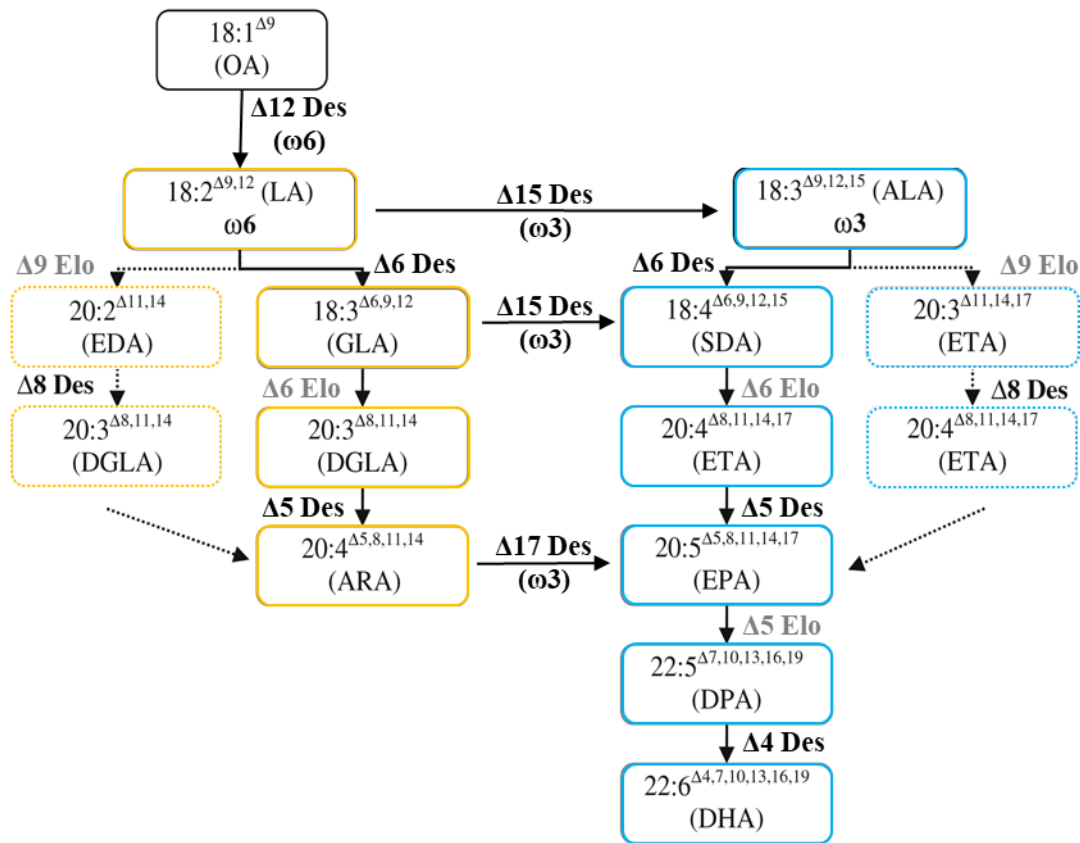


Figure 28 : Biosynthèse des PUFA chez les algues eucaryotique (d'après Khozin-Goldberg et al., 2011).

La voie des oméga 6 ($\omega 6$) est figurée en orangée, celle des $\omega 3$ en bleu. Les flèche en pointillées indiquent des réactions qui n'ont pas été équivoquement montré chez les microalgues.

Abréviations : D, désaturases ; E, élongases.

Synthèse des PUFA ω -6 par les ω -6 FA désaturases

Les désaturases ω -6 catalysent la formation respective du $16:2^{\Delta 7,10}$ et du $18:2^{\Delta 9,12}$ à partir du $16:1^{\Delta 7}$ et du $18:2^{\Delta 9}$. Ces FA diénoïques générés ne sont généralement que peu représentés et correspondent à des intermédiaires de synthèse. Chez *A. thaliana*, ces activités plastidiales (C16 et C18) et microsomales (C18) sont réalisées respectivement par FAD6 (Falcone et al., 1994) et FAD2 (Dyer et al., 2001) (Fig. 27 et 28). Leurs homologues ont été notamment caractérisés chez *C. reinhardtii* et *P. tricornutum*. Chez *C. reinhardtii*, le mutant (hf-9, pour high fluorescence 9) présente une déficience en FA diénoïques et triénoïques ω -6 sur les lipides plastidiaux corrélée à une augmentation des acides monoénoïques ($16:1^{\Delta 7}$ et $18:1^{\Delta 9}$) (Sato et al., 1995). Ces défauts sont restaurés par l'expression d'une ω -6 désaturase ultérieurement clonée, CrFAD6 (Sato et al., 1997). Cependant, la présence d'acides diénoïques restants dans le mutant hf-9 indique l'existence d'autres désaturase ω -6. En effet le génome de *C. reinhardtii* contient deux autres gènes (CrFAD2 et CrFAD6a) homologues de CrFAD6. Grâce à des expériences d'expression hétérologue de CrFAD6 et CrFAD2 chez la levure *S. cerevisiae* par Chi et al., (2008), ces deux désaturases ω -6 ont pu être caractérisées. L'expression hétérologue de CrFAD2 conduit à la

production de 18:2 $n-6$ ce qui est cohérent avec sa localisation subcellulaire microsomale : elle trouve son donneur d'électrons Cytb5 dans l'hôte hétérologue qu'est la levure (Chi et al., 2008). A l'opposé CrFAD6 exprimée chez la levure ne conduit pas à la production du FA diénoïque 18:2 ce qui pourrait s'expliquer par sa localisation subcellulaire inadéquate : l'activité de CrFAD6 plastidiale serait inexistante en raison de l'absence de ferrédoxine (Chi et al., 2008). Chez *P. tricornutum*, l'homologue de FAD2 (Phatr_25769) a été caractérisé fonctionnellement également chez *S. cerevisiae* (Domergue, 2003). PtFAD2 a une activité similaire à FAD2 de colza (utilisée en contrôle) et a pour substrat préférentiel le 18:1 ^{$\Delta 9$} (50% de conversion) confirmant son rôle de $\omega-6$ désaturase sur les chaînes en C18. Elle est aussi capable d'accepter comme substrats mais dans une moindre mesure le 16:1 ^{$\Delta 9$} et le 17:1 ^{$\Delta 9$} et même le 20:1 ^{$\Delta 11$} pour produire respectivement du 16:2 ^{$\Delta 9,12$} , 17:2 ^{$\Delta 9,12$} ou 20:2 ^{$\Delta 11,14$} (respectivement 15%, 22% et 4% de conversion). L'activité de PtFAD2 devrait donc selon les auteurs être définie non pas comme une activité $\omega-6$ ou $\Delta 12$ mais plutôt $\mu+3$, ce qui correspond à la formation d'une double liaison à 3 carbones de la liaison préexistence en direction de l'extrémité méthyle. L'activité de la PtFAD6, semblant plastidiale d'après les expériences de localisation de son peptide signal, été testé dans la levure et dans la cyanobactérie *Synechococcus* sp (R2-PIM8). La faible activité de PtFAD6 dans la levure comparée à celle de PtFAD2 a été interprétée comme étant le fait que ces désaturases sont respectivement plastidiale et microsomale ; le système de donneur d'électron (NADH, Cytb5, Cytb5 oxydase) de l'hôte hétérologue serait plus compatible avec le fonctionnement de désaturases utilisant un système similaire dans l'hôte natif (Domergue, 2003). Chez *Synechococcus*, l'expression de PtFAD6 engendre une forte augmentation des proportions de 16:2 ^{$\Delta 9,12$} et de 18:2 ^{$\Delta 11,14$} au dépend respectivement du 16:1 ^{$\Delta 9$} et du 18:1 ^{$\Delta 11$} indiquant une affinité identique pour les chaînes en C16 et C18 en système hétérologue (Domergue, 2003).

Synthèse des PUFA $\omega-3$ par les $\omega-3$ FA désaturases

Les $\omega-3$ désaturases permettent la conversion des PUFA $\omega-6$ en PUFA $\omega-3$. Selon l'acide gras, elles ont une activité $\Delta 13$ (16:2 ^{$\Delta 7,10$} en 16:3 ^{$\Delta 7,10,13$}), $\Delta 15$ (18:2 ^{$\Delta 9,12$} en 18:3 ^{$\Delta 9,12,15$} et 18:3 ^{$\Delta 6,9,12$} en 18:4 ^{$\Delta 6,9,12,15$}), et potentiellement $\Delta 17$ pour les VLC-PUFA (Fig. 27 et 28). Chez les plantes supérieures possédant des acides gras insaturés jusqu'en C18, FAD7/8 et FAD3 correspondent respectivement aux $\omega-3$ désaturases du chloroplaste et du RE (Dyer et al., 2001, 2002; Iba et al., 1993). La caractérisation récente d'un mutant insertionnel de *C. reinhardtii* (*crfad7*) a permis d'identifier qu'une seule $\omega-3$ désaturase, CrFAD7, suffit à la production des PUFA $\omega-3$ plastidiaux et microsomaux chez cette microalgue (Nguyen et al., 2013; Pflaster et al., 2014). Cette $\omega-3$ désaturase possède une plus grande similarité de séquence avec celle de l'AtFAD7 plastidiale que l'AtFAD3 du RE (Nguyen et al., 2013; Pflaster et al., 2014; Riekhof et al., 2005). Comme CrFAD7 est localisée au niveau du chloroplaste, il est possible qu'elle agisse sur différents substrats au niveau de jonctions membranaires RE-chloroplaste ou que les PUFA $\omega-3$ synthétisés dans le chloroplaste soient exportés (Fig. 29). La présence d'une seule $\omega-3$ désaturase dans

le chloroplaste et proche de la désaturase cyanobactérienne ω -3 désaturase desB semble commune aux microalgues de la classe des Chlorophyceae (Nguyen et al., 2013).

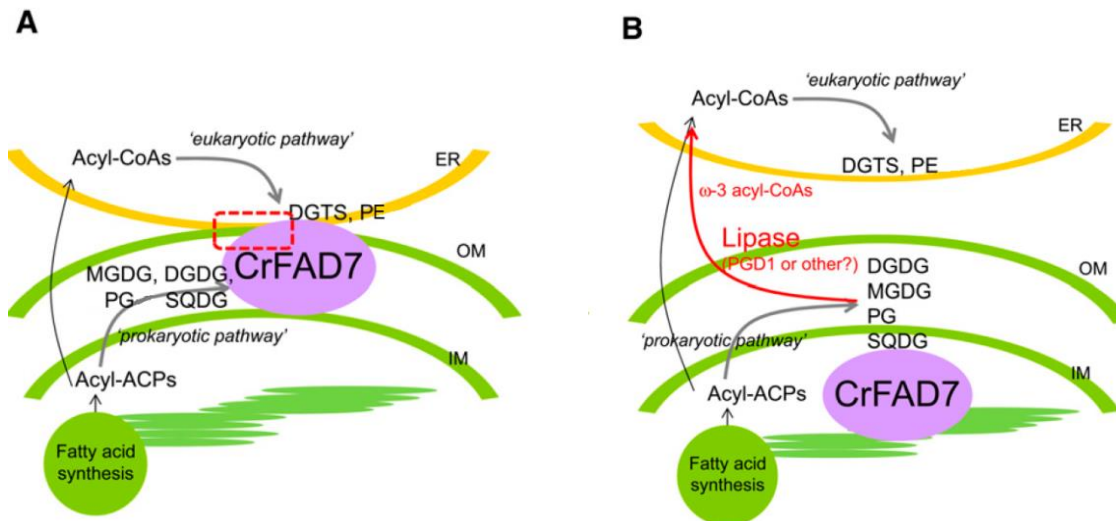


Figure 29 : Modèles possibles impliquant CrFAD7 dans la désaturation des PUFA ω -3 présents dans les lipides extrachloroplastidiaux (Nguyen et al., 2013).

(A) CrFAD7 sur l'enveloppe plastidiale agit au niveau de sites de contact chloroplaste-RE. (B) Les PUFA ω -3 sont synthétisés dans le RE, clivés des lipides plastidiaux par une ou plusieurs lipases spécifiques et sont exportés au RE via la route classique empruntée par les FA synthétisés *de novo* (16:0, 18:0, 18:1).

Abréviations : ACP, protéine transporteur de chaînes acyles (pour 'acyl carrier protein') ; IM, membrane interne de l'enveloppe plastidiale ; OM, membrane externe du chloroplaste.

Des analyses phylogénétiques suggèrent que les désaturases du RE FAD3 des plantes ont évolué plus tardivement (Sperling et al., 2003). Il a été montré, chez les plantes, que les enzymes FAD3 du RE sont capables d'ajouter des doubles liaisons en ω -3 sur une variété de substrat en C18 ou C20 (Reed et al., 2000). Chez *P. tricornutum*, aucun candidat d' ω -3 désaturase n'a été caractérisé, Dolch et Maréchal (2015) ont seulement identifié une séquence FAD3/7/8-like (Phatr_41570) qui pourrait agir comme désaturase ω 3 plastidiale mais qui nécessite des études fonctionnelles afin d'élucider sa spécificité et sa potentielle affinité pour les substrats 18:2 $\Delta^{9,12}$ et 18:3 $\Delta^{6,9,12}$. Par contre, une récente étude chez *E. huxleyi* menée par Kotajima et al., (2014) a permis d'identifier une ω -3 désaturase, plus précisément une Δ 15 désaturase dont l'expression augmente au froid. Celle-ci possède une séquence de localisation plastidiale; exprimée chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. (PCC 6803) elle produit efficacement en PUFA ω -3 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ et 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$ à partir des PUFA ω -6 18:2 $\Delta^{9,12}$ et 18:3 $\Delta^{6,9,12}$.

Chez les organismes synthétisant des VLC-PUFA, la désaturation de l'ARA en EPA est réalisée par une ω -3 désaturase agissant en Δ 17 (Fig. 28), comme chez *Nannochloropsis* sp (Schneider and Roessler, 1994), *M. subterraneus* (Khozin-Goldberg et al., 2002) et *P. cruentum* (Khozin et al., 1997). Mais la désaturase responsable de cette étape n'a pas encore été caractérisée et son rôle dans la biosynthèse des PUFA est en attente de confirmation à un niveau moléculaire.

5.4.3 Les 'front-end' désaturases :

L'addition d'une double liaison entre le groupement carboxyle et une double liaison préexistante un processus commun. Il est catalysé par les front-end désaturases qui partagent des caractéristiques structurales comme la présence d'un Cytb5 fusionné à leur extrémité N-terminal uniquement chez les eucaryotes (Gostinčar et al., 2010; Napier et al., 2003). Le domaine Cytb5 aurait co-évolué avec le domaine FAD ce qui pourrait expliquer que (dans certains cas au moins) il soit spécifiquement requis pour l'activité de l'enzyme. Les front-end désaturases présentent les 3 boîtes His hautement conservées dans le domaine FAD mais la première His de la troisième boîte est systématiquement remplacée par une glutamine (Q-X2-3-H-H) qui est indispensable à l'activité de l'enzyme (Sayanova et al., 2000) (Fig. 30).

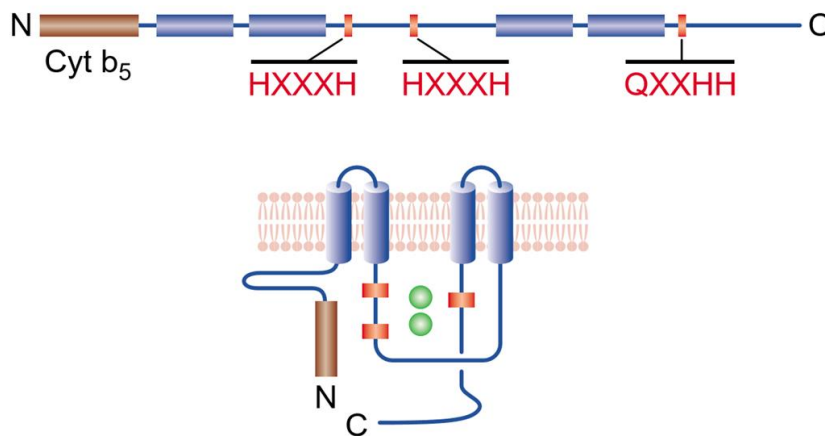


Figure 30 : Structure putative d'une $\Delta 6$ désaturase (Wallis et al., 2002).

La séquence en acide aminée contient une extension cytochrome b5 en N-terminal (en marron) qui est souvent accompagnée d'un changement dans le troisième domaine histidine (His) QXXHH (en rouge) à la place de HXXHH. Ces boîtes His sont nécessaires à l'activité enzymatique et sont séparées par des domaines membranaires (en bleu) qui contribuent sans doute à la bonne orientation de ces séquences actives. Les réactions d'oxydation réduction ont lieu grâce aux deux atomes de fer (en verts) qui sont stabilisés par les interactions avec les domaines His conservés.

$\Delta 6$ désaturases

Seulement certaines plantes terrestres présentent des $\Delta 6$ -PUFA et la première 'front-end' $\Delta 6$ désaturases à Cytb5 fusionné a été identifié chez la bourrache, deux ans après l'identification de la première 'front-end' $\Delta 6$ désaturase (sans Cytb5) chez la cyanobactérie *Synechocystis* (Reddy and Thomas, 1996; Reddy et al., 1993). Chez la bourrache, la délétion du Cytb5 de la $\Delta 6$ désaturase résulte en une perte totale d'activité dans *S. cerevisiae* démontrant ainsi que le Cytb5 de levure ne peut pas être utilisé par la désaturase tronquée (Meesapyodsuk and Qiu, 2012).

Ces enzymes présentes notamment chez les microalgues, les mousses, les champignons et les animaux utilisent pour la plupart indifféremment les substrats ω -6 ($18:2^{\Delta 9,12}$) et ω -3 ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) pour produire respectivement du GLA ($18:2^{\Delta 6,9,12}$) et du SDA ($18:3^{\Delta 6,9,12,15}$) comme pour la $\Delta 6$ désaturase du ER de

P. tricornutum (Phatr_2948) (Domergue et al., 2002). Certaines ont cependant une affinité préférentielle pour les ω -3 comme chez le genre *Primula* (Sayanova et al., 2003) et pour l'acyl-CoA Δ 6 Des d'*O. tauri* (Domergue et al., 2005) et de ses homologues chez les mammifères *O. lucimarinus*, *Ostreococcus* RCC809 (Vaezi et al. 2013) et *M. pusilla* (Petrie et al., 2010), caractérisées en système hétérologue levure. Les Δ 6 de mammifères utilisent également le 24:5 ^{Δ 9,12,15,18,21} pour former du 24:6 ^{Δ 6,9,12,15,18,21} (précurseur du DHA chez les mammifères), en plus du GLA et du SDA (Fig. 24).

En ce qui concerne *P. tricornutum*, la désaturase responsable de la génération du 16:3 ^{Δ 6,9,12} à partir du 16:2 ^{Δ 9,12} n'a pas d'homologue chez *A. thaliana*. Une Δ 6 désaturase à Cytb5 proche de la Δ 6 désaturase microsomale mais qui contiendrait une séquence d'adressage pour le plaste (Phatr_50443) est un candidat potentiel mais doit être caractérisée (Dolch and Maréchal, 2015).

Δ 8 désaturases

Des voies alternatives à l'action de la Δ 6 désaturase sont initiées par l'élongation spécifique du LA et de l'ALA en acide eicosadiénoïque (20:2 ^{Δ 11,14}) ou acide eicosatriénoïque (20:3 ^{Δ 11,14,17}) respectivement. Cette élongation permet l'action d'une Δ 8 désaturase donnant du 20:3 ^{Δ 8,11,14} et du 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} respectivement. Cette alternative existe chez certaines microalgues marines comme *Isochrysis galbana* (Qi et al., 2002), *Pavlova salina* (Zhou et al., 2007) et *E. huxleyii* (Sayanova et al., 2011) et également chez l'Euglenophyte d'eau douce *Euglena gracilis* (Wallis and Browse, 1999).

Δ 5 désaturases

Différentes voies sont possibles pour former du 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} n -3. Généralement le 18:3 n -6 et le 18:4 n -3 produit par la Δ 6 désaturase sont respectivement allongés en 20:3 n -6 et 20:4 n -3 par la Δ 6 élongase. Plus rarement interviennent la Δ 9 élongase et la Δ 8 désaturase (Fig. 24). Le 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} n -3 est ensuite pris en charge par une Δ 5 désaturase qui ajoute une insaturation formant l'EPA : 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17} n -3.

Chez *P. tricornutum* une Δ 5 front-end désaturase, appelé ERA5FAD.1 ou PtD5 (Phatr_46830) a été caractérisé et accepte indifféremment les substrat ω -3 et ω -6 dans la levure avec une préférence pour 20:3 ^{Δ 8,14,17} comparé au 20:3 ^{Δ 11,14,17} (ou 20:1 ^{Δ 11} et 20:2 ^{Δ 11,14}) (Domergue et al., 2002). L'enzyme s'accommode donc d'une variété de substrat avec une forte efficacité de production d'EPA. Cette désaturase est probablement étroitement associée avec la Δ 6 élongase qui génère le 20:4 à partir du 18:4. En explorant le génome de *P. tricornutum*, Dolch et Maréchal (2015) ont identifié une séquence homologue proche : ERA5FAD.2 (Phatr_22459), probablement une seconde Δ 5 désaturase agissant soit de manière redondante soit de spécificité de substrat lipidique différente. La présence de deux enzymes peut expliquer la production très efficace d'EPA chez cette espèce.

$\Delta 4$ désaturases

Chez les microalgues produisant des VLC-PUFA en C22, la biosynthèse du DHA ($22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19} n-3$) dans le compartiment extraplastidial est issue de l'élongation de l'EPA en acide docosapentaénoïque (DPA, $22:5^{\Delta 7,10,13,16,19} n-3$) par une $\Delta 5$ élongase, suivie d'une désaturation en $\Delta 4$ (Fig. 27). Des $\Delta 4$ désaturases ont été clonées et caractérisées à partir de diverses microalgues (Ahmann et al., 2011; Meyer et al., 2004; Pereira et al., 2004; Tonon et al., 2005; Zhou et al., 2007). Cette voie découverte relativement récemment diffère la voie de Sprecher dans le peroxyosome des mammifères et de la voie anaérobique des polyketides synthase (PKS) (Fig 24).

En recherchant dans le génome de *C. reinhardtii* des séquences homologues de $\Delta 4$ désaturases impliquées dans la synthèse des VLC-PUFA, Zauner et al., (2012) ont identifié la désaturase $\Delta 4$ plastidiale responsable de la synthèse du $16:4^{\Delta 4,7,10,13}$ (Fig. 27B). Chez *C. reinhardtii*, le MGDG $18:3^{\Delta 9,12,15}/16:4^{\Delta 4,7,10,13}$ (*sn-1/sn-2*) représente plus de 60% de toutes les espèces moléculaires de MGDG qui est lui-même un lipide majoritaire comme chez tous les organismes photosynthétiques (Nguyen et al., 2013). Zauner et al (2012) ont montré que l'altération de l'expression de CrD4FAD et la quantité de MGDG sont positivement corrélés suggérant un mécanisme de régulation étroit entre le $16:4$ et le MGDG, lipide présumé substrat de la désaturation. Bien que localisée dans le chloroplaste, la CrD4FAD possède un Cytb5 fonctionnel à son extrémité N-terminale, la distinguant des autres désaturases plastidiales. Comme aucune évidence n'indique la présence d'une oxydoréductase Cytb5 dans le plaste de *C. reinhardtii*, l'hypothèse est que le donneur d'électron Cytb5 puisse recevoir les électrons de la ferrédoxine plutôt que du NAD(P)H (Li-Beisson et al., 2015). Une des autres possibilités est que CrD4FAD soit localisée dans l'enveloppe plastidiale et ait ainsi accès au système donneur d'électron cytosolique (Zauner et al., 2012). Cela mettrait ainsi CrD4FAD dans le même compartiment cellulaire que CrFAD7 selon une des hypothèses avancée par Nguyen (2013). Ces deux études de CrFAD7 et CrD4FAD soulignent le rôle central que jouent les désaturases localisées dans l'enveloppe du plaste dans la synthèse et l'homéostasie des lipides chez les cellules de microalgues (Nguyen et al., 2013; Zauner et al., 2012). Cela n'est pas surprenant étant donné le fait que *C. reinhardtii* contient un seul plastide large qui occupe 70% de l'espace cellulaire (Harris, 2001). L'enveloppe plastidiale offre donc une vaste scène pour le métabolisme et les interactions cellulaires (Mehrshahi et al., 2014).

Matériel et Méthodes

1 Matériel

1.1 Souches de microalgues utilisées

Au cours de mes travaux, différentes espèces d'algues ont été requises : différentes espèces et/ou souches du genre *Ostreococcus* ainsi d'autre microalgues appartenant au même ordre des Mamiellales (Tab. 3). Les souches microalgales hormis celle d'*Ostreococcus tauri* (OTH95), proviennent de la Collection de Culture de Roscoff (RCC).

Tableau 3 : Identité des différentes souches de microalgues étudiées.
En bleu : les souches isolées en mer Méditerranée. En souligné : les souches de profondeurs.

RCC	Genre	Espèce
789	<i>Ostreococcus</i>	<i>mediterraneus</i>
<u>788</u>	<u><i>Ostreococcus</i></u>	<u><i>sp.</i></u>
<u>809</u>	<u><i>Ostreococcus</i></u>	<u><i>sp.</i></u>
<u>802</u>	<u><i>Ostreococcus</i></u>	<u><i>lucimarinus</i></u>
3401	<i>Ostreococcus</i>	<i>lucimarinus</i>
834	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>
4222	<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinus</i>

Les contaminations bactériennes sont réduites au minimum (plus de détection en cytométrie de flux pour *O. tauri*) par des cycles de centrifugation/resuspension et des traitements antibiotiques (Sigma-Aldrich) : Pénicilline à 1 mg.mL⁻¹, Streptomycine à 1 mg.mL⁻¹, Gentamycine à 0.5 mg.mL⁻¹. Selon les souches le cocktail d'antibiotique est létal pour la souche et/ou inefficace et doit être adapté ; la ciprofloxacine à 0.5 mg.mL⁻¹ est une des alternatives.

1.2 Conditions de culture

1.2.1 Milieux de culture

Les microalgues sont cultivées en régime discontinu ou batch, à partir d'eau de mer naturelle (NSW pour 'Natural Sea Water') ou artificielle (ASW pour 'Artificial Sea Water') (Tab. 4) enrichie en macro et micro nutriments (milieu f/2) et supplémentée en vitamines (ajouté extemporanément) (Tab.5, 6 et 7).

Tableau 4 : Composition de l'eau de mer artificielle ASW (adapté d'après Keller et al., 1987)

Component	Concentration (g.L-1)
NaCl (Sigma)	24.55
KCl (Sigma)	0.75
MgCl ₂ .6H ₂ O (Sigma)	4.07
CaCl ₂ (Sigma)	1.47
MgSO ₄ (Sigma)	6.04

Tableau 5: Solutions d'enrichissement du milieu f/2 (adapté d'après Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962)

Component	Stock solution	Quantity	Molar contraction in final medium (M)
NaNO ₃	75 g.L ⁻¹	1 mL	8.82*10 ⁻⁴
NaH ₃ PO ₄ H ₂ O	5 g.L ⁻¹	1 mL	3.62*10 ⁻⁵
NaSiO ₃ 9H ₂ O	30 g.L ⁻¹	1 mL	1.06*10 ⁻⁴
Trace metal solution	(Tab. 6)	1 mL	---
Vitamin solution	(Tab. 7)	0.5 mL	---

Tableau 6 : Solution métaux (adapté d'après Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962)

Component	Primary stock solution (g.L-1)	Quantity	Molar concentration in final medium (M)
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	-	4.36 g	1.12*10 ⁻⁴
FeCl ₃ , 6H ₂ O	-	3.15 g	1.17*10 ⁻⁵
NaMoO ₄ , 2H ₂ O	6.3	1 mL	2.60*10 ⁻⁸
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	22.0	1 mL	7.65*10 ⁻⁸
CoCl ₂ , 6H ₂ O	10.0	1 mL	4.20*10 ⁻⁸
MnCl ₂ , 4H ₂ O	180.0	1 mL	9.10*10 ⁻⁷
CuSO ₄ , 5H ₂ O	9.8	1 mL	3.92*10 ⁻⁸

Tableau 7 : Solution de vitamine pour le milieu f/2 (adapté d'après Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962)

Component	Primary sotck solution (g.L-1)	Quantity	Molar concentration in final medium (M)
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	1	1 mL	3.69*10 ⁻¹⁰
Biotine (vit. H)	0.1	10 mL	2.05*10 ⁻⁹
Thiamine HCl (vit. B ₁)	-	200 mg	2.96*10 ⁻⁷

L'eau de mer naturelle prélevée à la sortie du bassin d'Arcachon (plages de la Lagune et du Petit Nice, La Teste de Buch) est vieillie à l'obscurité pendant au moins 3 mois à 22°C. La NSW est filtrée sur 1.2 µm (GF/B Whatman) avant ajout des composés. Le milieu f/2 (NSW ou ASW) est fliré sur 0.2µm (nitrate de cellulose, Whatman) avant autoclavage (110°C, 30 min).

De la même manière que l'eau de mer naturelle, l'eau ASW est supplémentée aux concentrations, Après autoclavage, une solution de NaHCO_3 est ajoutée pour une concentration finale de 0.21 g.L^{-1} . Le pH de l'eau de mer artificielle est ajusté stérilement entre 8.12 et 8.25 et abaissé à 7,1 pour les expériences de marquage à l'acéate radiomarqué, avec des solutions de NaOH 4M et HCl 10% filtrées sur $0.22 \mu\text{m}$. La salinité de la solution est vérifiée au réfractomètre (3,5 %).

1.2.2 Paramètres physiques de culture

La souche sauvage OTH95 est cultivée en Erlenmeyer (voir tableau ci-dessous) et maintenue en permanence en agitateur-incubateur New Brunswick Innova 42R, 20°C , lumière continue $75 \mu\text{E}$ (Sylvania Gro-Lux, 15 W X 8), 85 RPM. Le spectre des néons est indiqué figure 31. L'installation de néons de spectre similaires dans l'espace de culture *Ostreococcus* a été réalisée.

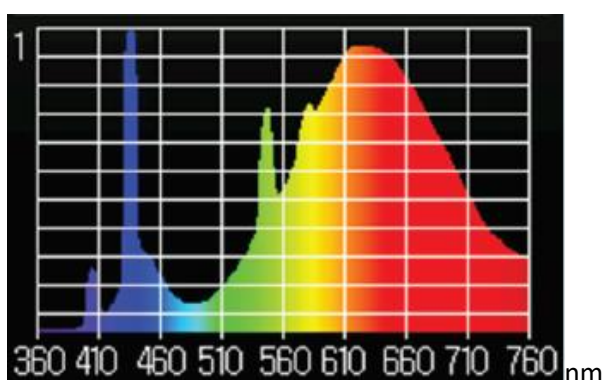


Figure 31 : Spectre des néons pour la culture d'*Ostreococcus*.

Pour des questions d'encombrement dans les incubateurs innova et des autres espaces de culture ainsi que de logistique globale (repiquage, axénisation, criblage, cinétique demandant beaucoup de matériel), nous avons été amenées à utiliser différents contenants de culture dont les caractéristiques et les usages sont indiqués dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Caractéristiques et usage des contenants de culture

Container and total volume (mL)	Culture's volume (mL)	Use
Erlenmeyers (250 mL)	100	Axenisation, maintenance
Erlenmeyers (500 mL)	200	Current, lipid biomass
Erlenmeyers (1000 mL)	400	High biomass preparation
Flask T25 (70 mL)	20	Maintenance, FAME screening, radioactive labelling
Flask T75 (290 mL)	100	RNA biomass
Flask T125 (730 mL)	300	RNA and lipid biomass

Les cultures en flasques de culture ventilées (verticales) ont été utilisées pour un gain de place. Le tableau 8 récapitule les volumes de ces flasques et les volumes de culture permettant une croissance

convenable. On notera que les échange gazeux et l'éclairage théoriques des volumes cultivés varie sensiblement entre les différentes conditions (Tab. 9).

Tableau 9 : Caractéristiques d'éclairage et d'échanges gazeux des cultures.

Les volumes couramment cultivés dans chaque flasque sont soulignés.

Flask	Total volume (mL)	Culture volume (mL)	Air/liquid surface (cm ²)	Ratio surf./ culture vol.	Light exposed surface of culture t (cm ²)	Ratio light surf. / culture vol.
T25	<u>70</u>	<u>20</u>	<u>10,12</u>	<u>0,51</u>	<u>32,9</u>	<u>1,65</u>
T25	70	30		0,31	40,7	1,36
T75	290	50	25,3	0,51	69,68	1,39
<u>T75</u>	<u>290</u>	<u>100</u>		<u>0,25</u>	<u>114,08</u>	<u>1,14</u>
T75	290	150		0,17	158,48	1,06
<u>T125</u>	<u>730</u>	<u>300</u>	<u>39,5</u>	<u>0,13</u>	<u>246,75</u>	<u>0,82</u>
T125	730	400		0,10	282,27	0,71

2 Méthodes cellulaires

2.1 Analyse en cytométrie de flux

Pour chaque échantillon 1mL de culture cellulaire est fixé par l'ajout de 10µl de glutaraldéhyde (Sigma, G625-100mL, grade II, 25%) Les échantillons sont dilués au 1/100^{ème} dans de l'eau mQ additionnée ou non de SYBR[®] green I, d'un intercalant de l'ADN (Sigma, S9430-5mL 10 000X). Un minimum de 800 µL d'échantillon est nécessaire pour analyser les échantillons sur le cytomètre en flux (CyFlow PARTEC). L'utilisation du laser bleu permet d'exciter l'échantillon à 488 nm. Les paramètres de réfraction du laser sur l'objet et de fluorescence de l'objet renseignent sur ses propriétés. Pour *Ostreococcus* nous nous servons des paramètres de réfractances du laser indicateur de taille (FSC pour Forward scatter), de granulométrie (SSC pour Side Scatter) et de l'autofluorescence de la chlorophylle (fluorescence rouge-FL2) et de la fluorescence du marquage de l'ADN par le SYBR-Green (Fluorescence verte- FL1). Les paramètres sont les suivants pour un comptage optimum : gain FSC = 200 ; gain SSC = 280 ; gain fl1 = 470 ; gain fl2 = 490; vitesse = 3 (µl.s⁻¹) sur une échelle log3; temps de pré-run = 2 s ; temps de stabilisation 10 s.

2.2 Changement de milieu de culture

Lors d'expériences de carence ou de charge-chasse (pulse-chase) nécessitant un changement de milieu, les cellules sont récoltées délicatement en tubes de 50 mL par une première centrifugation (4 000 g, 10 min, 10°C). Le surnageant est éliminé par inversion et les cellules sont lavées par resuspension dans une

vingtaine de mL de nouveau milieu (carencé ou froid). L'ensemble est lavé une sonde fois. Les cellules sont resuspendues délicatement dans le milieu désiré avant d'être remises en culture. L'acide pluronique (F 127 sigma, concentration final 0.05%) utilisé pour éviter les dommages hydrodynamique est utilisé lors de la première centrifugation

2.3 Récolte

Selon les expérimentations ultérieures envisagées, la biomasse à récolter pour des cultures d'une densité de 30×10^6 cellules minimum correspond aux volumes suivants:

- ARN : 45 mL minimum par point
- Extrait lipidiques pour TLC : 180 mL
- Dosage direct des AG totaux : 45mL (25 mL possible pour une culture concentrée)
- Analyse des Acyl CoA : 90 mL
- Microscopie : 50 mL

La récolte doit se faire rapidement et sur la glace. Deux centrifugation successives sont nécessaires: la première (vol de 15 à 200 mL, 4 400 g, 10 min, 4°C) permet de concentrer le matériel pour le centrifuger en microtubes à haute vitesse (12 000 g, 5 min, 4°C) pour enlever le maximum de liquide. Le matériel est rapidement pesé si nécessaire avant utilisation directe ou congélation en azote liquide et préservation à -80°C

Le protocole de récolte pour la microscopie est différent car il ne permet pas la conservation des échantillons et nécessite des précautions supplémentaires afin que les cellules subissent le moins de dommages. Après une première centrifugation (5000g, 1 min, 4°C) le culot cellulaire est délicatement resuspendu dans le milieu additionné de 10 % de Ficoll 70 kD (cryoprotectant) avant d'être à nouveau culoté (5000g, 1 min, 4°C). Le culot lâche est repris dans le volume d'eau subsistant après cette centrifugation. 2 µl de ce culot sont prélevés à la pipette coupée pour la suite de la préparation (Degraeve-Guilbault et al., 2017).

3 Méthodes biochimiques

3.1 Obtention de l'extrait lipidique

L'extraction des lipides est réalisée dans des solutions de solvants organiques plus ou moins polaires qui après addition d'une solution aqueuse permettent la répartition des lipides dans la phase organique. La combinaison la plus utilisée est à base de chloroforme, méthanol, eau. Le protocole ci-dessous a été adapté de la méthode de Folch et al., (1957) pour obtenir un rendement d'extraction de 95% minimum,

évalué par le dosage des FAMES restant dans le culot d'extraction ainsi que le dosage des FAMES issu de l'extraction directe de la biomasse. La dégradation des lipides a été estimée par TLC sur la base de la présence de FFA, PA. L'hydroxytoluène butylé (BHT) est utilisé comme antioxydant dans tous les solvants à 0.005% (solution stock 25mg/ml éthanol 1000X concentrée).

L'extraction est réalisée en deux temps sur des culots correspondant à 180 mL de culture de densité cellulaire variant de 3 à 12×10^7 cellules/mL⁻¹. La première extraction en méthanol (0.5 ml) par broyage au tissu lyser après ajout de deux billes de verre de 3 mm (5 cycles 30 s, à 30 Hz, 30 s de pause). L'extraction se poursuit par addition de 1mL de chloroforme BHT (chloroforme/méthanol final 2/1 v/v) et correspond à 3 nouveaux cycles au tissu lyser. (3 cycles). Après centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) le surnageant est réservé dans un tube à vis en verre et le culot est ré-extrait dans par 0.75mL de chloroforme : méthanol 2/1 (v/v). L'ensemble des surnageants, soit 4.5 mL, est réuni.

La séparation de phase est réalisée par l'addition de 0.25 volume (1.125 mL) d'une solution aqueuse (0.9% NaCl, 50 mM Tris, pH7) suivie d'une agitation de l'échantillon et de sa centrifugation (3 000 g, 5 min). La phase inférieure organique est collectée tandis que la phase supérieure aqueuse est réextraite par agitation avec 1 mL de chloroforme. Les phases organiques sont réunies.

La phase organique totale est ensuite lavée avec 0.25 volume (6,25 mL) d'une solution de méthanol/ solution aqueuse (0.9% NaCl, 50 mM Tris, pH7) 1/1 (v/v). Après agitation et centrifugation (3 000 g, 5 min) la phase inférieure organique contenant les lipides est récupérée et concentrée par évaporation sous azote puis resuspendue dans 150 µL de chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) BHT. On obtient généralement environ 20 µg de lipides/mg de biomasse fraîche ou, de manière plus pratique par rapport au volume cellulaire : 5µg de lipide/mL de culture à une concentration d'environ 6×10^7 cell/mL ou 83ng/million de cellules.

3.2 Chromatographie en couche mince

L'étude de l'identité des classes lipidiques et de leur spécificité en FAs (profils de FAs et régiolocalisation) nécessite leur séparation par migration en chromatographie sur couche mince ou Thin Layer Chromatography (TLC) à haute performance (HP) (Merk, Silica gel 60 F₂₅₄). La plaque est préalablement lavée par une migration dans du chloroforme afin d'éliminer les contaminants apportés par la silice. En fonction du type de séparation souhaitée, différents paramètres tels que : la quantité de lipides par surface de dépôt, le contrôle de l'hygrométrie ou de la saturation dans la cuve de migration, sont à ne pas négliger afin d'optimiser les migrations et de permettre leur reproductibilité et leur analyse ultérieure.

Le dépôt des lipides est réalisé manuellement pour les 2D : 300 à 400 µg d'extrait lipidique (soit environ 1/3 d'extrait lipidique issu de 180 ml de culture (densité cellulaire généralement comprise entre de 20 à

60.10⁶ cellules/mL) sont déposés par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur et sont séchés sous flux d'azote entre chaque dépôt. Pour les 1D, l'extrait lipidique est déposé automatiquement (linomat V Camag). Pour des cellules en fin de phase exponentielle ne contenant que peu de LN, l'échantillon lipidique total est partagé : environ 300 µg (1/3) pour les lipides polaires (LP) et environ 600 µg (2/3) pour les lipides neutres (LN) ; tous sur une bande de 22 mm de large.

Les migrations des LN sont réalisées en 1D avec un mélange hexane/éther diéthylique/acide acétique [30/5/0.66, (v/v/v)] après 10 min de saturation. Les migration des LP en 1D sont réalisées à partir d'un mélange chloroforme/acétate/isopropanol/méthanol/KCl0.25% [10/10/10/4/1.6, (v/v/v/v/v)] de Mock and Kroon (2002), permettant de bien séparer les bêtaïne-lipide du PDPT. Un mélange aux proportions différentes, 10/10/10/4/3.6 (v/v/v/v/v), et donc qui contient plus de sels, a été utilisé occasionnellement pour séparer les phospholipides. Enfin, les migration polaire en 2D font intervenir les mélanges de solvant suivants : Sens 1, chloroforme/méthanol/eau [65/25/4, (v/v/v)] (Abida et al., 2015) ; sens 2, chloroforme/méthanol/isopropylamine/ammoniac [11/7/0.095/0.95, (v/v/v/v)], mélange modifié d'après Abida et al. (2015). Toutes les migrations polaires, 1D et 2D, ont été réalisées à hygrométrie contrôlée ajustée à 33% (ADC2 Camag) avec un temps de pré-séchage de 5 min et une migration sur 85 mm. 30 ml de solvant est utilisé dans la cuve CAMAG réparti en 1/3 dans le compartiment où est plongée la plaque et le reste dans l'autre compartiment.

3.3 Identification des classes lipidiques

3.3.1.1 Colorations

Tableau 10 : Protocoles d'utilisation des différentes colorations

Coloration	Utilisation
Primuline	Plonger la plaque à vitesse constante dans 200mL de solution de primuline à 3% (v/v) dans du TBS 1X (Solution stock de primuline 1g.L ⁻¹ dans acétone 10%, v/v) Rinçage 30 s dans du TBS Séchage sous la hotte au sèche-cheveux en mouvement. Révélation sous UV à 366 nm.
Bleu de molybdène	Pulvériser le bleu de molybdène prêt à l'emploi (Sigma) Coloration instantanée
Ninhydrine	Pulvériser la solution de ninhydrine prête à l'emploi (Sigma/Macherey-nagel) Au four à 110°C jusqu'à apparition de tâches roses
Anthrone	Pulvériser la solution d'anthrone (1.7% (m/v) d'anthrone (Sigma) dans de l'acide sulfurique 80%) par un sprayeur en verre Au fur à 110°C jusqu'à apparition de tâches sombres
Dragendorff	Pulvériser le réactif Dragendorff prêt à l'emploi (Macherey-nagel) Coloration instantanée

Après migration HPTLC, les colorations spécifiques, permettent de bien appréhender les classes de lipides présents dans l'échantillon (Tab. 10) Cependant, de par leur seuil de sensibilité et leur spécificité, elles ne permettent pas toujours de conclure sur la nature des lipides avec certitude.

3.3.1.2 Spectrométrie de masse trappe ionisation électrospray (avec J. Jouhet)

L'analyse en spectrométrie de masse à ionisation par électrospray permet de lever l'ambiguïté sur la nature des lipides.

Après séparation en TLC 1D (neutre) et 2D (polaire), les lipides sont élués selon le protocole d'Abida et al., 2015). Sur chaque tâche de lipide grattée sur la silice, sont ajoutés 2.25 mL de chloroforme : méthanol 2/1 (v/v) puis 600 µL d'eau puis l'ensemble est agité. L'extraction de phase est réalisée en ajoutant à l'échantillon 750 µL de chloroforme et 700 µL d'eau suivi d'une centrifugation (1 000g, 5 min) après agitation. La phase inférieure contenant les lipides est collectée tandis que la phase supérieure est ré-extraite par l'ajout de 1mL de chloroforme. Après une nouvelle séparation de phase organiques sont réunis avant d'être évaporées sous flux d'azote.

Les lipides purifiés sont repris dans du méthanol acétate d'ammonium 10 mM pour être introduits par infusion directe dans un spectromètre à trappe d'ion (LTQ-XL Thermo Scientific). Le volume de reprise est ajusté pour obtenir l'intensité signal optimal pour chaque classe de lipide afin de pouvoir les identifier par comparaison avec des standards. Dans ces conditions, les ions sont principalement des induits H_2 , H^+ , NH_4^+ ou Na^+ . Les lipides sont identifiés en analyse MS2 d'après leur précurseur ou selon leur perte neutre d'après les références par Abida et al. 2015.

3.3.1.3 Indentification et quantification des FA en chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

Les esters méthylés d'acides gras (FAMES) permettent de doser les FA soit directement à partir de la biomasse ("FAMES direct"), soit à partir de 10 µL l'extrait lipidique brut (soit environ 60 µg de lipides) ("FAMES indirect") ou à partir des lipides séparés par TLC.

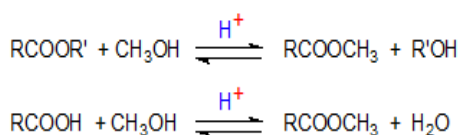


Figure 32 : méthyse acide de acides gras

Les FA libres sont estérifiés et les O-acyl-lipid transesterifiés et présence de méthanol anhydrique chaud et d'un réactif acide qui sert de catalyseur. On obtient des FA estérifié par un groupement méthyle ou FAMES pour Fatty Acid Methyl Esters. Il est indispensable de réduire au maximum la présence d'eau dans la biomasse culotée fraîche car l'eau inhibe le déroulement de la réaction.

La préparation des FAMES est adaptée de (Domergue et al., 2002). La réaction se fait sur le culot, l'extrait lipidique ou la silice grattée par addition 2mL de méthanol, d'acide sulfurique 2%, BHT 0.005% standard interne C17 (solution stock 10 mg.mL⁻¹ méthanol) pour une quantité finale de C17 de 5µg (FAMES direct) ou 2.5 µg (FAMES indirect) et chauffe en bloc à 80°C pendant 1h (Fig. 32). Ces

conditions sont suffisantes pour avoir une réaction totale sans oxyder les VLC-PUFAs. Les échantillons sont refroidis à température ambiante et la séparation de phase s'effectue en ajoutant 2mL d'eau puis 2mL d'hexane BHT et les échantillons sont secoués vigoureusement pendant 30 s. Une centrifugation (3300 g, 5 min) permet d'accélérer la séparation de phase: la phase supérieure hexane contient les FAMES est soigneusement prélevée en évitant toute contamination de l'interface contient les protéines et les polysaccharides dans le cas des extraits directs. La phase organique est concentrée par évaporation sous azote et reprise dans 100 µL d'hexane

Sous forme méthylée les acides carboxyliques ont une polarité réduite qui diminue leur adsorption et permet de les séparer en fonction de leur pression de vapeur (point d'ébullition) sur colonne de chromatographie. L'injection de 4µl sur la colonne de chromatographie à phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG-FID, Hewlett-Packard 5890 series II; Agilent, colonne Carbowax Alltech 15 m X 0.53-mm X 1.2-mm) permet une séparation et une analyse satisfaisante. Le temps de rétention de chaque molécule dépendant de son nombre de carbones et d'insaturations, les FAMES des échantillons sont identifiés grâce à la comparaison de leur temps de rétention avec celui de standards (Supleco, PUFA-1 et PUFA-3/ 37 composants mix, Sigma). La quantification de chaque molécule est réalisée par le calcul la surface des pics détectée et par proportion par rapport à celle obtenue pour le standard interne C17 de quantité connue.

3.3.1.4 Analyse positionnelle des FA en spectrométrie de masse (avec J. Jouhet)

La spectrométrie de masse à ionisation par électrospray (ESI-MS) détermine les espèces moléculaires au sein de différentes classes de lipides allant jusqu'à l'analyse positionnelle de leurs FA. L'intensité du signal permet également de comparer différents échantillons via une quantification relative de chaque espèce au sein d'une classe lipidique.

Une fois les échantillons préparées (Matériel et méthode, §3.3.2.1), le positionnement des FA des sur les carbones du squelette glycérol numérotés suivant la nomenclature de la position stéréospécifique (*sn*) est réalisé en MS2 (LTQ-XL Thermo Scientific). Selon la nature du glycérolipide et le type d'induits, les chaînes acyles en position *sn*-1 (ou *sn*-3) et *sn*-2 sont clivées différemment quand elles sont soumises à de faibles énergies de collision induisant leur dissociation. Cela se reflète dans l'analyse MS2 par la perte préférentielle d'un ou deux FA, conduisant à une abondance dissymétrique des fragments obtenus. Les motifs de fragments MS2 ont été analysés d'après la méthode utilisée dans les travaux d'Abida et al. (2015) sauf pour l'analyse positionnelle du PDPT réalisée à partir des induits obtenus en mode négatif basée sur la PC (Degraeve-Guilbault et al., 2017).

3.3.1.5 Quantification des espèces moléculaire de classes lipidique en chromatographie liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse (avec J. Jouhet)

La quantification relative des espèces moléculaires de chaque classe lipidique est possible directement sur extrait lipidique via une séparation en chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et une quantification par ESI-MS/MS comme décrit dans Jouhet et al., (2017).

Les classes lipidiques sont séparées par le système HPLC (Agilent 1200 HPLC) à 40°C sur une colonne de 5 µm de diol, 150 mm × 3 mm (longueur × diamètre interne) (Macherey-Nagel). La phase mobile est constituée d'un mélange hexane/isopropanol/eau/acétate d'ammonium 1M, pH5.3 [625/350/24/1, (v/v/v/v)] (A) et isopropanol/eau/acétate d'ammonium 1M, pH5.3 [850/149/1, (v/v/v)] (B). Les extraits lipidiques de 25 nmol d'acides gras totaux sont dissouts dans 100 µL de chloroforme/méthanol [2/1, (v/v)] contenant 125 pmol de chaque standard interne. Le volume d'injection est de 20µL et correspond à 5 nmol d'acides gras totaux ; chaque échantillon a été injecté 3 fois en réplicat technique.

La méthode de quantification des différentes combinaisons a été créée à partir des espèces moléculaires répertoriées en ESI-MS (paragraphe précédent) en intégrant également des standards internes de composition et de quantité connue pour chaque lipidique. Le standard DAG 18:0-22:6 est utilisé pour les DAG, TAG, MGDG et DGDG ; le standard PE 18:0-18:0 pour la PE et le standard SQDG 16:0-18:0 pour le PG, le PDPT le DGTA et le SQDG.

Les différentes classes de glycérolipides sont éluées successivement en fonction de leur tête polaire. Les espèces moléculaires sont donc identifiées en fonction de leur temps de rétention et des transitions enregistrées correspondant soit à la perte de la tête polaire soit à la perte de chaque FA. Les analyses de spectrométrie de masse sont faites par un spectromètre de masse à triple quadrupole 6460 (Agilent) équipé d'une source ionique à électrospray Jet stream. Les spectres sont ensuite processés par le logiciel MassHunter Workstation (Agilent). La quantification est effectuée à partir des standards internes et permet de comparer différents échantillons via une quantification relative de chaque espèce au sein d'une classe lipidique. Cependant chaque lipide s'ionise différemment d'un autre ; un facteur correctif basé sur une analyse en GC-FID non encore établi pour *O. tauri* sera nécessaire afin de comparer les quantités de chaque lipide les uns par rapport aux autres.

3.4 Analyse des Acyl-CoA (R. Haslam et O. Sayanova)

Les acyl-CoA sont extraits et analysés en LC-MS selon le protocole de Larson and Graham (2001) comme mentionné dans (Degraeve-Guilbault et al., 2017).

3.5 Charge des lipides à l'acétate radiomarqué (avec F. Corellou et D. Coulon)

Les cellules cultivées en 3*400 mL sont concentrées 6 fois en phase exponentielle par centrifugation (4000g, 10 min, 4°C) en 200 mL. Elles sont alors incubées avec 160 µL de ¹⁴C acétate (Perkin Elmer, NEC 084H001MC) pendant 4h (charge). Les cellules sont ensuite débarrassées du précurseur chaud par deux lavages successifs (Matériel et méthode, §2.2) et resuspendues dans 800mL (4*200 mL) de milieu froid contrôle (ASW 10N10P) ou carencé en azote (ASW 0N10P) (chasse).

A 0h, 3, 9, 24 et 48h, 200 mL des deux types de cultures sont récoltées (Matériel et méthode, §2.3) à partir desquels sont extraits les lipides (Matériel et méthode, §3.1) qui sont déposés et sont séparés sur HPTLC (Matériel et méthode, §3.2).

4 Méthodes de biologie moléculaire

4.1 Extraction des acides nucléiques

L'extraction est l'étape la plus importante de tous les protocoles de purification. Elle peut être plus difficile si elle fait intervenir des solvants qui provoquent l'agglomération du matériel et/ou 'sèche' les microalgues comme l'isopropanol. Les kits d'extraction d'ADN et d'ARN QIAGEN sont les plus adaptés à *Ostreococcus*. L'extraction d'ARN est plus aisée que celle de l'ADN génomique qui nécessite d'insister sur l'étape d'extraction. On utilise $1 \cdot 10^9$ à $2 \cdot 10^9$ cellules de pour réaliser ces extractions.

- Pour l'extraction d'ADN il est préférable de travailler sur des échantillons frais. La libération de l'ADN à partir des tissus est réalisée par l'addition de 350µL de solution A préchauffée à 65°C. L'échantillon est broyé 3 fois 30s à 30Hz au tissu lyser avec 3 billes en verre de 3 mm (Merk) et est incubé 10 min à 65°C. 50µL de solution B également préchauffée à 65°C sont ensuite ajoutés et l'échantillon est à nouveau passé au tissu lyser et incubé à 65°C comme précédemment. 50U de RNase A (Sigma) sont ajoutés puis l'échantillon est traité selon le protocole détaillé du fabricant.

- Les ARN totaux sont extraits avec le kit RNA easy plant mini (Qiagen) en utilisant le tampon d'extraction RLT. Les contaminants ADN sont éliminés par au moins 3 traitements des échantillons à la DNAase (Ambion) en suivant les recommandations du fournisseur.

-Les plasmides bactériens d'intérêt sont extraits à partir de 1.5 à 4 mL de culture bactérienne avec les kits GenElute Plasmid Miniprep (Sigma) ou NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les protocoles fournis.

- Les préparations de plasmide pOtOX-Luc sont réalisées avec des kits midi et maxi-prep (Machinerey -Nagel ou Promega).

4.2 RT-qPCR

4.2.1 Transcription inverse

La rétro-transcription (RT) permet de synthétiser les ADNc à partir d'ARNm totaux extraits traités à la DNase (Ambion) selon le protocole du fournisseur. L'absence d'ADN génomique restant a été vérifié par PCR. La RT est effectuée sur 1 µg d'ARN totaux à l'aide du kit iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) selon les recommandations du fournisseur. Par manque de matériel, certaines RT ont été réalisées en se basant sur la quantité de l'échantillon le plus faiblement concentré de la manipulation.

4.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui amplifie in vitro des fragments spécifiques d'ADN définis par un couple d'amorces peut être réalisée directement sur des ARN (vérification de la non-contamination par de l'ADN avant la RT) ou après transcription inverse des ARN en ADNc (vérification de l'efficacité de la RT ou préparation d'insert pour le clonage), ou directement sur de l'ADN génomique (pour comparaison avec ADNc).

Les clonages nécessitant une enzyme à haute fidélité et le génome d'Ostreococcus étant riche en GC, le mélange réactionnel d'une PCR est composé de :

- 10 µL de tampon Q5 5X
- 10 de solution enhancer high GC
- 1µL de dNTP (10 mM),
- 2.5 µL de chaque amorce (10µM) (Annexe 2)
- 0.5 µL de matrice (ADNg et ANDc)
- 0.5 Taq polymérase Q5 hot start ()
- 23 µL d'eau (QSP 50µL)

Le programme PCR utilisé a été fonction des expérimentateurs K. Tüphile ou F. Corellou :

- Dénaturation initiale : 98°C (2min)
- Amplification sur 30 cycles
 - o Dénaturation : 98°C (20s)
 - o Hybridation et élongation : 70/72°C (1min30/ temps variable) ou étape d'hybridation à une température inférieure selon le Tm d'hybridation calculé sur le site NEB
- Elongation finale : 70/72°C (7min)

Les fragments d'ADN obtenus par PCR sont purifiés sur gel avec le kit Monarch DNA Gel Extraction (Biolabs) avant d'être clonés.

Après transformation des bactéries, le mélange réactionnel des PCR sur colonies de vérification (lorsque la vérification des transformant a été vérifié par PCR avec K. Tophile) de l'efficacité de transformation est le suivant :

- 6 µL de tampon Q5 5X
- 6 µL de solution enhancer high GC
- 0.6 µL de dNTP (10 mM)
- 1.5 µL de chaque amorce (10 µM) (Annexe 2)
- 0.3 µL de Taq polymérase Q5
- 1 à 6 colonie(s) pour matrice
- 14.1 µL d'eau (QSP 30 µL)

Le programme PCR utilisé est alors :

- Dénaturation initiale : 98°C (1 min)
- Première amplification sur 5 cycles
 - o Dénaturation : 98°C (20s)
 - o Hybridation : 55°C (20 s)
 - o Elongation : 72°C (2 min)
- Elongation : 72°C (5 min)
- Dénaturation : 98°C (30 s)
- Sonde amplification sur 30 cycles
 - o Dénaturation : 98°C (20 s)
 - o Hybridation : 52°C (20 s)
 - o Elongation : 72°C (2 min)
- Elongation finale 72°C (5 min)

4.3 Suivi d'expression de gènes en PCR quantitative (J. Joubès)

Grâce à une émission de fluorescence, la quantité d'ADN amplifié au fur et à mesure de la réaction de PCR quantitative (qPCR) est mesurée à chaque cycle et donc en temps réel. La quantification repose sur ces Ct grâce des droites d'étalonnage réalisées à partir de dilutions en série (au 1/4) d'un mélange d'ADNc (2µg/µL) et qui fournissent l'efficacité de la réaction de qPCR pour chaque couple d'amorces. L'expression du gène d'intérêt est alors relative car rapportée à l'expression stable d'un gène de ménage

ou à la moyenne géométrique de l'expression de plusieurs gènes (déterminés avec le logiciel NormFinder).

Les réactions de qPCR sont réalisées avec 2 µL de matrice (produit de RT dilué au 1/10 et ARN non RT à la même concentration) dans 20 µL de mélange de réaction contenant 10 µL de SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) et 250 nM de chaque amorce sens et anti-sens (Annexe 3). Pour chaque point (point de gamme ou échantillon) des triplicats techniques sont réalisés.

4.4 Clonage et Transformation

4.4.1 Clonage pour surexpression en système homologue (avec F. Corellou et K. Tuphile)

Le clonage permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur en vue d'une transformation permettant sa multiplication dans des bactéries.

Chaque séquence codante flanquée à ses extrémités de sites de restriction AvrII en 5' et ApaI en 3' ou l'un des deux aux deux extrémités si nécessaire (amplifiée et purifiée (Matériel et méthode, §4.3.2) est insérée dans le plasmide pGEM-T easy selon le protocole du kit pGEMt-easy Vector system I (Promega).

La souche d'*E.Coli* DH5α (Invitrogen) rendue thermocompétente par un traitement au chlorure de calcium (0.1M) est transformée avec le produit de ligation. La transformation est réalisée avec 10- 50ng de ligation pour 50 µL de cellules. Celles-ci sont incubées dans la glace (30min) puis soumises à un choc thermique (45 s à 42°C) avant d'être reprise dans 1ml de milieu riche NaCl 10 g.L⁻¹, tryptone 10 g.L⁻¹, yeast extract 5 g.L⁻¹ ; pH=7.5) ou de LB 2X. Après incubation pendant 45 min à 37°C sous agitation. 100 µl et 900µl des suspensions bactériennes sont étalées en boîtes de pétri sur du milieu LB solide (LB liquide, agar à 1.5% (p/v) supplémenté d'ampicilline (100µg.mL⁻¹), d'IPTG (0.3 mM) et de X-Gal (80 µg.mL⁻¹) et incubées toute la nuit à 37°C.

La sélection des clones bactériens transformés est réalisée sur un crible blanc/bleu reposant sur la présence dans le plasmide pGEMT d'une cassette lacZ codant les deux peptides alpha et omega d'une β-galactosidase. En présence de son inducteur l'IPTG, la β-galactosidase métabolise le substrat X-Gal et confère une couleur bleue aux colonies transformées non recombinées. Par contre, la recombinaison d'un insert dans le plasmide inactive le gène LacZ-alpha rendant non fonctionnelle la β-galactosidase. Les colonies transformées recombinées sont blanches et peuvent être criblées par PCR pour vérifier la séquence de l'insert (Matériel et méthode, §4.3.2).

Les colonies blanches sont cultivées à 37°C dans du LB liquide supplémenté d'ampicilline, l'ADN plasmidique est purifié (Kit promega), les clones positifs sont vérifiés par PCR avec les primers adéquats et envoyés en séquençage. Les clones contenant la séquence correcte correspondante à celle publiée

dans les banques sont conservés en milieu glycerolé et servent à la production du fragment désiré flanqué des sites des restriction qui est purifié sur gel après digestion par les enzymes adéquates et ligué au vecteur d'expression pOtoxLuc (Fig. 33) préalablement ouvert et déphosphorylé pour éviter une religation sur lui-même et purifié sur gel. Pour l'expression chez *O. tauri*, le vecteur pOtoxLuc est linéarisé purifié et concentré par précipitation à l'éthanol avec 1µg de tRNA de levure pour 7µg de construction et repris dans de l'eau ultrapure exempte de DNase RNase pour une concentration finale de minimum 1µg/µl. 7µl sont utilisés pour une transformation. Alternativement il est possible d'éliminer la partie non nécessaire du vecteur qui représente environ 2,5 kb. Ceci nécessite la digestion d'une quantité importante de vecteur et la purification du fragment d'intérêt après séparation sur gel.

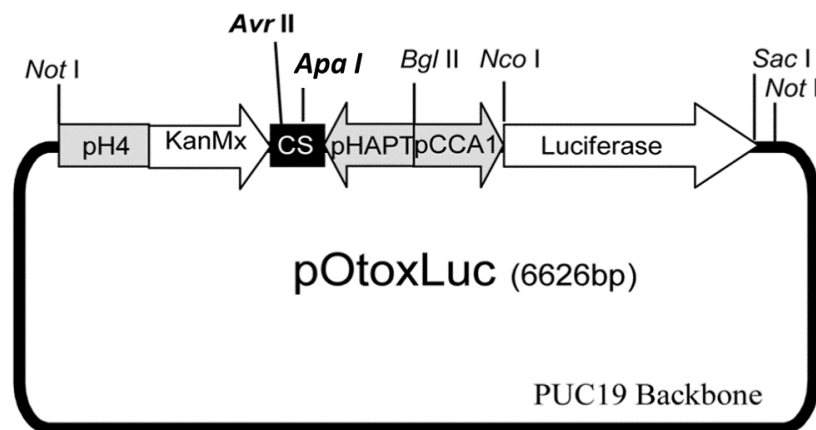


Figure 33 : Vecteur pOtoxLuc utilisé pour la surexpression des gènes de désaturases chez *O. tauri* (Moulager et al., 2010)

Le gène de résistance au G418, KanMx, permet la sélection des clones transformés avec le vecteur. Le gène de la luciférase permet en présence de la luciférine, l'émission *in fine* de luminescence. Ce signal est rapporteur de l'insertion du vecteur dans une zone du génome d'*O. tauri* permettant son expression. Le gène de la luciférase, rapporteur sensible, est sous la dépendance du promoteur du gène CCA1. Enfin les gènes d'intérêt sont codés grâce au site de restriction des enzymes Avr II et Apa I et se retrouvent sous la dépendance du promoteur d'un transporteur à haute affinité en phosphate (HAPT) dont l'expression est régulée en fonction de la disponibilité en phosphate : il est réprimé en présence de phosphate inorganique et induit en présence de phosphate organique.

4.4.2 Clonage Gateway pour expression en système hétérologue (F. Domergue, R. Gomez et J. Joubès)

Le clonage en système Gateway permet de contourner les blocages et limitations associés au clonage traditionnel par enzymes de restriction. Dans ce système qui repose sur la recombinaison homologe le clonage est réalisé dans un vecteur d'entrée. Les séquences clonées et vérifiées du vecteur d'entrée peuvent être transférées dans différents vecteurs destinations. L'inconvénient est la grande taille des séquences nécessaires à la recombinaison qui peuvent parfois gêner l'amplification de séquences à partir des cDNA qui selon les gènes présentent des structures secondaires.

Chaque séquence codante avec son codon stop (expression chez la levure et dans le tabac) ou sans son codon stop, (localisation dans le tabac), est flanquée à ses extrémités des amorces attB nécessaires au

clonage en Gateway Katzen (2007) par PCR puis purifiée (Matériel et méthode, §4.3.2). Le mélange BP clonase (Invitrogen) utilisé selon le protocole du fournisseur, contient des enzymes dans leur tampon qui catalysent la recombinaison *in vitro* des produits PCR (contenant les sites *attB*) avec le vecteur donneur pDONR221 contenant des sites *attP* (Invitrogen). La recombinaison homologue au niveau des sites *att* génère le plasmide d'entrée contenant les sites *attL* encadrant la séquence d'intérêt.

L'amplification de ce plasmide d'entrée nécessite la transformation de bactéries *E. coli* électrocompétentes (1.8 kV). Elles sont ensuite cultivées comme décrit dans le Matériel et méthode, §4.5.1 mais le plasmide pDONR221 apportant la résistance à la kanamycine, elles sont sélectionnées par cet antibiotique ($70 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Le vecteur multiplié est ensuite extrait des bactéries (Matériel et méthode, §4.1). Grâce au mélange LR clonase (Invitrogen) utilisé selon le protocole du fournisseur, la séquence codante est transférée par recombinaison homologue du vecteur d'entrée (site *attL*) à un vecteur de destination (sites *attR*) particulier selon l'étude :

- Pour l'expression stable chez la levure : pvt-U-GW ou pvt-L-GW.
- Pour l'expression transitoire dans le tabac : PK7W2G2D

Les plasmides pvt-U(ou L)-GW et PK7W2G2D confèrent une résistance à des antibiotiques différents, les bactéries électrocompétentes sont à nouveau transformées et sélectionnées sur milieux LB additionnés respectivement d'ampicilline ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de spectinomycine ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.5 Expression des séquences codantes de désaturases en systèmes homologue et hétérologue

4.5.1 Génération d'*Ostreococcus* surexpressseurs (F. Corellou)

Le protocole de transformation d'*Ostreococcus tauri* original a été publié et breveté (Corellou and Bouget, 2008; Corellou et al., 2009). Comme mentionné en introduction, la technique de transformation d'*O. tauri* est délicate et nécessite d'être adaptée dans chaque laboratoire. En l'absence d'optimisation, les protocoles publiés sont peu efficaces. F. Corellou souhaite que le protocole adapté aux nouvelles conditions de culture et de laboratoire reste confidentiel. Une publication ultérieure sera réalisée pour transmettre pas à pas les optimisations du protocole initial pour une technique efficace.

4.5.2 Expression des gènes de désaturases chez *S. cerevisiae* (avec F. Domergue et R. Gomez)

L'expression stable de désaturases chez *Saccharomyces cerevisiae* permet d'explorer la fonctionnalité de ces enzymes en nourrissant la levure avec différents FA. Les souches de *Saccharomyces cerevisiae*

INVSC1 (Invitrogen) sont transfectées stérilement selon le protocole de Dohmen et al. (1991). 50 mL de levures sont récoltées par centrifugation (5 000 rpm, 5 min). Le culot est repris dans 1 mL d'eau et transvasé dans un microtube pour être à nouveau centrifugé (5 000 rpm, 5 min). Les cellules culotées sont rincées avec une solution de LiAc 100 mM et à nouveau centrifugées (5 000 rpm, 5 min). Après élimination du surnageant, les composants nécessaires à la transfection sont ajoutés dans l'ordre suivant : 240 µL de polyéthylène glycol (PEG) 50%, 36 µL de LiAc 1M, 25µL de sperme de saumon ; 50 µL d'eau et 1 à 2 µL d'ADN plasmidique. Après resuspension, les cellules sont incubées 15 min à 30°C, puis 25 min à 42°C. Après une dernière centrifugation où le surnageant est éliminé à la pipette, les cellules sont resuspendues dans 100 à 200 µL d'eau et sont étalées sur boîte.

Les levures sont sélectionnées sur milieu solide minimal (drop-out powder (2 g.L⁻¹), base azotée pour levure sans acide aminé (6.7 g.L⁻¹), histidine (20 ng.mL⁻¹), leucine (100 ng.mL⁻¹) tryptophane (40 ng.mL⁻¹) et uracile (20 ng.mL⁻¹), glucose (0.05% m/v) et tergitol NP-40 (1% v/v)) ne contenant pas d'uracile (pvt-U-GW) ou pas de leucine (pvt-L-GW). Au bout de 3 jours les cellules hébergeant le plasmide apparaissent et sont pré-cultivées à 30°C dans 2 mL de milieu minimal liquide dépourvu également de leucine ou d'uracile.

Les cultures de 5 mL sont ensuiteensemencées avec 50 µL de pré-culture et après 24h à 30°C, chaque culture est supplémentée avec un acide gras approprié (500 µM). Et après 96h de croissance à nouveau, les cellules sont récoltées par centrifugation (3 000 g, 5 min) et la préparation des FAMES est réalisée directement (Matériel et méthode, §3.4.1.1) Une souche transfectée avec un vecteur vide est systématiquement utilisée comme contrôle négatif.

4.5.3 Expression transitoire de désaturases chez *N. benthamiana* (avec F. Domergue et R. Gomez)

L'étude de la localisation des désaturases et de leur fonctionnalité en système hétérologue végétal a nécessité l'agro-infiltration de plants de tabac *Nicotiana benthamiana* âgée de 5 jours.

Les séquences codantes d'intérêt sont transférées grâce à la LR clonase du plasmide pDONR221 au plasmide de destination PK7W2G2D désigné pour sur-exprimer sous un promoteur 35S le gène suivi de la séquence codante de la GFP. Pour l'observation de la localisation subcellulaire des désaturases chez le tabac, le codon stop est retiré de la séquence codante permettant l'expression du gène codant la GFP. Lorsque ce système est utilisé pour tester la fonctionnalité des désaturases c'est la séquence codante avec son codon stop qui est utilisée afin que la protéine ne soit pas gênée par le tag GFP.

Chaque vecteur d'expression résultant est transformé dans la souche chimiocompétente d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) en utilisant un protocole standard où 5µL de plasmide sont déposés sur 50µL d'A. *tumefaciens* non décongelé. L'ensemble est laissé sur la glace (5 min) puis dans

l'azote liquide (5min) et enfin à 37°C (5 min). L'expression du phénotype se fait en préculture dans 1 mL de LB incubée à 30°C pendant 2h au minimum. Les souches transformées sont étalées sur LB solide supplémenté en gentamycine (25 µg/mL) et spectinomycine (100µg/mL) (LB-GS) les gènes résistance à ces antibiotiques étant portée respectivement le plasmide propre à *A. tumefaciens* et le plasmide PK7W2G2D. Les boîtes sont cultivées à 30°C pendant 3 jours afin d'obtenir des colonies transformées isolées.

Les précultures d'*A. tumefaciens* transformées sont lancées à partir de ces colonies dans 2mL de LB-GS liquide et laissées sur la nuit à 30°C. Après incubation, les cultures sont lancées à partir de ces précultures, à une densité optique (DO) de 0.1 à 600nm dans 5mL de LB-GS. Après 4 à 6 heures de pousse lorsque la DO_{600nm} est de 0.6~0.8, les cellules sont récoltées par centrifugation (7000 rpm, 5 min). Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 5 mL d'eau stérile. La DO_{600nm} des solutions d'infiltration est ajustée ensuite avec de l'eau à 0.4 pour éviter une toxicité à l'égard de *Nicotiana benthamiana*.

Les solutions sont infiltrées sur la partie abaxiale des feuilles de tabac en utilisant une seringue en plastique d'1 mL sans aiguille comme décrit par Voinnet et al. (2003). Au bout de 5 jours où les plantes sont gardées au laboratoire, les échantillons sont récoltés en découpant deux rond d'un centimètre de diamètre dans les feuilles en utilisant une pointe de P1000.

5 Méthode d'observation

5.1 Observation d'*O. tauri* en microscopie électronique à transmission (C. Bréhélin et F. Corellou)

Du fait de leur petite taille, l'observation des cellules d'*Ostreococcus tauri* nécessite l'utilisation de la microscopie électronique. Le protocole de préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission est adapté à partir de celui de (Henderson et al., 2007).

Après récolte (Matériel et méthode, § 2.2), le culot cellulaire est resuspendu précautionneusement dans 2mL de Ficoll 70-kD 10% (GE Healthcare Biosciences) en ASW d'intérêt pour permettre la cryoprotection des cellules. L'échantillon est transféré dans des endorff de 1.5 mL pour être centrifugé (5 000g, 1min, 4°C). La majorité du surnageant est éliminé à la pipette et les ~10 µL restant permettent de resuspendre précautionneusement les cellules en tapotant du doigt. Les cellules sont ensuite gardées sur la glace et transférées dans des cupules plates puis congelées à haute pression dans un dispositif EM-PACT1 (Leica). Les échantillons sont ensuite substitués à froid par de l'acétone pur à 1% d'osmium tetroxide par le système AFS2 (Leica). Les échantillons sont maintenus à -90°C pendant 48h puis ramenés à température ambiante selon une vitesse de réchauffement de 3°C.h⁻¹ avant de les enchâsser, par

infiltration progressive, dans de la résine Spurr (Electron Microscopy Science) et polymérisés à 70°C pendant 16h. Des sections ultrafines (70 nm) sont alors obtenues par un ultramicrotome Reichert Ultracut S et observées à 80 kV avec le microscope électronique à transmission FEI Tecnai G2 Spirit TWIN 120 kV équipé d'une caméra 16-megapixel Eagle 4k CDD. Les caractéristiques cellulaires sont mesurées à l'aide par logiciel ImageJ.

5.2 Observation de la localisation cellulaire de protéines d'intérêt d'*Ostreococcus* chez le tabac (avec J. Gronnier)

L'observation de cellules de tabac exprimant transitoirement certains gènes d'*Ostreococcus* est réalisée grâce à un système de microscopie confocale à balayage laser Leica SP5 (Leica, Wetzlar, Germany) équipé sous Argon, de lasers He-Ne, de détecteur hydride et d'objectif à immersion x63.

3 jours après agro-infiltration, des échantillons de feuilles de *N. benthamiana* sont délicatement transférés dans une goutte d'eau entre lame et lamelle. Les fluorescences YFP et mcherry sont observées en utilisant des longueurs d'onde d'excitation de 488 et 561 nm respectivement et leur fluorescence d'émission est collectée de 490 à 540 nm et de 575 à 610 nm respectivement. La chlorophylle est excitée à 488 nm et l'émission de fluorescence correspondante est collectée de 710 à 740 nm. Les images de colocalisation sont prises dans un cadre en balayant séquentiellement l'échantillon. Les expériences sont réalisées en utilisant strictement des paramètres d'acquisition confocale identiques (ex : puissance du laser, gain, facteur de zoom, résolution et longueur d'onde de réception) en optimisant les paramètres du détecteur pour minimiser le bruit de fond et ne pas avoir de saturation de pixel.

Résultats et Discussion

Partie 1 : Caractérisation et dynamique des glycérolipides en carence nutritive : remodelage acyle et accumulation de TAG

Au début de ma thèse les données sur les glycérolipides d'*O. tauri* ou des espèces apparentées étaient très minces. Les profils de FA de *Micromonas pusilla* (données quantitatives) (Dunstan et al., 1992) d'*O. lucimarinus* (GC-FID chromatogramme) (Ahmann et al., 2011), de la souche de profondeur *Ostreococcus* RCC809 (Vaezi et al., 2013) (GC-FID chromatogramme) et d'*O. tauri* (données quantitatives après séparation des classes de lipides par SPE) (Wagner et al., 2010) étaient disponibles. Les traces chromatographiques entre *O. tauri* et *Ostreococcus* RCC809 publiées à l'époque sont très différentes : le chromatogramme de la souche RCC 809 montre une absence de 14:0, un pic 16:4 *n*-3 bien inférieur au pic de 16:0, un signal extrêmement faible pour le DHA et des pics 16:1, 18:1 plus élevés que celui du 18:3 *n*-3. Les données les plus informatives, qui concernent *O. tauri*, rapportent que le DHA se trouve exclusivement dans les TAG et est absent de la fraction phospholipides et galactolipides. Le 18:5 est par ailleurs annoté en tant que 20:1 (dont le temps de rétention est effectivement très proche).

Nous devons donc, avant toute chose, caractériser de manière la plus exhaustive possible les glycérolipides du modèle *O. tauri* avec le double objectif de rattraper un retard par rapport aux autres modèles microalgues utilisés dans le domaine et de rendre ce travail préalable, indispensable, le plus intéressant possible. Il était également important d'identifier le degré de conservation des caractéristiques de l'espèce modèle *O. tauri* chez les espèces voisines notamment appartenant à la même classe des Mamiellophyceae nouvellement définie comme groupe monophylétique.

Les carences en macronutriments sont largement utilisées pour provoquer l'accumulation de TAG et correspondent à la redirection de flux carboné vers les lipides. Le phosphate et l'azote sont les macronutriments majoritaires dans les océans (comme sur terre) dont le rapport a un rôle essentiel pour la répartition du phytoplancton. Le phosphate est un composant majoritaire des membranes (via les phospholipides) qui est remobilisé en carence phosphate (Van Mooy et al., 2009). L'azote est remobilisé

en carence nitrate à partir des protéines dont les protéines membranaires. Les membranes thylacoïdales sont fortement impactées car elles contiennent beaucoup de protéines (Kim et al., 2014; Martin et al., 2014). Dans les deux types de carence les fonctions photosynthétiques s'adaptent (Juergens et al., 2015; Napoléon et al., 2013; Simionato et al., 2013). Or, comme mentionné plus haut la composition lipidique (ratio de classe de lipide et composition acyles des lipides) des membranes plastidiales joue un rôle majeur pour la régulation des fonctions photosynthétiques. Nous nous sommes donc servis de ces carences pour évaluer le remodelage des classes de lipides et de la composition acyle, ainsi que pour provoquer l'accumulation de TAG chez *O. tauri* et en profiter pour étudier l'infrastructure de l'organisme dans ces conditions.

L'objectif des résultats présentés dans cette partie est donc de caractériser chez le picophytoeucaryote *Ostreococcus tauri* son glycérolipidome et sa dynamique en carence nutritive, ainsi que les voies de biosynthèse des TAG qui interviennent très probablement dans la régulation du contenu en FA des lipides structuraux. Cela s'inscrit dans l'objectif global de ce travail de thèse qui est d'étudier la dynamique des FA et la régulation du métabolisme lipidique selon des vecteurs environnementaux et de comprendre quelles sont les cibles enzymatiques potentielles de ces régulations.

La caractérisation du glycérolipidome d'*O. tauri* et de la dynamique des glycérolipides en carences nutritives a été réalisée en chromatographie à phase gazeuse (GC-FID) et spectrométrie de masse (ESI-MS/MS) et a été publiée dans l'article ci-joint (Degraeve-Guilbault et al., 2017 : Glycerolipid Characterization and Nutrient Deprivation Associated Changes in the Green Picoalga *Ostreococcus tauri*). Des résultats d'analyses complémentaires en ESI-MS/MS, RT-qPCR et marquage radioactif sont ensuite présentés pour en savoir plus sur l'origine des TAG lors de la carence azotée.

1 Article : Caractérisation des glycérolipides et changements associées aux carences nutritives chez la picoalgue verte *Ostreococcus tauri*

La picoalgue *Ostreococcus tauri* est un eucaryote photosynthétique minimal qui a été utilisé en tant que système modèle. *O. tauri* est connu pour produire efficacement du DHA. Nous avons réalisé une étude approfondie du glycérolipidome d'*O. tauri* validant cette espèce comme modèle pour les picoeucaryotes apparentés.

Les résultats principaux sont énoncés ci- après et détaillés dans l'article :

- **La composition du glycérolipidome reflète la rétention de caractères lipidiques associés au règne des Chromalveolates chez la microalgue ancestrale verte *O. tauri*.** Le bêtaïne-lipide DGTA et le phosphatidyl diméthylpropanethiol (PDPT), qui sont typiques des Chromalveolates correspondent aux lipides extraplastidiaux présumés.
- **Le DHA est un composant exclusif des lipides extrachloroplastidiaux, les C18 PUFA sont majoritaires dans les lipides chloroplastiques alors que le C16:4 est largement réparti dans les glycérolipides structuraux** et n'est pas détecté dans le pool d'acyl-CoAs. Le 18:5 est restreint aux galactolipides.
- **Les carences nutritives inhibent la désaturation des espèces 18:3n-3 de lipides plastidiaux**
- **Les TAG d'*Ostreococcus* sont hautement insaturés et "alimentés" par les lipides chloroplastiques en carence nutritive.** Les TAG présentent le panel complet des FA, et de nombreuses espèces présentent des combinaisons de FA typiques de lipides plastidiaux aussi bien qu'extraplastidiaux
- **La conversion du 18:3 en 18:4 est étroitement régulée et est inhibée en carence** dans les lipides plastidiaux les TAG et les acyl-CoA. Elle suggère un rôle physiologique important de ces FA dans les membranes photosynthétiques.

Glycerolipid Characterization and Nutrient Deprivation-Associated Changes in the Green Picoalga *Ostreococcus tauri*¹

Charlotte Degraeve-Guilbault, Claire Bréhélin, Richard Haslam, Olga Sayanova, Glawdys Marie-Luce, Juliette Jouhet, and Florence Corellou*

Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Bordeaux BP81, F-33882 Villenave D'Ornon, France (C.D.-G., C.B., G.M.-L., F.C.); Rothamsted Research, Biological, Chemistry, Harpenden AL5 2JQ, United Kingdom (R.H., O.S.); and Laboratoire de Biologie Cellulaire et Végétale, Unité Mixte de Recherche 5168, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Grenoble Alpes, BIG, Commissariat à l'Énergie Atomique-Grenoble, 38054 Grenoble cedex 9, France (J.J.)

ORCID IDs: 0000-0002-8484-2322 (O.S.); 0000-0001-8593-7684 (G.M.-L.); 0000-0001-8026-2120 (F.C.).

The picoalga *Ostreococcus tauri* is a minimal photosynthetic eukaryote that has been used as a model system. *O. tauri* is known to efficiently produce docosahexaenoic acid (DHA). We provide a comprehensive study of the glycerolipidome of *O. tauri* and validate this species as model for related picoeukaryotes. *O. tauri* lipids displayed unique features that combined traits from the green and the chromalveolate lineages. The betaine lipid diacylglycerol-hydroxymethyl-trimethyl- β -alanine and phosphatidylmethylpropanethiol, both hallmarks of chromalveolates, were identified as presumed extraplastidial lipids. DHA was confined to these lipids, while plastidial lipids of prokaryotic type were characterized by the overwhelming presence of ω -3 C18 polyunsaturated fatty acids (FAs), 18:5 being restricted to galactolipids. C16:4, an FA typical of green microalgae galactolipids, also was a major component of *O. tauri* extraplastidial lipids, while the 16:4-coenzyme A (CoA) species was not detected. Triacylglycerols (TAGs) displayed the complete panel of FAs, and many species exhibited combinations of FAs diagnostic for plastidial and extraplastidial lipids. Importantly, under nutrient deprivation, 16:4 and ω -3 C18 polyunsaturated FAs accumulated into de novo synthesized TAGs while DHA-TAG species remained rather stable, indicating an increased contribution of FAs of plastidial origin to TAG synthesis. Nutrient deprivation further severely down-regulated the conversion of 18:3 to 18:4, resulting in obvious inversion of the 18:3/18:4 ratio in plastidial lipids, TAGs, as well as acyl-CoAs. The fine-tuned and dynamic regulation of the 18:3/18:4 ratio suggested an important physiological role of these FAs in photosynthetic membranes. Acyl position in structural and storage lipids together with acyl-CoA analysis further help to determine mechanisms possibly involved in glycerolipid synthesis.

Ostreococcus tauri is a marine green picoeukaryote (<2 μ m) that has been described as the smallest eukaryote and used as a minimal photosynthetic model in the last decade. *O. tauri* belongs to the class of Mamiellophyceae (Classis nova) that dominates the picoeukaryotic phytoplankton (Marin and Melkonian, 2010). *O. tauri* displays a minimal cellular organization with only one of each organelle and has a highly

compact and small haploid genome that encodes 7,699 genes (Courties et al., 1994; Derelle et al., 2006; Blanc-Mathieu et al., 2014). *O. tauri* minimal features together with the implementation of a complete molecular toolbox encompassing efficient gene transformation and easy gene replacement by homologous recombination have promoted *O. tauri* as a unique model for functional studies (Corellou et al., 2009; Lozano et al., 2014).

The diversity of microalgae species lies far beyond that of land plants. Microalgae have representative in four of the six eukaryotic supergroups (Simon et al., 2009). The most important supergroups of microalgae are Viridiplantae (the so-called green lineage), to which land plants also belong, and Chromalveolata, which corresponds to the largest group of microalgae species. The emergence of this latter lineage arose from secondary endosymbiotic events (i.e. the engulfment of an ancestral red microalga by an ancestral non-photosynthetic eukaryote). Considering the primarily oceanic production, the importance of photosynthetic picoplanktonic species, and in particular picoeukaryotes from the green lineage, is increasingly recognized

¹ This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (grant PEPS ExoMOD) and the Region Aquitaine (project Omega-3).

* Address correspondence to florence.corellou@u-bordeaux.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: Florence Corellou (florence.corellou@u-bordeaux.fr).

C.D.-G. and F.C. performed most of the experiments; J.J. achieved mass spectrometry analysis with the contribution of C.D.-G.; C.B. and F.C. performed electron microscopy; R.H. and O.S. performed acyl-CoA analysis; G.M.-L. and F.C. adapted the protocol for the extraction and analysis of lipids of *Ostreococcus*; F.C. conceived and supervised the project and wrote the article advised by J.J.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.01467

(Vaulot et al., 2008; Massana, 2011). The ubiquitous occurrence of these organisms in oceanic systems exemplifies the ecological success of miniaturized eukaryotic cells. Due to their high surface-volume ratio, these species would be particularly well adapted to nutrient-poor environments and environmental changes (Schaum et al., 2013). The variety of lipid compounds from microalgae mirrors their diversity and is a great bioresource for novel molecules and for genes of related biosynthetic pathways (Kumari et al., 2013). Lipids of marine microalgae are of utmost importance for the oceanic ecosystems (Parrish, 2013); in particular, marine microalgae fuel the food web with long-chain (LC) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which accumulate in fish oils and are essential for immunological, reproductive, and cognitive functions in animals (Adarme-Vega et al., 2012; Gladyshev et al., 2013). Therefore, acquiring knowledge on lipid metabolism and composition from species representative of different taxons is important from both biotechnological and ecological points of view. Foremost, why marine microalgae display a highly diverse and specific panel of lipids and PUFAs compared with plants or freshwater microalgae is a fundamental issue.

Glycerolipids are the major components of biological membranes. The basics of microalgal glycerolipid metabolism remain largely inferred from terrestrial plants (Mühlroth et al., 2013; Li-Beisson et al., 2015). The C16 and C18 fatty acids (FAs) synthesized in the chloroplast are assembled into lipids in both the chloroplast and the endoplasmic reticulum (ER) through the consecutive acylations of glycerol-3-phosphate by *sn-1* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), to yield lysophosphatidic acid, and of lysophosphatidic acid by lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT), to yield phosphatidic acid (PA). In plants, chloroplastic and ER acyltransferases have different specificities for acyl donors and acyl receivers. As a result, lipids synthesized in the chloroplast by the so-called prokaryotic pathway preferentially display C16 acyl groups at the *sn-2* position of the glycerol backbone, whereas plastidial lipids synthesized from endosomal precursors (eukaryotic lipids) display a C18 acyl group in *sn-2* (Ohlrogge and Browse, 1995). PA and diacylglycerol (DAG), the latter arising from PA dephosphorylation, are the precursors of complex lipids that are built through the linkage of a polar head group at the *sn-3* position of the glycerol backbone. Plasma membranes as well as endosomal and plastidial membranes are made of different classes of glycerolipids. Plastidial lipids, conserved throughout evolution, are the galactolipids monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) as well as sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG). The importance of this lipid quartet for the organization of thylakoid membranes and photosynthetic functions, especially through their interaction with PSII, is recognized from cyanobacteria to higher plants (Boudière et al., 2014). Phospholipids (PLs), such

as phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), and phosphatidylethanolamine (PE), are major components of extraplastidial membranes (Dorne et al., 1990). Another class of structural lipids that is widespread in microalgae corresponds to betaine lipids (BLs; Dembitsky, 1996; Cañavate et al., 2016). In BLs, the polar aminoacyl head, which is either a Ser, Ala, or carboxy choline, is ether linked to the glycerol backbone instead of phosphoester linked, as in PLs. Subsequently, the synthesized BLs are called diacylglyceryltrimethylhomoserine (DGTS), diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- β -alanine (DGTA), and diacylglyceryl-carboxyhydroxymethylcholine. BLs are assumed to be the phosphorus (P)-free structural counterparts of PLs and have been located in extraplastidial membranes (Künzler et al., 1997). In *Chlamydomonas reinhardtii*, the BL synthase BTA1 was shown to be localized in the ER and to synthesize DGTS from DAG (Riekhof et al., 2005). Radiolabeling experiments previously demonstrated that DGTA was synthesized from DGTS in the microalga *Ochromonas danica* (Vogel and Eichenberger, 1992).

Nonpolar glycerolipids are DAGs and triacylglycerols (TAGs). TAG synthesis results from the acylation of DAGs at the *sn-3* position. Beyond the role of TAGs as energy storage molecules, there is growing evidence that, at least in microalgae, TAGs are a reservoir of FAs that are used for the rapid synthesis and FA remodeling of structural lipids under both standard and stress conditions (Cohen et al., 2000; Adarme-Vega et al., 2012; Yoon et al., 2012). Microalgae are known to accumulate high amounts of TAGs, in particular under adverse conditions such as nutrient deprivation, which results in cell growth cessation (Sharma et al., 2012). TAG synthesis is thought to serve as a sink for photoassimilates no longer consumed by the decreased growth metabolism. Most importantly, FA de novo synthesis would serve to replenish the pool of the electron acceptor NADP⁺ for the still ongoing photosynthesis and possibly alleviate the production of harmful reactive oxygen species.

In the last decade, renewed interest in microalgal lipids for biotechnological applications as well as the great improvement of sequencing facilities have led to an impressive increase of knowledge about lipid composition and metabolism in diverse microalga species (Khozin-Goldberg and Cohen, 2011; Heydarizadeh et al., 2013; Liu and Benning, 2013). Comprehensive studies of lipid metabolism from marine microalgae have been conducted mainly on species belonging to the supergroup chromalveolates. In particular, the diatoms *Phaeodactylum tricorutum* and *Thalassiosira pseudonana* and the eustigmatophyte *Nannochloropsis gaditana*, an oligeanous strain, garnered the most attention (Mühlroth et al., 2013; Niu et al., 2013; Peng et al., 2014; Abida et al., 2015). From the green lineage, however, the dominating model is *C. reinhardtii*, which is a terrestrial microalga from the soil, and comprehensive and functional studies of lipid metabolism from marine green microalgae remain rather scarce (Li-Beisson et al., 2015). By contrast with other

transformable marine model microalgae such as the diatoms *P. tricornutum* and *T. pseudonana*, *O. tauri* efficiently produces DHA (Wagner et al., 2010; Trentacoste et al., 2013), which makes this model attractive to gain insight into DHA biosynthetic pathways and cellular functions. Genes related to the lipid metabolism of *Ostreococcus* have been identified, and several have been characterized in heterologous hosts and used in particular for LC-PUFA pathway reconstruction (Meyer et al., 2004; Domergue et al., 2005; Hoffmann et al., 2008; Wagner et al., 2010; Tavares et al., 2011; Misra et al., 2012; Vaezi et al., 2013; Hamilton et al., 2016). However, a detailed analysis of the *Ostreococcus* glycerolipidome has never been provided. In this study, we aimed at performing in-depth characterization of the glycerolipidome of the model species *O. tauri* and at assessing whether it was representative of related species. By combining robust quantitative and high-resolution techniques as well as using nitrogen (N) and P starvation known to trigger lipid remodeling, we conducted a comprehensive analysis that revealed specific features and gave insight into the possible processes driving *O. tauri* glycerolipidome dynamics. This work lays the basis for future investigations of various aspects of lipid metabolism in this unique model organism.

RESULTS

O. tauri FA Composition Is Representative of the Class Mamiellophyceae

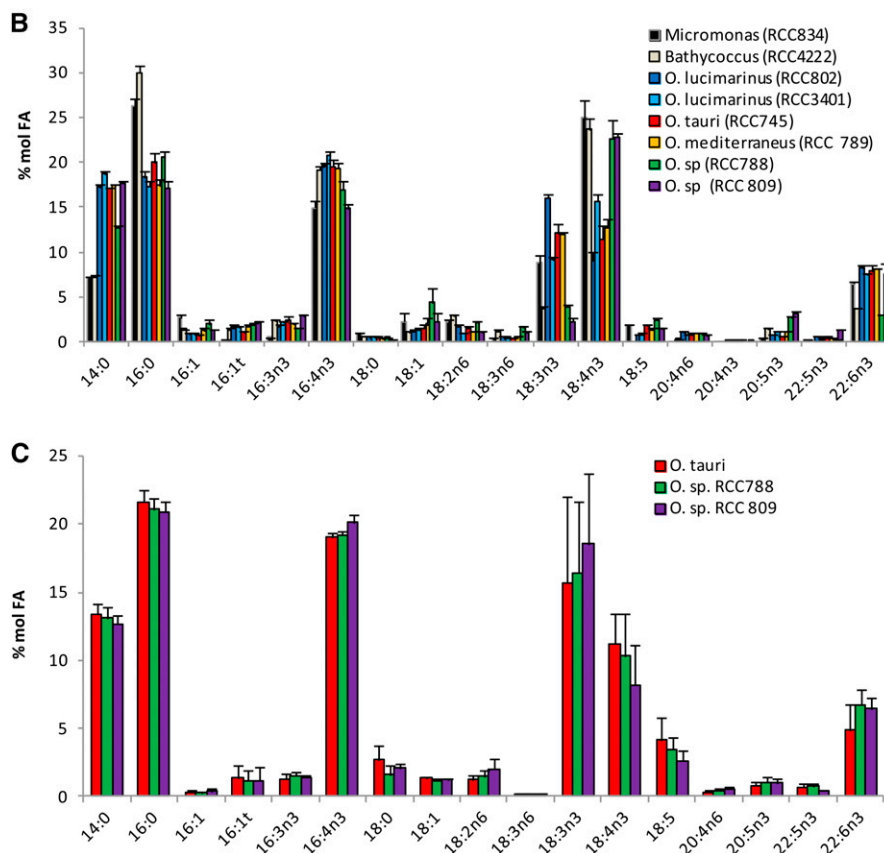
FA patterns of microalgae species from the polyphetic group prasinophytes, which encompasses Mamiellophyceae (Classis nova), were investigated in the 1990s and shown to be rather conserved (Dunstan et al., 1992). More recently, independent studies providing the FA profiles of different *Ostreococcus* species have been published (Wagner et al., 2010; Ahmann et al., 2011; Vaezi et al., 2013). Collectively, these results showed discrepancies suggesting that some qualitative differences may exist between *Ostreococcus* species and between the genera *Ostreococcus* and *Micromonas*. In particular, the FA profile reported for the deep strain RCC809 differs greatly from that of the surface strain *O. tauri*, including the lack of DHA, and the peculiar FA 18:5 was not reported for *O. tauri* while it was for most other prasinophytes. *Ostreococcus*, *Micromonas*, and *Bathycoccus* are the most qualitatively important genera from the recently defined monophyletic taxon Mamiellophyceae (Marin and Melkonian, 2010). Therefore, we investigated the conservation of FA composition between *Ostreococcus* species and these related genera to assess the representativeness of *O. tauri* for Mamiellophyceae (Fig. 1). *Micromonas pusilla* and *Bathycoccus prasinus*, analyzed in this work, correspond to the strains that were sequenced recently. *Ostreococcus* species were selected in the four distinct clades reported in the literature, and an additional species from a distinct geographical

localization was chosen within each clade (Fig. 1A; Rodríguez et al., 2005). This selection covered the genetic and ecological diversity of Mamiellophyceae, in particular those of the *Ostreococcus* genus. Cultures were grown in ventilated culture flasks without agitation in order to allow all species to grow, as neither *Micromonas* nor *Bathycoccus* could grow under constant agitation in our hands. In these conditions, FA patterns of the different species were closely related, although quantitative differences in the proportion of some FAs were observed (Fig. 1B).

Major FAs (80% of total FAs) consisted of half saturated FAs 14:0 and 16:0 and half PUFAs 16:4n-3, 18:3n-3 (α -linolenic acid [ALA]), 18:4n-3 (stearidonic acid [SDA]), and 22:6n-3 (DHA), among which 16:4n-3 was the most abundant (15%–20% of total FAs). 14:0 and 16:0 were found in equal proportion in *Ostreococcus*, while 16:0 was increased and 14:0 was decreased in the two other genera. Noteworthy, variations of the ALA/SDA ratio were observed between species, while the relative amount of the sum of ALA and SDA remained remarkably stable, representing $26.4\% \pm 3.2$ (SD) of the total FAs of all species combined (Fig. 1B). ALA was especially low compared with SDA in *Ostreococcus* RCC809 and RCC788, which are isolates from deep locations (Fig. 1B). Nevertheless, this interspecies difference was no longer detected when strains were grown in Erlenmeyer flasks under agitation, and the proportions of ALA and SDA were, on average, similar between the surface species *O. tauri* and the deep strains RCC788 and RCC809 (Fig. 1C; see below). All species except *B. prasinus* contained 18:5n-3, a peculiar FA initially identified from dinoflagellates and already reported for several species of prasinophytes, including *M. pusilla* and *Ostreococcus lucimarinus* (Dunstan et al., 1992; Ahmann et al., 2011). DHA was detected in all strains examined and accounted for 5% to 8% of the total FAs. In order to assess whether intraspecies variation of FA proportion occurred with respect to the growing stage of the batch culture, fatty acid methyl ester (FAME) analysis was performed on the model species *O. tauri* along a growing curve (Fig. 2). Progression from the exponential to the stationary phase of growth (from day 4 to day 8) correlated with a gradual increase in the relative contents of 16:0 and 16:3n-3 that paralleled the decrease of 16:4n-3. Similarly, 18:4n-3 and 18:5n-3 decreased progressively, while 18:3n-3 was obviously increased in the late stationary phase. Along the kinetics, the sum of ALA and SDA represented, on average, 24.7% of the total FAs with minor variation (± 0.5 SD). The relative content of DHA remained rather stable, and 20:4n-3 could be detected only in the stationary phase. From these results, it appeared that major modifications in the proportions of 16:0, 16:4n-3, and ω 3-C18-PUFAs occurred during the growth of batch culture. These modifications are likely to be related to the changes in self-shading and nutrient exhaustion inherent to the increasing cell density.

RCC	Genus	Species	Ecotype	Ocean origin	Region	depth (m)
745	<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>	Clade C	Mediterranean	Thau lagoon	0
789	<i>Ostreococcus</i>	<i>mediterraneus</i>	Clade D	Mediterranean	Spanish coast	0
788	<i>Ostreococcus</i>	<i>sp.</i>	Clade B	Mediterranean	Thyrrhenian Sea	90
809	<i>Ostreococcus</i>	<i>sp.</i>	Clade B	Atlantic	Tropical Atlantic	105
802	<i>Ostreococcus</i>	<i>lucimarinus</i>	Clade A	Mediterranean	Sicily channel	65
3401	<i>Ostreococcus</i>	<i>lucimarinus</i>	Clade A	Pacific	California	nd
834	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	Clade C	Atlantic	English channel	nd
4222	<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinus</i>	nd	Mediterranean	Gulf of lion	0

Figure 1. FA profiles of *Ostreococcus* and related species of the class Mamiellophyceae. A, Taxonomical origins and geographical and depth locations of *Ostreococcus* and related species analyzed. nd, Not defined. B, FA profile of all strains grown in flasks without agitation. Means of five independent experiments are shown. Error bars represent SE. C, Comparison of FA profiles from an *Ostreococcus* surface strain (*O. tauri*) and from *Ostreococcus* deep strains (RCC788 and RCC809) grown under constant agitation. Means of three independent experiments are shown. Error bars represent SE. Cell density was 20 to 45×10^6 cells mL⁻¹ in all experiments.



In summary, the FA patterns of *O. tauri* and of other representatives of Mamiellophyceae species were closely related, displaying similar major FAs whose proportions were variable according to the species and/or culture conditions. The proportions of ALA and SDA were the most variable and varied in opposite ways, with the sum of both FAs remaining stable

between species and during the growth of *O. tauri*. Collectively, these results suggested that variations of the FA patterns between species grown in flasks are likely related to differences in the acclimation of each strain to defined culture conditions but that FA profiles are likely to be similar at the physiological optima of each strain.

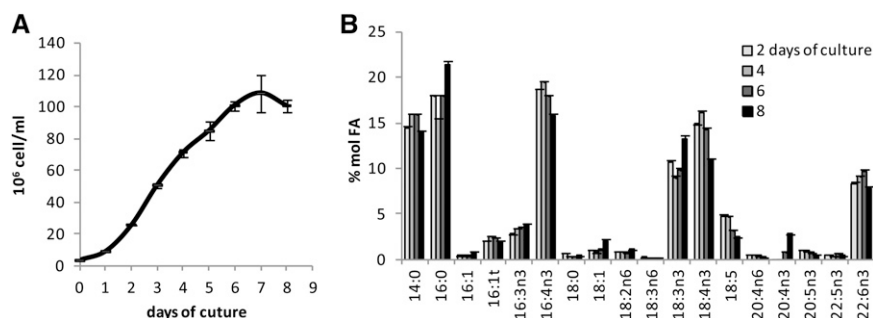


Figure 2. Evolution of the *O. tauri* FA profile during the growth of batch culture. A, Growing curve. B, Associated FA profiles. Means of triplicate experiments are shown. Errors bars represent SE.

Characterization of the *O. tauri* Glycerolipidome

To accurately assess the identity of all polar glycerolipids of *O. tauri*, two-dimensional thin-layer chromatography (2D-TLC) was used and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis of detected spots was performed (Fig. 3). Thin-layer chromatography plates were stained by the phospho-specific stain Molybdenum Blue and revealed two main PLs: PG and PX, an unknown phospholipid (see below; Fig. 3B). Other faintly detected PLs estimated by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) analysis to account each for, at most, 1% of the polar glycerolipids were PS, PE, and phosphatidylinositol (PI), as confirmed by MS² analysis (Fig. 3, B and D). PX also was stained by the Dragendorff reagent (Fig. 3C) commonly used to reveal tertiary amine but also reported to positively stain tertiary sulfonium derivatives found in microalgae (Sciuto et al., 1988). MS/MS analysis of each spot confirmed the identity of plastidial lipids and, most importantly, allowed us to definitively discriminate DGTA from DGTS as well as to determine the nature of PX (Supplemental Fig. S1). PX, which exhibited similar migration properties to PC, was found to display a mass-to-charge ratio (*m/z*) profile different from PC (Supplemental Fig. S2). The fragmentation of PX parent ions resulted in a neutral loss of 200 *m/z*, in contrast with the 59 *m/z* loss expected for PC

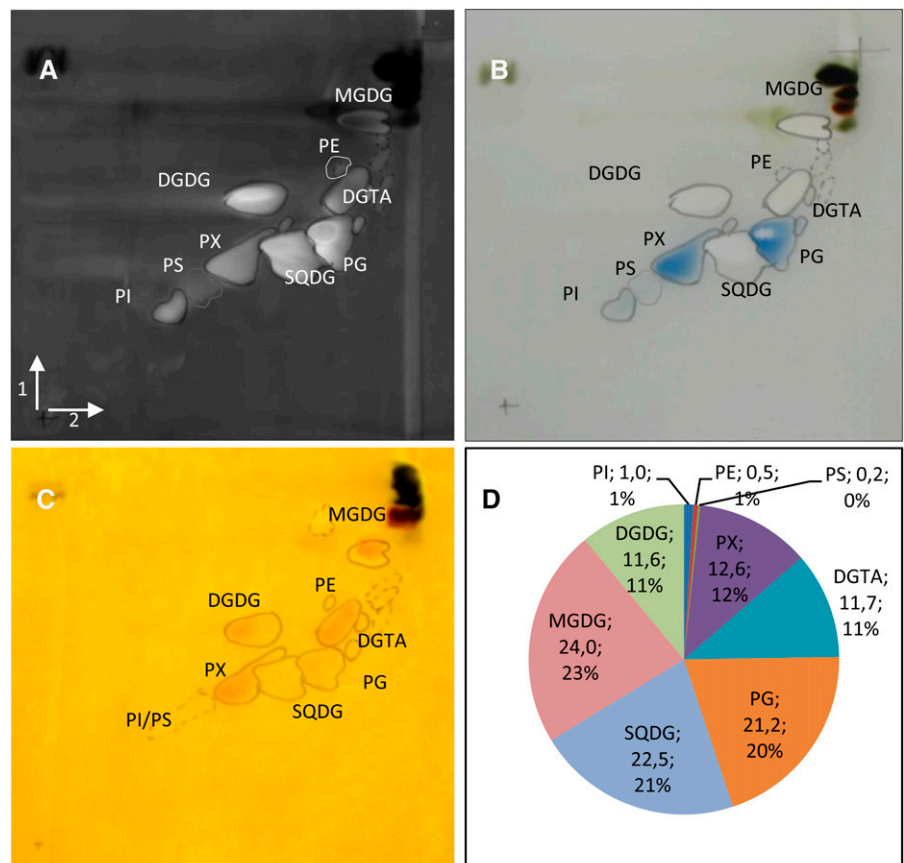
(Supplemental Fig. S2, B and C; Domingues et al., 1998). This result was similar to the fragmentation features of a novel lipid identified in the haptophyte *Emiliania huxleyi* that was assigned as phosphatidyl-dimethyl-propanethiol (PDPT; Supplemental Fig. S2; Fulton et al., 2014). PDPT is a lipid similar to phosphatidylsulfocholine (PSC) but with the terminal dimethyl sulfide moiety bound to phosphate via propanol instead of ethanol. Reasoning that spectral and fragmentation features were similar between PC and PX, in both positive and negative mode, PX was assigned as PDPT (Hsu and Turk, 2003; Berdeaux et al., 2010). As no PC could be detected, PDPT appeared to completely replace PC in *O. tauri*, which was not the case in *E. huxleyi*.

In summary, these analyses showed that *O. tauri* contains the canonical photosynthetic lipids (MGDG, DGDG, SQDG, and PG) and one class of BL, namely DGTA. Five classes of PLs were detected: the two main ones are PG and the peculiar phosphosulfolipid PDPT, and the minor ones (less than 2% of the PLs) are PS, PE, and PI.

Comparison of the *O. tauri* Lipidome with Related Species

Having established the identity of polar glycerolipids of *O. tauri*, a comparative FA analysis of major

Figure 3. Characterization of polar lipids of *O. tauri*. A to C, Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) separation and staining of *O. tauri* polar glycerolipids. Migrations were performed in chloroform:methanol:water (65:25:4, v/v) for the first dimension (arrow 1) and chloroform:methanol:isopropylamine:concentrated ammonia (65:35:0.5:5, v/v) for the second migration (arrow 2). A, Primuline staining of all lipids. B, PL-specific staining by Molybdenum Blue. C, Dragendorff reagent staining. D, Estimation of polar glycerolipid content by FAME-GC-FID analysis of polar glycerolipids separated by two-dimensional HPTLC. The quantity (μg) of FA in each lipid (as labeled) and the percentage of FA in polar lipids are indicated.



glycerolipids was conducted between *O. tauri* and other Mediterranean species from distinct clades (Fig. 4). In order to obtain a sufficient amount of TAG for the analysis and readily compare the FA composition of TAGs in the different *Ostreococcus* species, cultures were collected in the early stationary phase. In these conditions, steryl esters were detected and taken into account (Supplemental Fig. S3). One-dimensional HPTLC development of PLs according to Mock and Kroon (2002) was preferred to 2D-TLC to achieve a robust quantitative analysis, as 2D-TLC was less reproducible and resulted in random overlap of PDPT and SQDG (Fig. 3; Supplemental Fig. S3). Under these conditions, the minor PLs PS, PI, and PE comigrate with PDPT, DGTA, and PG, respectively (Supplemental Fig. S3). All species displayed a similar composition of lipids and FAs (Fig. 4). All species combined, the average of polar lipids typically represented nearly 80% of the total analyzed lipids, with the predominance of chloroplastic lipids, among which MGDG and SQDG were the most abundant. DGTA/PI was, on average, about twice as abundant as PDPT/PS. TAGs represented 17%, on average, of the total lipid classes, although this content varied greatly between experiments. Lipid and FA patterns were more closely related between species within an experimental set than for a given species between experiments, confirming the previous results that the lipid and FA profiles depend

more on the culture conditions than on the affiliation of the *Ostreococcus* species to a given clade (Supplemental Fig. S4). The FA composition of each class of glycerolipid was conserved between the different Mediterranean clades (Fig. 5). The saturated fatty acids (SFAs) 14:0 and 16:0 were major compounds of all lipids, with the exception of MGDG, which displayed a highly unsaturated FA profile. 16:4n-3 was widely distributed in lipids, including TAGs and steryl ester, and especially abundant in MGDG and PDPT, while it was poorly represented in PG and SQDG (Fig. 5; Supplemental Fig. S6). Strikingly, ALA and SDA dominated the PUFA composition of chloroplastic lipids, and 18:5n-3 was detected exclusively in galactolipids, whereas DHA was a major component of DGTA/PI and PDPT/PS, presumed to be extraplastidial, in which it represented 40% and 20% of the FA content, respectively. DGTA/PI and PDPT/PS accounted, on average, for 70% and 12% of the total DHA content, respectively. This result was at variance with a previous report that failed to detect DHA in the polar lipid fraction from *O. tauri* (Wagner et al., 2010). FA analysis of individual *O. tauri* polar lipids resolved by 2D-TLC indicated that PE, like PS, was composed nearly exclusively of DHA, which was confirmed by mass spectrometry analysis (see below), whereas no DHA could be detected in PG. Therefore, it is likely that the low proportion of DHA detected in the PG/PE fraction in *Ostreococcus* species arise exclusively from PE (Supplemental Fig. S5). Interestingly, DAGs and TAGs displayed an FA profile closely related to the bulk of PLs, and both contained as well C18-PUFAs, including 18:5n-3 (Fig. 5). DHA represented at least 10% of the FAs in steryl esters, which displayed the highest content of 16:3n-3 of all lipids (Supplemental Fig. S6).

Acyl Chain Positional Analysis of Structural Glycerolipids and TAGs

Positional analysis of FAs was achieved for the major glycerolipids of *O. tauri* by MS/MS analysis as described by Abida et al. (2015), except for PDPT, which was done in negative mode on [M-CH₃]⁻ adduct (Supplemental Fig. S2, B and C). In agreement with quantitative results obtained from GC-FID analysis, 14:0, 16:0, and 16:4 were widespread in structural lipids and found in numerous molecular species of a given lipid class, whereas 22:6 was detected only in PDPT and DGTA (Fig. 6; Supplemental Fig. S7). 16:4 was located at the *sn*-2 position in most lipid species, including DGTA and PDPT, but at the *sn*-1 position in SQDG species (32:4) and in a minor species of MGDG (32:8), which corresponded to the only 16:4/16:4 combination detected in the analysis. Di-SFA species consisting of 14:0 and 16:0 combinations were detected in plastidial lipids, except MGDG, and in the minor class PI (Supplemental Fig. S7). In all plastidial lipids, C18-PUFA acyl groups were located exclusively at the *sn*-1

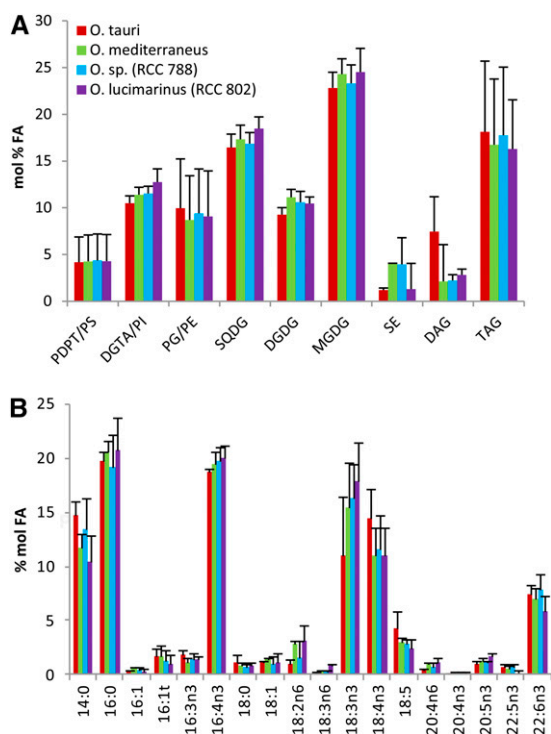


Figure 4. Lipid and FA profiles from analyzed lipids of *Ostreococcus* Mediterranean species. A, Lipid composition. B, FA composition of the analyzed lipids. Means of three independent experiments are shown. Error bars represent SE.

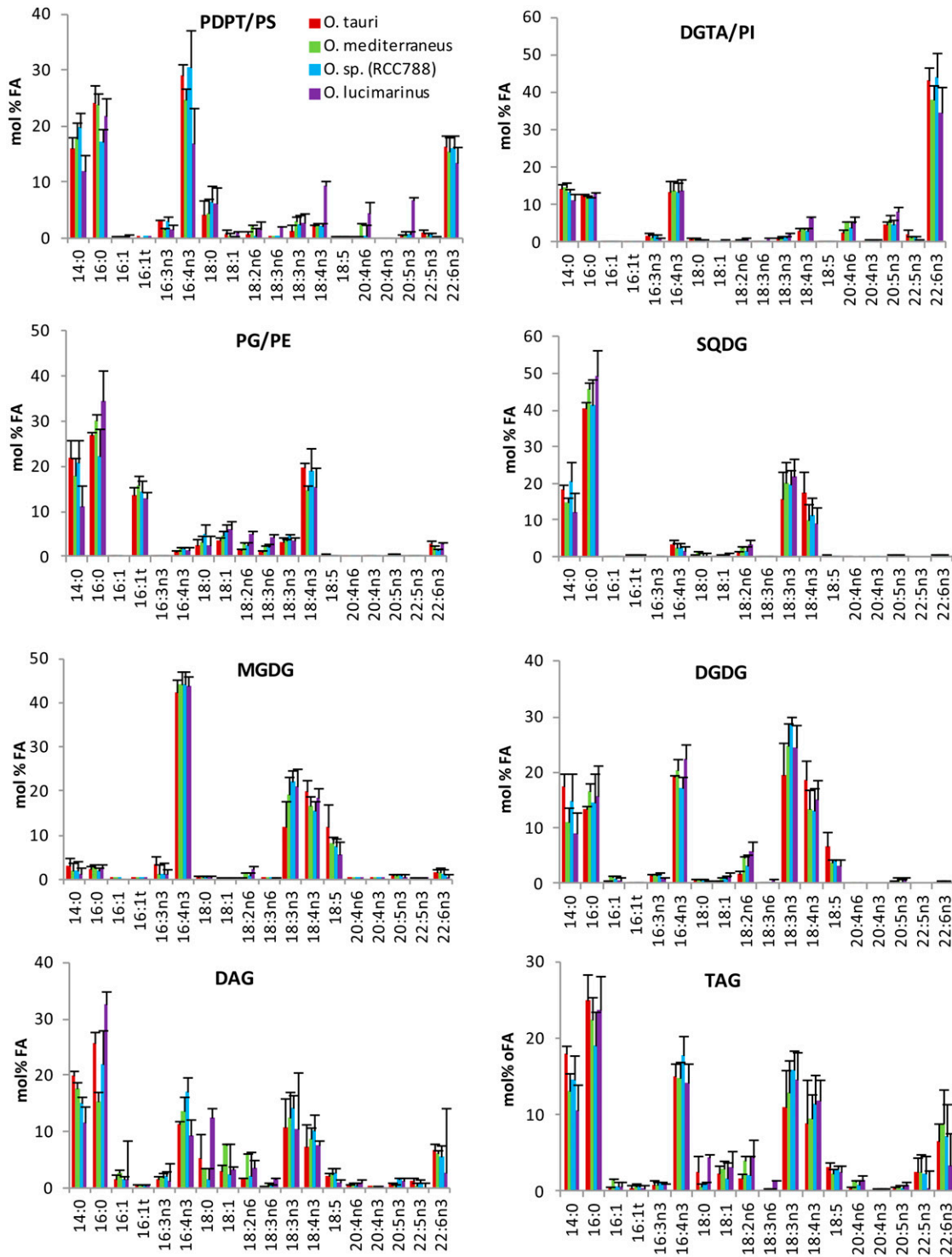


Figure 5. FA composition of glycerolipids of *Ostreococcus* Mediterranean species. Lipids were resolved by one-dimensional HPTLC. Means of three independent experiments are shown. Error bars represent se.

position lipids, and SFAs were located exclusively at the *sn*-2 position when in combination with PUFAs (i.e. an exception made of di-SFA species). Consequently, plastidial lipids displayed the so-called prokaryotic type FA pattern known to occur in lipids synthesized in

the chloroplast of plants as well as in cyanobacteria (Frentzen et al., 1983; Weier et al., 2005). MGDG and DGDG mature species consisted of the *sn*-1/*sn*-2 combinations 18:3/16:4, 18:4/16:4, and 18:5/16:4. Mature DGDG species further encompassed ω 3-C18-PUFA in

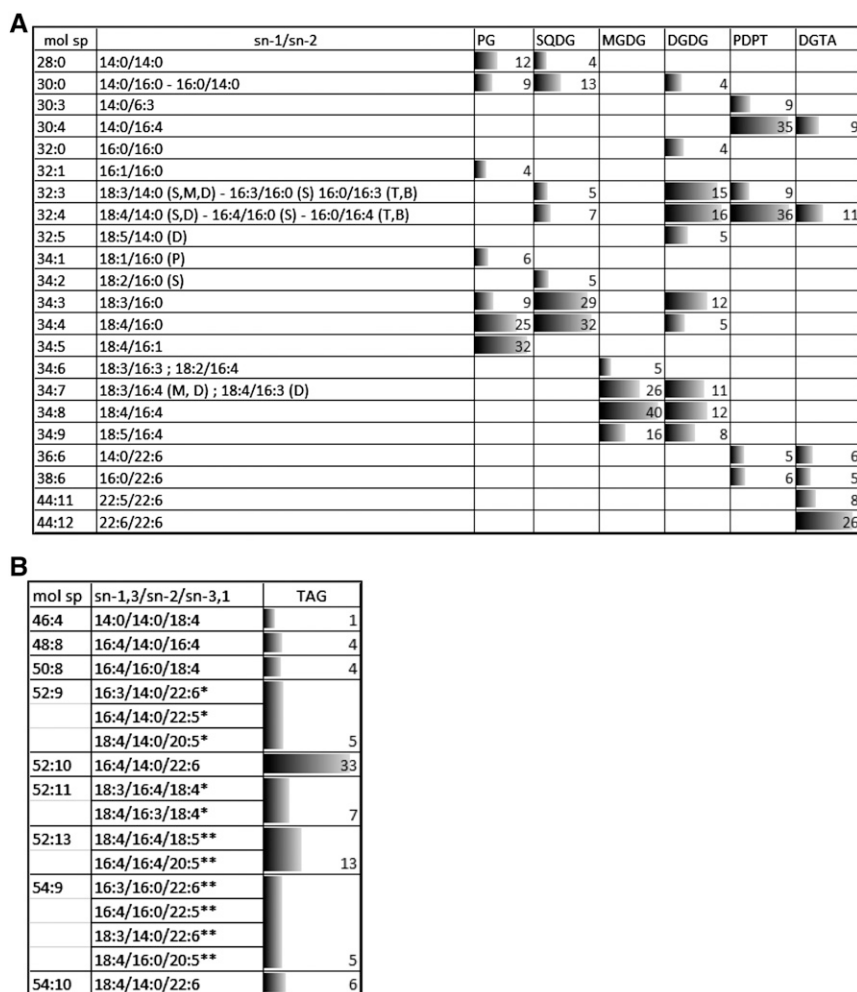


Figure 6. Positional analysis of FAs in major glycerolipids. Molecular species (mol sp) of polar glycerolipids (A) and of TAGs (B) and the corresponding FA combination are represented as percentages (as labeled) of the total signal analyzed in each lipid class, and corresponding bars are scaled according to the highest percentage. Only species representing more than 4% are shown (for complete data, see Supplemental Figs. S7 and S8). In A, letters in parentheses refer to the lipid class in which the FA combination was detected (P, PG; S, SQDG; D, DGDG; M, MGDG; B, DGTA; T, PDPT). For TAG species in B, only the central position can be deduced from the method. *, The FA position is likely; **, the FA position is not known.

combination with 14:0 or 16:0. In PG and SQDG, 18:3 and 18:4 were detected only in combination with C16 acyl groups. 18:4/16:1-PG was the most detected species (34:5-PG). This species most certainly corresponded to the species of PG containing the Δ3-trans-hexadecenoic acid (16:1t) detected in high proportion by GC-FID analyses and known to be essential for photosynthesis in *C. reinhardtii*, where it stabilizes PSII oligomers in thylakoids (Pineau et al., 2004). 18:4/16:0-PG, which appears to be the second most abundant PG species, is the likely precursor of 18:4/16:1t-PG (Li-Beisson et al., 2015).

In contrast to plastidial lipids, saturated acyl groups were detected exclusively at the *sn-1* position in both PDPT and DGTA, while the *sn-2* position was esterified exclusively with PUFAs including 16:4. The four major PDPT molecular species corresponded to the combination of *sn-1*-14:0 and *sn-1*-16:0 with *sn-2*-16:3, *sn-2*-16:4, and *sn-2*-22:6. These acyl combinations also were detected in DGTA (Fig. 6; Supplemental Fig. S7). Nonetheless, in contrast to PDPT, DGTA encompassed numerous species that displayed unsaturated acyl groups at both *sn-1* and *sn-2* positions, including highly unsaturated molecular species, of which 22:6/22:6 was

detected with the highest intensity (molecular species 44:12). Therefore, in *O. tauri*, the *sn-2* specificity in extraplastidial and plastidial lipids is globally reversed, similar to what was reported for *C. reinhardtii*. In *O. tauri*, however, a noticeable exception is that 16:4 was at the *sn-2* position in most lipid species, including extraplastidial lipids, while in *C. reinhardtii*, 16:4 is reported to be at the *sn-1* position in two minor DGTS species and only at the *sn-2* position in MGDG (Li-Beisson et al., 2015).

Among the numerous TAG molecular species detected, the positional distribution could be unambiguously assessed for some species, of which the molecular species 52:10 corresponded to the highest peak (Fig. 6B; Supplemental Fig. S8). In most species, including 52:10, the *sn-2* position was occupied by 14:0 or 16:0. C18-PUFAs and LC-PUFAs were detected in numerous combinations of TAG species, suggesting that TAGs were synthesized from FAs diagnostic for both plastidial and extraplastidial lipids. The presence of 18:5 and 22:6 in the minor species 56:15 (18:5/16:4/22:6) is the best illustration that FA from both plastidial and extraplastidial lipids feeds TAG synthesis and suggests that active transfer of FAs and/or DAG

precursors from the chloroplast to the ER occurs (see "Discussion").

Effects of N and P Deprivation on Lipid Composition

N and P deprivation were used to get a dynamic insight into lipid remodeling, the possible associated regulation of lipid FA composition, especially of TAGs, as well as the regulation of the acyl-CoA pool. Three days of starvation was enough to severely slow down or arrest cell growth in P- or N-deprived cultures and to trigger TAG accumulation (Fig. 7; Supplemental Fig. S9A). N deprivation was more stringent than P deprivation, leading to an earlier growth slowdown/arrest and to a greater accumulation of TAGs (Fig. 7A). Noteworthy, in both cases, TAG accumulation did not occur at the expense of structural lipids, whose cellular amounts also were increased (Fig. 7B; Supplemental Fig. S9A). In particular, the amounts of DGDG and to a lesser extent MGDG were increased under both N and P deprivation (Fig. 7B). Although rare, glycolipid accumulation upon nutrient deprivation has been reported for other microalgae (Liang et al., 2013). For other structural lipids, specific changes were observed depending on whether P or N was depleted (Fig. 7B; Supplemental Fig. S9B). Under P deprivation, SQDG and DGTA content increased at the expense of P-containing lipids, namely PG/PE and PDPT/PS, respectively. In phytoplankton, SQDG is known to be a

surrogate of PG in cyanobacteria and thylakoid membranes of microalgae, and BLs replace PC in extraplastidial membranes of microalgae (Van Mooy et al., 2009). In *O. tauri*, PDPT was identified in this work as a major PL besides PG, while PC was absent (Fig. 3D). In P-deprived cells, the FA composition of the bulk of presumed nonplastidial lipid, namely DGTA/PI and PDPT/PS, remained unchanged (Fig. 8D; Supplemental Fig. S9C), while in the PDPT/PS pool, the DHA proportion was increased and the proportions of 16:0 and 16:4 were decreased (Fig. 9B). As the minor class PS was shown to be composed exclusively of DHA (Supplemental Fig. S5), this result strongly suggests that PDPT is readily used as a phosphate source under phosphate deprivation in *O. tauri*. DGTA, which displays a closely related FA composition, likely compensates for PDPT loss in extraplastidial membranes (Figs. 7B, 8D, and 9, A and B). N deprivation triggered an increase of all structural lipids, PG amount being increased to the greatest extent (Fig. 7B). As a result, the proportion of PG was increased while that of SQDG was decreased (Supplemental Fig. S9B). This feature has been reported for other microalgae and might be the result of a compensatory mechanism to maintain a balanced proportion of anionic lipids in thylakoid membranes (Martin et al., 2014; Kim et al., 2015).

N and P deprivation triggered rapid alteration of the FA profiles of all lipid pools, including acyl-CoAs (Fig. 8). Acyl-CoA profiles reflected the global FA profile of *O. tauri*, with the striking exception that the major FA 16:4 was not detected (Fig. 8A). Under standard conditions, DHA was by far the major species of the acyl-CoA pool before 14:0 and 16:0. Although in a low amount, 18:5-CoA could be unambiguously detected. It is worth noting that 18:3 and 18:4 species were enriched compared with other PUFA species in the acyl-CoA pool. However, compared with the global abundance of FA (total FAMES), LC-PUFA-CoAs were the most enriched species under standard conditions, especially 22:5-CoA species (Fig. 8B). Under N and P deprivation, ALA accumulated to a greater extent than SDA in the plastidial lipids DAGs and TAGs but not in extraplastidial lipids (Fig. 8). This resulted in a striking inversion of the ALA/SDA ratio in all lipids except extraplastidial lipids (Fig. 9). This remarkable trend could be reversed upon medium repletion (Supplemental Fig. S10). The global proportion of both ALA and SDA of all analyzed lipids, however, remained stable in all conditions representing about 26% of the total FA (Supplemental Fig. S9D). Moreover, in the acyl-CoA pool, 18:3 species readily increased whereas 18:4 was decreased, resulting in the inversion of the 18:3/18:4 ratio also in this pool (Figs. 8A and 9J). In accumulating TAGs as in galactolipids, the decrease of SDA seems to be balanced by the increase of ALA, while in PG and SQDG, the reduction of SDA largely exceeded the rise of ALA relative content, reflecting a specific decrease of 18:4 species in these latter lipids (Fig. 9).

Altogether, these results indicate that nutrient deprivation down-regulates ALA desaturation and that

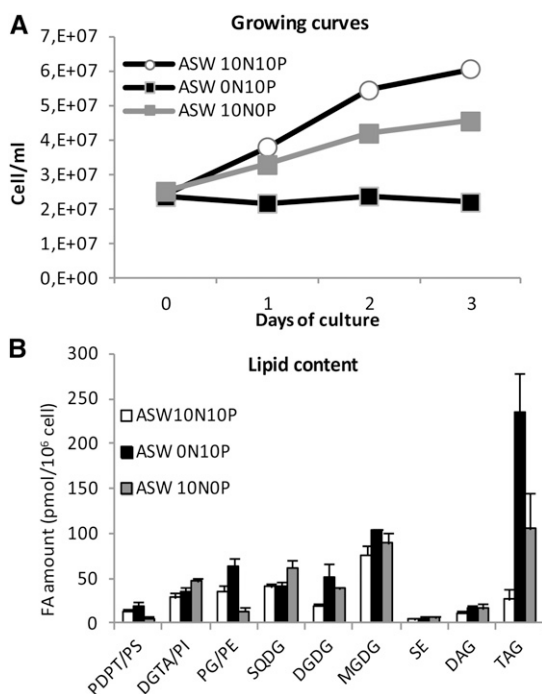


Figure 7. Effects of N and P deprivation on cell growth and lipid content. A, Growing curves representative of five independent experiments. B, Means of three independent experiments. Error bars represent se. ASW terms are explained in "Materials and Methods."

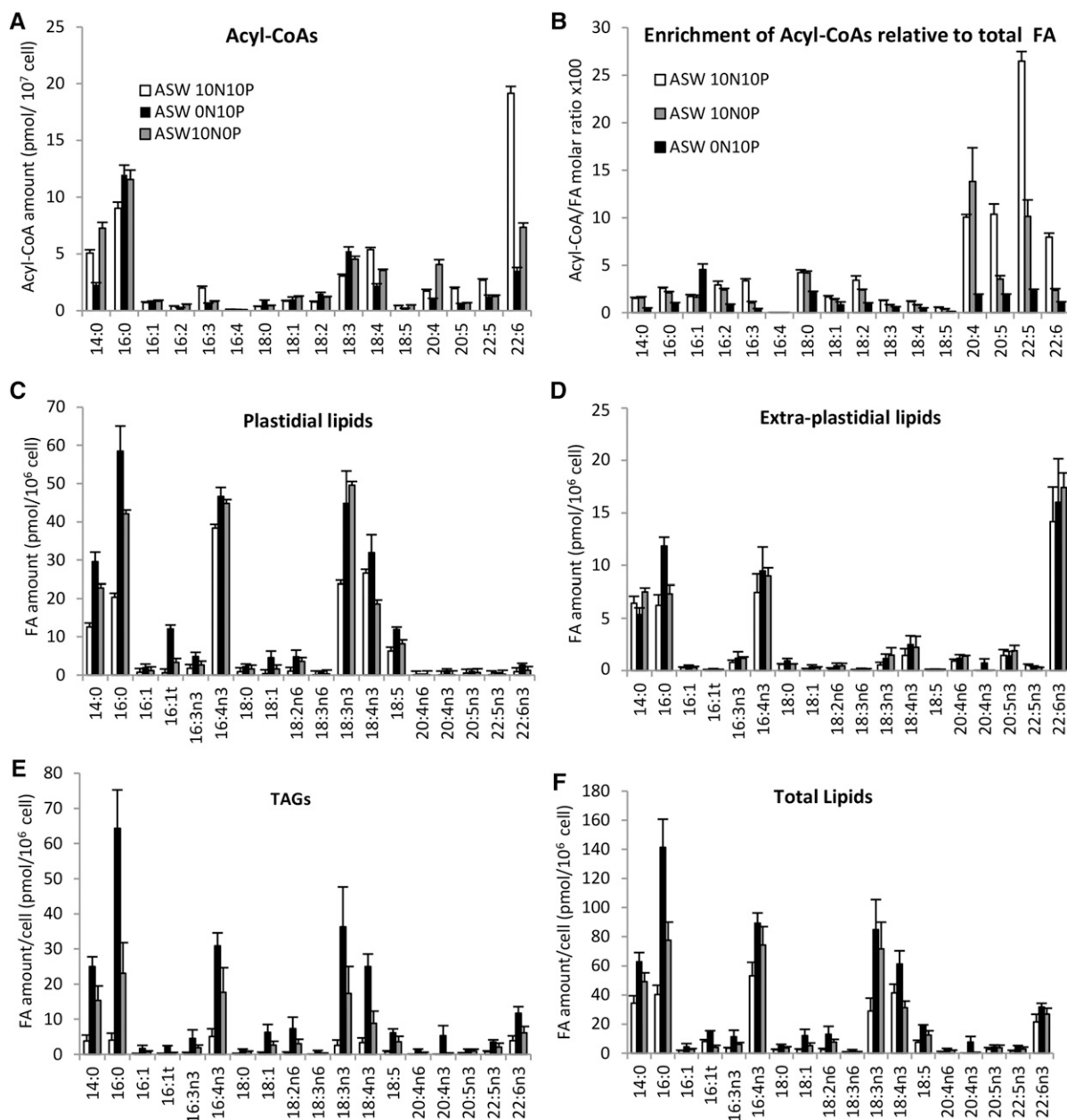


Figure 8. Effects of N and P deprivation on FA amounts in distinct lipid pools. A and B, Acyl-CoA amounts (A) and enrichment (B) compared with total FA and expressed as the molar ratio between acyl-CoA per cell and total FA per cell. Means of triplicate batch cultures are shown. C to F, FA amounts in different lipid pools. Means of three independent experiments are shown. Error bars represent se. ASW terms are explained in “Materials and Methods.”

other mechanisms are further involved to specifically deplete SDA-containing species of PG and SQDG. Besides this unexpected regulation, nutrient deprivation, especially N deprivation, triggered the increase of 16:0 that impacted all lipid pools but to a greater extent DAGs, TAGs, and acyl-CoAs (Fig. 9, H and J). However, not only saturated FAs but major PUFAs, such as C16:4, and ω -3-C18 PUFAs, including C18:5, accumulated in de novo synthesized TAGs, while the level of LC-PUFAs remained rather stable (Fig. 8E).

Consequently, the proportions of 16:4 and ω -3-PUFAs, hallmarks of plastidial lipids, remained high, whereas DHA species were reduced by half (Fig. 9H). In other microalgae, TAGs accumulating upon nutrient stresses commonly display a decreased unsaturation index, mainly due to the accumulation of de novo synthesized SFA and monounsaturated FAs at the expense of PUFAs arising from modification on structural lipids (Sharma et al., 2012). In particular, the proportion of 16:4 in accumulating TAGs is reduced importantly in

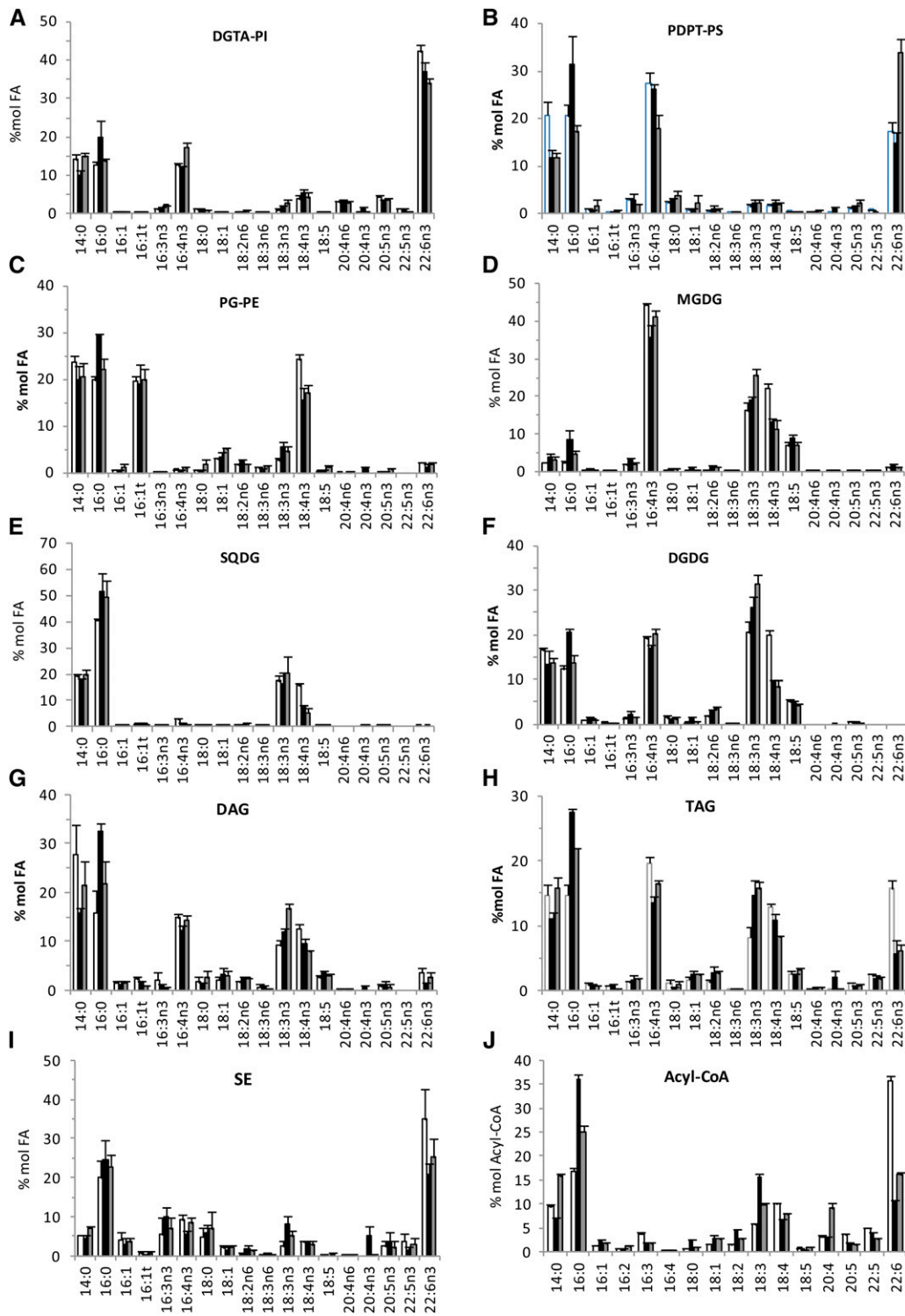


Figure 9. Effects of N and P deprivation on FA profiles of lipids and acyl-CoA. Black bars, N starvation; gray bars, P starvation; white bars, control. The same data set used in Figures 7B and 8 was used. Error bars represent se.

Dunaliella and *Chlamydomonas* species in stark contrast to *O. tauri* (Siaut et al., 2011; Davidi et al., 2014). Noteworthy, the profile of the acyl-CoA pool changed according to the profile of TAGs: the major DHA

species in cycling cells was reduced drastically under nutrient deprivation, whereas 18:3 species accumulated in the pool at the expense of 18:4, as already mentioned (Figs. 8A and 9J). The enrichment of the acyl-CoA pool

in LC-PUFA species was reduced drastically under N deprivation, whereas an intermediate situation was observed under P deprivation. It is likely that the transfer of LC-PUFAs to the acyl-CoA pool is reduced rapidly upon cell growth slowdown/arrest, limiting their incorporation into TAGs and, therefore, preserving the FA patterns of extraplastidial lipids.

Ultrastructure of Nutrient-Deprived *O. tauri*

In order to investigate ultrastructural changes associated with TAG accumulation as well as to know whether TAG accumulation occurred concomitant with or at the expense of starch, as described for some microalgae, N- and P-deprived cells were observed by electron microscopy after cryofixation (Li et al., 2015; Vitova et al., 2015). Ultrastructural observation of *O. tauri* nutrient-deprived cells revealed that starch was actively synthesized in the chloroplast, resulting in large starch granules, and that cytoplasmic oil bodies accumulated (Fig. 10). Plastoglobules could be detected in control cells and were no longer observed in nutrient-

deprived cells. Small granules, which were arranged in array in control cells and whose electron density was close to that of starch (i.e. brighter than oil bodies), could still be detected in starved cells, although they were much less numerous than in control cells (Fig. 10, A and E). These granules were reported previously as storage granules, and their composition remains unknown (Henderson et al., 2007). Peripheral thylakoid structures appeared to be preserved in P-deprived cells, whereas in most N-deprived cells, thylakoids were hardly distinguishable in the swelled chloroplast filled with a material that had the same electron density as oil bodies (Fig. 10, E and F). Cell size was increased for both N- and P-starved cells compared with controls, as reflected by the increased cell sections that were significantly different from controls ($1.05 \pm 0.33 \mu\text{m}^2$) and corresponded, respectively, to 1.65 ± 0.59 and $1.71 \pm 0.61 \mu\text{m}^2$ (Student's *t* test, $P < 0.01$; $n > 30$). Increase of cell size has been commonly reported for microalgae that display a cell wall (Yap et al., 2016). Our observations indicate that *O. tauri* cells that are devoid of cell wall also readily increase in size under nutrient deprivation. Most P-deprived cells contained two

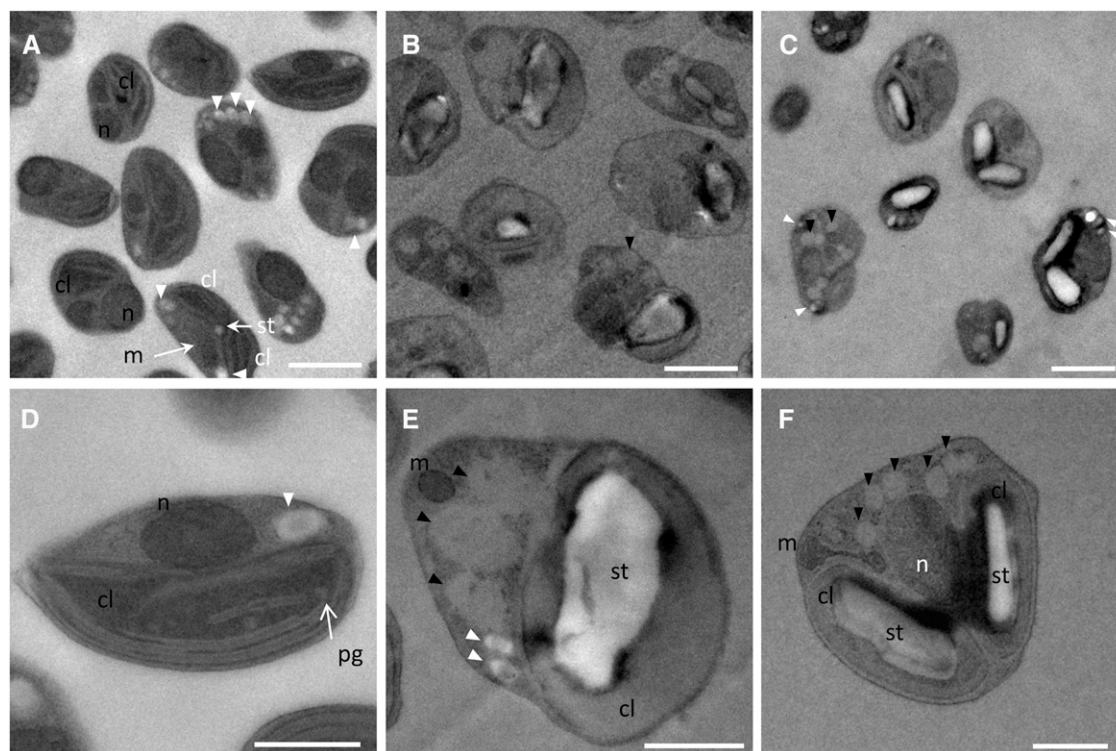


Figure 10. Transmission electron microscopy of nutrient-replete and nutrient-depleted *O. tauri* cells. A and D, Control cells. Either one or duplicated chloroplasts and mitochondria could be observed, reflecting different progression stages of cells into the cell cycle. Peripheral and central arrays of thylakoids and occasionally plastoglobuli-like structures could be detected in chloroplasts. The chloroplastic starch granule, when detected, was small. Cytoplasmic arrays of granules of unknown composition were observed frequently. B and E, N-starved cells accumulated oil bodies and displayed a large starch granule in the chloroplast. Thylakoidal structures were hardly distinguishable (E). C and F, P-starved cells frequently displayed duplicated chloroplasts, each containing a large starch granule; peripheral thylakoid arrays could be detected. Black arrowheads indicate oil bodies, and white arrowheads indicate storage granules. cl, Chloroplast; m, mitochondria; n, nucleus; pg, plastoglobules; st, starch. Bars = 1 μm in general views (A–C) and 0.5 μm in individual views (D–F).

chloroplasts blocked in division, suggesting that a specific arrest in the cell cycle had occurred after chloroplast duplication. Consequently, P-deprived cells displayed either an elongated or a pyramidal shape. N-deprived cells displayed an altered cell shape and greater accumulation of both starch and oil bodies. Therefore, the increase of structural lipid content, in particular of plastidial lipids, might arise from the increase in cell size and mask the decay of thylakoid structures at the chloroplastic level.

DISCUSSION

A phylogenetic tree of the organisms relevant for the following discussion is provided in Supplemental Figure S11 (Letunic and Bork, 2016). Mamiellales that diverged early in the green lineage are the only organisms described so far that display combined features of microalgae from distantly related lineages, namely Viridiplantae and Chromalveolata. DHA as well as DGTA and PDPT lipids are absent in the green lineage. Moreover, the distribution of FAs within the distinct *Ostreococcus* lipid classes follows an amazing scheme in which ω 3-C18-PUFAs dominate plastidial lipids whereas LC-PUFAs, including the major species DHA, are confined to extraplastidial lipids. The preferential distribution of FAs between plastidial and extraplastidial lipids does exist in other microalgae, but the marked exclusion of LC-PUFAs from plastidial lipids occurring in *Ostreococcus* has no equivalence in the literature (Dembitsky, 1996). The nearest scenario occurs in the haptophyte *E. huxleyi*, in which DHA is detected preferentially in extraplastidial lipids but also is present in MGDG and SQDG and C18-PUFAs are confined to plastidial lipids (Fulton et al., 2014). It might be that the occurrence of LC-PUFAs in plastidial lipids is somehow related to secondary endosymbiosis. Another puzzling feature of *Ostreococcus* is the nutrient-dependent regulation of the ALA/SDA ratio in plastidial lipids, which is reflected in TAGs. Finally, TAG positional acyl patterns, including the cooccurrence of FAs diagnostic of plastidial and extraplastidial lipids in the same TAG species, raises interesting issues about TAG synthesis pathways.

Ostreococcus Lipidic Features Are Related to Microalgae from Viridiplantae and Chromalveolata

The FA profile of *Ostreococcus* and related species is well conserved and relatively simple, being dominated by four PUFAs, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, and 22:6n-3, and two SFAs, 14:0 and 16:0, with the additional presence of 18:5n-3 in most species. C16:4n-3 has been proposed as a biomarker for Chlorophyceae and Trebouxiophyceae that belong to the green lineage (Viridiplantae), whereas 14:0, 18:4n-3, and 22:6n-3 are major FAs of haptophytes (Chromalveolata; Lang et al., 2011; Taipale et al., 2013). Octadecapentaenoic acid, although anciently reported to occur in some

prasinophytes and more recently in *O. lucimarinus* (Dunstan et al., 1992; Ahmann et al., 2011), is usually found in divisions of microalgae from the chromalveolates. Moreover, DGTA and the peculiar phosphosulfolipid PDPT were identified unambiguously as major structural lipids in *O. tauri* besides the canonical quartet of plastidial lipids (Supplemental Figs. S1 and S2). It is reasonable to postulate that DGTA and PDPT are extraplastidial lipids. Indeed, DGTA and PDPT not only displayed closely related FA profiles but also appeared to substitute one for the other depending on the availability of P in the medium, the FA profile of the bulk DGTA/PDPT remaining unchanged. In the literature, BLs were shown to be associated with non-chloroplastial structures in other microalgae, and PDPT, similar to PSC, is considered as an analog of PC known to be a major component of extraplastidial membranes (Dorne et al., 1990; Künzler et al., 1997). Based on the resemblance of lipidic features between Mamiellophyceae species, it is likely that both of these lipids are conserved at least in *Ostreococcus* species (Figs. 1, 4, and 5; Supplemental Fig. S3). DGTA and PDPT have been reported for microalgae of the chromalveolates supergroup (Fulton et al., 2014; Cañavate et al., 2016). Previous studies that thoroughly addressed the occurrence and evolutionary and taxonomic distribution of BLs indicated that DGTS was the only class of BLs in green microalgae, whereas DGTA and/or diacylglycerol-carboxyhydroxymethyl-choline occurred preferentially in species from the chromalveolates supergroup (Dembitsky, 1996). However, DGTA was reported recently for the prasinophyte *Tetraselmis suecica*, indicating that DGTA is present in prasinophytes of distinct clades (Cañavate et al., 2016). The peculiar phosphosulfolipid PDPT was only recently identified from *E. huxleyi* (haptophyte, chromalveolates), in which PC and BLs also occur (Fulton et al., 2014). Noteworthy, PDPT completely replaced PC in *O. tauri*. Likewise, Sato et al. (2016) recently reported that, in *O. tauri* and *O. lucimarinus*, no homologs of PE methyltransferase and phosphoethanol methyltransferase, both required for PC synthesis, could be identified. The sulfonium analog of PC, namely PSC, which is more common than PDPT and has been reported from several marine diatom species, was found to completely replace PC in *Nitzschia alba* (Bisseret et al., 1984). The role of phosphosulfolipids in microalgae has not been investigated directly, but it is likely that the replacement of nitrogenous lipids by sulfonium analogs, as for other compounds, confers (or has conferred) an ecological advantage in N-poor environments (Giordano and Prioretti, 2016).

Mamiellophyceae are ancestral picoeukaryotes that diverged early in the green lineage and that might have conserved ancestral features with respect to the glycerolipid composition compared with other green microalgae. Several microalgae of distinct taxonomic position within the chromalveolates were reported to display genes of the carotenoid pathway originating from prasinophytes (Frommolt et al., 2008). Prasinophytes

were further identified at the origin of the important green footprint discovered in the genome of diatoms (Moustafa et al., 2009). A cryptic endosymbiotic event involving an ancestral prasinophyte has been proposed to be responsible for such an important gene transfer from the green to the brown lineage. Our results support this hypothesis, as the occurrence of lipidic hallmarks of chromalveolates in *Ostreococcus* suggests that these features originate from an ancestral prasinophyte and have been lost during the evolution of most green microalgae.

FA Distribution in Structural Lipids

LC-PUFAs

As mentioned, the presence of DHA in green microalgae is exceptional, since it has only been reported for some prasinophytes in this lineage, including some but not all *Ostreococcus* species (Dunstan et al., 1992; Wagner et al., 2010; Ahmann et al., 2011; Vaezi et al., 2013). From our work here, it appeared that DHA was produced in similar amounts in all the Mamiellophyceae species analyzed. DHA was confined to extraplastidial lipids, namely PE, PS, PDPT, and DGTA. In agreement with quantitative analysis, which showed that DGTA was highly enriched in LC-PUFAs compared with PDPT, FA positional analysis revealed that di-LC-PUFA combinations occurred only in DGTA, of which the di-22:6-DGTA species showed the highest signal. Furthermore, numerous DGTA species corresponded to likely intermediates of desaturation and/or elongation steps leading to the formation of highly unsaturated mature species (22:5/22:6 and 22:6/22:6). DGTA has been reported to be highly unsaturated in diverse microalgae species and, in particular, to be the most unsaturated BL in microalga species that contained several classes of BLs (Dembitsky, 1996; Armada et al., 2013; Cañavate et al., 2016). In *O. danica*, radio-labeled oleate was first incorporated in DGTS and transferred to DGTA for further modification to yield highly unsaturated DGTA species (Vogel and Eichenberger, 1992). In plants, FA modification, including desaturation, is thought to occur preferentially at the *sn*-2 position of PC. A deacylation/reacylation cycle of PC, referred to as acyl editing, fuels the acyl-CoA pool with modified acyl chains and further increases the acyl diversity of PC (Bates et al., 2012). In *O. tauri*, DHA was the most abundant species in the acyl-CoA pool of cycling cells, suggesting an important turnover of this FA under favorable conditions. Collectively, these results support the hypothesis that DGTA is a substrate for FA elongation and desaturation processes and, furthermore, that acyl editing of DGTA might take place to generate di-LC-PUFA DGTA species.

LC-PUFA synthesis occurs by successive desaturation and elongation steps known to take place, in lower eukaryotes, on lipid and acyl-CoA substrates, respectively. However, an acyl-CoA Δ 6-desaturase from

O. tauri could be identified by functional characterization in *Saccharomyces cerevisiae* (Domergue et al., 2005). Moreover, evidence about the acyl-CoA dependence of the Δ 5-desaturase from *Mantiella squamata*, which belongs to Mamiellales, also has been provided (Hoffmann et al., 2008). Acyl-CoA products of acyl-CoA desaturases are expected to accumulate because they are more efficiently produced than incorporated into lipids. From our analysis, it was obvious that the acyl-CoA pool was enriched in 18:3 and 18:4 species compared with the proportion of these FAs in extraplastidial lipids under standard conditions (Figs. 8 and 9; Supplemental Fig. S9). It is not possible to discriminate whether the higher proportion of these FAs arises from the transit of ALA and SDA of plastidial origin in the acyl-CoA pool before their incorporation into TAGs and/or from the accumulation of the acyl-CoA Δ 6-desaturase products, namely 18:3n-6 and 18:4n-3. However, it was striking that the molar ratio acyl-CoA/FAMES was higher for LC-PUFA species, including 20:4, 20:5, 22:5, and 22:6. This reflects the accumulation of LC-PUFAs in the acyl-CoA pool compared with the lipid pool (Fig. 8B). The greater enrichment of 22:5-CoA, the elongation product of 20:5-CoA, compared with other LC-PUFA species might reflect a bottleneck arising from the required incorporation of 22:5-CoA into lipids before further desaturation and strongly suggests that the *O. tauri* endosomal Δ 4-desaturase works on lipidic substrates. As neither DGTA nor PDPT is present in *S. cerevisiae*, this would explain why only trace activity of this enzyme was detected in this heterologous host. Whether the enrichment of 20:4-CoA and 20:5-CoA species reflects an activity of the Δ 5-desaturase on acyl-CoA substrate and/or LC-PUFA acyl editing could possibly be answered by manipulating the expression of terminal desaturases in the native host.

Regulation of ALA and SDA Contents in Plastidial Lipids

The contents of ALA and SDA were remarkably stable between species and culture conditions, while the ALA/SDA ratio was highly variable. ALA conversion to SDA was obviously down-regulated under nutrient deprivation, resulting in an important decrease of SDA relative to ALA in plastidial lipids. To our knowledge, no equivalence of such a pronounced and located FA remodeling of plastidial lipids has ever been reported under nutrient starvation in other microalgae. The accumulation of ALA-containing galactolipids can be explained by the down-regulation of ALA-galactolipid desaturation. This would imply that MGDG/DGDG remain actively synthesized under nutrient deprivation, which is in agreement with the increased amount of galactolipids observed in nutrient-deprived cells (Fig. 7B). Acyl remodeling of existing plastidial lipids also might be involved in modulating the ALA/SDA ratio, especially in PG and SQDG. Indeed, the proportion of SDA is importantly and similarly reduced in these lipids under both N and P deprivation,

whereas the cellular amount of PG is reduced under P deprivation and that of SQDG remains stable under N deprivation, suggesting a reduced turnover of these lipids. The reflection of the ALA/SDA ratio changes in accumulating TAGs, suggests that TAG synthesis serves to regulate the ALA and SDA contents of plastidial lipids (Fig. 8, C and E). Whether the $\Delta 6$ -acyl-CoA desaturase and/or another plastidial $\Delta 6$ -desaturase are involved in regulating ALA and SDA contents in plastidial lipids would be interesting to specify. Although the physiological relevance of regulating the ALA/SDA ratio in plastidial lipids remains to be clarified, it is likely related to photosynthetic acclimation. The crucial role of plastidial lipids for the organization of photosystems in thylakoid membranes and the involvement of unsaturated FAs in photoacclimation to temperature changes have been demonstrated in plants and cyanobacteria (Allakhverdiev et al., 2009; Boudière et al., 2014). On the other hand, N and P nutrient stresses are known to affect the efficiency of photosystems, in particular PSII, by affecting the structure of light-harvesting complexes and/or reaction centers (Jiang et al., 2012; Napoléon et al., 2013). N shortage also has been reported to result in reducing the linear electron flow and increasing alternative electron flow in several microalgae (Simionato et al., 2013; Juergens et al., 2015). However, how lipid and/or FA remodeling is precisely related to functional changes in thylakoid membranes remains to be investigated.

Octadecapentaenoic Acid

Octadecapentaenoic acid was restricted exclusively to galactolipids and occurred only in combination with 16:3 and 16:4. 18:5n-3 was first identified from dinoflagellates (dinophytes) and, thereafter, found in raphidophytes and haptophytes. In these microalgae, 18:5 was shown to be confined to galactolipids, as revealed for *Ostreococcus* in this work (Bell et al., 1997; Leblond and Chapman, 2000). As suggested by Bell et al. (1997), 18:5n-3 might be more widespread in microalgae than thought, as 18:5n-3 might have been misidentified as 20:1n-9 in many studies. The most reasonable hypothesis about 18:5n-3 synthesis is the existence of a yet uncharacterized $\Delta 3$ -desaturase. Our results suggest that the likely substrates of this putative $\Delta 3$ -desaturase are 18:4/16:4 galactolipid species in *O. tauri*. Whether 18:5n-3 confers specific physiological properties to thylakoid membrane compared with EPA, which is a major component of galactolipids in EPA-producing species, remains to be discovered (Eichenberger and Gribo, 1997; Guschina and Harwood, 2006).

Hexadecatetraenoic Acid Occurrence in Structural Lipids

The omnipresence of 16:4n-3 in *Ostreococcus* lipids together with the absence of 16:4-acyl-CoA species raises interesting questions with respect to the lipidic substrate required for the synthesis of this FA and its

possible transfer between lipids. In plants, C16-PUFAs are the hallmark of plastidial lipids. In microalgae such as *T. tricorutum* and *C. reinhardtii*, C16-PUFAs are preferentially found in plastidial lipids, and the synthesis of 16:3n-4 and 16:4n-3, respectively, is thought to occur in the chloroplast (Domergue et al., 2003; Abida et al., 2015; Li-Beisson et al., 2015). In *C. reinhardtii*, 16:4n-3 is found exclusively in MGDG (Nguyen et al., 2013) and has been shown to arise from the desaturation of MGDG species by a plastidial $\Delta 4$ -desaturase specific of MGDG (Cr $\Delta 4$ FAD; Zäuner et al., 2012). In *Ostreococcus*, 16:4n-3 represents the highest share of FAs in MGDG but also is a major FA of PDPT (about 20%) and to a lesser extent of DGTA (about 10%). This is similar to *Dunaliella* species, in which 16:4n-3 is abundant in MGDG but also represents about 10% of the FAs in PC and PE (Evans and Kates, 1984). The putative *O. tauri* homolog of Cr $\Delta 4$ FAD (GenBank accession no. CEG00114.1) is predicted to be located in the chloroplast. As suggested by Li-Beisson et al. (2015) for Cr $\Delta 4$ FAD, it might be that the *O. tauri* homolog is located in the chloroplast envelope and has access to different lipidic substrates through ER-chloroplast junctions even more likely to occur in a compact organism. The detection of PDPT and DGTA species such as 14:0/16:3n-3 and 16:0/16:3n-3, which might correspond to precursors of 14:0/16:4n-3 and 16:0/16:4n-3, together with the absence of 16:4-acyl-CoA support this hypothesis (Supplemental Fig. S7). Noteworthy, 16:4 was always detected at the *sn-2* position in extraplastidial lipids (30:4, 32:4, 34:4, 36:8, 36:9, and 38:10). C16:3 was reported to be preferentially located at the *sn-2* position of PC and DGTA in *Chlorella* species (Dembitsky, 1996).

Although plant ER LPAATs do not display significant activity toward the C16 acyl group, it cannot be excluded that, in *O. tauri*, a putative endosomal LPAAT accepts 16:3-acyl-CoA as a substrate, possibly arising from 16:3 export from the chloroplast (see below); *sn-2*-16:3-PDPT and DGTA species would be further desaturated to 16:4 species, as proposed above. An alternative and audacious hypothesis is that entire (16:3)16:4-glycerol moieties of plastidial origin would be exported to the ER. However, except for di-SFA plastidial species, SFAs are at the *sn-2* position in plastidial lipids, whereas they are at the *sn-1* position in extraplastidial lipids, and the acyl pattern *sn-1*-16:0/*sn-2*-16:4 of PDPT and DGTA species is not detected in plastidial lipids. Therefore, this hypothesis implies that putative plastidial 16:0/16:3 and 16:0/16:4 DAG species would be specifically exported outside the chloroplast to serve as precursors for DGTA and PDPT synthesis in the ER. Further work, such as investigating *O. tauri* acyltransferase specificities, would be required to clarify whether 16:0/16:4 DAG could be of plastidial origin. Finally, a di-16:4 species was detected in MGDG, and 16:4 was located at the *sn-1* position in SQDG. Since MGDG is the most abundant structural lipid and displays the highest proportion of 16:4 among all lipids, it is the most likely source of 16:4. 16:4/16:4 MGDG

species might have a pivotal role in providing 16:4-ACP or 16:4-glycerol backbones for the synthesis of other lipids, including TAGs (see below). The mechanisms underlying the positional specificity of 16:4 and its possible transfer between lipids remain to be investigated.

Acyl Positioning in Structural Lipids

Fatty acid patterns of de novo synthesized glycerolipids are established according to the selectivities of acyltransferase for acyl chains from both acyl donor and acyl acceptor. In plants, plastidial GPATs possess a more or less pronounced selectivity for the 18:1 acyl group, while the LPAATs exclusively direct 16:0 to the *sn*-2 position so that the prokaryotic fatty acid pattern is established. Conversely, plant microsomal GPATs have a modest preference for palmitoyl-CoA, whereas the microsomal LPAAT displayed a strong selectivity for both 18:1 acyl acceptor and 18:1 acyl donor, resulting in the configuration *sn*-1/*sn*-2 16:0/18:X and 18:X/18:X (X<0) in glycerolipids arising from the so-called eukaryotic pathway. Based on these distinctive FA patterns between ER and plastidial lipids, it was demonstrated that the transfer of ER-synthesized DAG to the chloroplast occurs in plants, giving rise to the eukaryotic pattern of some plastidial lipids. The substrate selectivities of microalgal GPAT and LPAATs have not been investigated except for the LPAAT1 of *C. reinhardtii*, which was recently reported to prefer 16:0-acyl-CoA over 18:1-CoA in vitro (Yamaoka et al., 2016). In *O. tauri* similar to *C. reinhardtii*, only plastidial lipids of prokaryotic type occur, strongly suggesting the absence of lipid transfer from the ER to the chloroplast. Plastidial lipids of prokaryotic type commonly occur in green microalgae; an exception is *Chlorella kessleri*, for which a contribution of the so-called eukaryotic pathway to the synthesis of galactolipids has been clearly demonstrated (Sato et al., 2003). In *O. tauri*, the plastidial GPAT and LPAAT preference for C18:1 might be conserved, and the formation of di-SFA species would arise from high 14:0 and 16:0 fluxes, driving their incorporation at the *sn*-1 position of some DAGs further channeled for PG, SQDG, and DGDG synthesis.

The *sn*-1 localization of SFA was the most striking feature of *O. tauri* nonplastidial lipids and was in agreement with previous reports from other microalgae (Dembitsky, 1996). That major PDPT and DGTA species (30:0 and 30:4) display an SFA at the *sn*-1 position suggests that the microsomal GPAT might display a preference for SFA as in plants. In *O. tauri*, however, only one GPAT predicted to be plastidial was identified from bioinformatic analysis (Misra et al., 2012). Interestingly, microalgae genome-wide analysis failed to identify LPAAT2, which is a typical ER LPAAT of plants, but showed that a single homolog of soluble LPAAT was ubiquitous among algal lineages (Misra et al., 2014). The soluble LPAAT of *Arabidopsis thaliana* was demonstrated to be plastidial and to display a broad specificity for acyl-CoA donors,

including 16:0-CoA in vitro (Ghosh et al., 2009). Specifying substrate selectivities of microalgal GPAT and LPAAT would help to apprehend pathways involved in glycerolipid synthesis.

Lipid Remodeling under Nutrient Deprivation

N and P enter into the composition of proteins, nucleic acids, and PLs (Raven, 2015). N and P deprivation triggers microalgal metabolic reorientations that involve lipid metabolism (Dyhrman et al., 2012; Schmollinger et al., 2014; Levitan et al., 2015). N and P deprivation of *O. tauri* culture resulted in cell division arrest and triggered structural lipid remodeling as well as TAG and starch accumulation. In agreement with the literature, N deprivation appeared to be more stringent than P deprivation, resulting in an earlier growth arrest and a higher TAG accumulation (Sharma et al., 2012; Fields et al., 2014). An important increase of DGDG was observed in *Ostreococcus* under both N and P deprivation. The increase of DGDG upon N deprivation, which has been commonly reported in plants and microalgae, is thought to allow the maintenance of bilayers in thylakoid membranes that are greatly destabilized by the loss of protein from which nitrogen is recycled. PL remobilization and replacement by phosphorus-free polar lipids is a universal response to P deprivation. Under P starvation, BLs are known to replace PLs in photosynthetic bacteria, fungi, as well as microalgae (Benning et al., 1995; Güler et al., 1996; Van Mooy et al., 2006; Riekhof et al., 2014). The increase of DGDG under P starvation is known to occur in plants, where DGDG of nonchloroplastic FA composition was shown to replace PLs in extraplastidial membranes (Härtel et al., 2000). DGDG also has been proposed to compensate the loss of PE in the eustigmatophyte *Monodus subterraneus* (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006). In *O. tauri*, DGTA most likely replaces PDPT, and it seems unlikely that DGDG, whose FA composition is not related to that of PDPT, is exported to nonplastidial membranes. Rather, it might be that DGDG increases to compensate the protein loss of thylakoid membranes either directly triggered by P deprivation or indirectly via the inhibition of N assimilation (Raven, 2015).

TAG Origin?

In plants, TAGs are thought to arise mainly from ER synthesis via the Kennedy pathway. DAG precursors of TAGs originate either from de novo synthesis or from head exchange between DAG and PC performed by the PC:DAG cholinephosphotransferase (Bates and Browse, 2012). The monoacylglycerol pathway has been proposed as an alternative pathway for TAG biosynthesis in microalgae. In this pathway, *sn*-2 monoacylglycerols are formed by *sn*-2-specific GPATs and further converted to DAG by monoacylglycerol acyltransferase (Zienkiewicz et al., 2016). The final acylation

step of the DAG precursor of TAGs uses acyl groups either from the acyl-CoA pool via the activity of diacylglycerol acyltransferase (DAGAT) or from complex lipids via the activity of phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT). In microalgae, however, there is now clear evidence that the chloroplastic pathway is the major pathway for TAG synthesis (Li-Beisson et al., 2015; Lenka et al., 2016). In particular, CrPDAT is thought to be responsible for the synthesis of TAGs that would arise as coproducts of chloroplastic membrane remodeling or degradation during the active phase of growth of *C. reinhardtii* (Li et al., 2012; Yoon et al., 2012). This enzyme was demonstrated to accept a wide variety of acyl donors, of which MGDG, SQDG, and PG would be favored *in vivo*, and preferentially uses DAGs of prokaryotic origin as acyl acceptors for TAG synthesis. Although the conservation of PDAT function between microalgae needs to be ascertained, the putative *Micromonas* PDAT and CrPDAT belong to the same phylogenetic clade (Pan et al., 2015).

O. tauri TAGs were enriched in FAs diagnostic for plastidial lipids and probably contributed to the regulation of the ALA/SDA ratio, clearly indicating an important and regulated transfer of plastidial lipids into TAGs. Interestingly, LC-PUFAs occurred in numerous TAG species, in which they were detected at the *sn-1* and/or *sn-3* position but never at the *sn-2* position. As LC-PUFA species, especially DHA, were abundant in the acyl-CoA pool while poorly represented in DAGs compared with TAGs, the major mechanism for LC-PUFA TAG synthesis appears to involve DAGAT enzymes. The occurrence of 16:4 at a lateral position of 56:13 TAG species likely originating from the ER DAG precursor possibly results from the incorporation of 16:4 at the *sn-3* position of DAGs through direct transfer from the *sn-2* position of extraplastidial lipids. Noteworthy, several TAG species were obviously of mixed origin, including the major species 52:10 (16:4/14:0/22:6) as well as the TAG species 56:15, 56:11, 56:13 (and possibly 56:14), which all display 18:5 and LC-PUFAs at lateral positions. The identification of 18:5/18:1/20:5 clearly indicates that 18:5 can be incorporated into ER-synthesized DAGs. Together with the detection of 18:5-acyl-CoA, the occurrence of such a species suggests that a DAGAT would transfer 18:5-CoA to an ER DAG precursor.

With respect to the origin of the DAG precursor of TAGs, it was striking that most and major TAG species displayed 14:0 or 16:0 at the *sn-2* position while 18:X (where $X < 5$) occurred most rarely (species 56:11, 56:13, and possibly 56:14). Although neither PDPT nor DGTA displayed an SFA at the *sn-2* position, it could be that ER-synthesized DAG precursors bearing 14:0 and 16:0 at the *sn-2* position would be channeled for TAG synthesis. The detection of the minor species 22:6/14:0/22:6, whose acyl pattern is not in agreement with that of structural lipid, might reflect this channeling and/or the existence of an unconventional pathway for TAG synthesis. Nonetheless, the *sn-2* positioning of 14:0 and 16:0 was an obvious feature of plastidial lipids, suggesting

that DAGs, precursors of major TAG species, are of chloroplastic origin. It was further striking that numerous TAG species displayed side/central combinations reflecting *sn-1/sn-2* FA positions detected in galactolipid species (18:3/14:0/16:4, 18:4/14:0/16:4, 18:3/16:4/18:4, 18:4/16:4/18:4, and 18:5/16:4/22:6). In particular, the pattern *sn-1/3* 18:X *sn-2* 16:4 in the major TAG species (52/11) strongly recalls the FA patterns of mature MGDG species. Moreover, the 48:8 TAG species, in which 16:4 is found at both extremities of the TAG molecule, can only originate from an *sn-1* 16:4-DAG precursor that is probably of plastidial origin, as discussed above. These observations strongly suggest that DAG precursors of plastidial origin, if not entire glycerol moieties from plastidial lipids, might be involved in the synthesis of TAGs. The direct conversion of MGDG to DAG and then to TAG accumulating upon heat stress has been reported to occur in *C. reinhardtii* (Légeret et al., 2016). In plants, the gene *SFR2* is known to be responsible for the production of DAG from MGDG molecules under freezing stress (Moellering and Benning, 2011). The mechanism involved in *C. reinhardtii* remained elusive and seemed to be unrelated to the activity of a galactosylgalactolipid glycosyltransferase known to be encoded by *SFR2* in higher plants.

CONCLUSION

Ostreococcus displays combined lipidic features of two distantly related lineages. Therefore, we expect that future work dedicated to unraveling pathways associated with the generation of these features will be broadly informative. The FA positional distribution and partitioning into different classes of lipids, the tight regulation of the ALA/SDA ratio in plastidial lipids, and the accumulation of highly unsaturated TAGs under nutrient deprivation make *O. tauri* an attractive model with which to decipher the dynamic processes underlying the regulation of structural lipids in membranes and, possibly, to understand the physiological role of PUFAs in biological membranes of microalgae. From a biotechnological point of view, unraveling the mechanisms involved in the synthesis of TAG species containing highly valuable FAs for animal health, such as ALA, SDA, and DHA, might have important consequences.

MATERIALS AND METHODS

Microalgal Strains and Culture Conditions

Microalgal strains, except *Ostreococcus tauri*, were obtained from the Roscoff Culture Collection. *O. tauri* corresponded to the strain OTTH0595. Growth and bacterial contamination were monitored by flow cytometry after SYBR staining according to Corellou et al. (2005). Bacterial contamination was initially high in *Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinos*, *Ostreococcus* sp. RCC 809, and *Ostreococcus lucimarinus* RCC 3401 and was reduced to the minimum level by cycles of centrifugation/resuspension and antibiotic treatment (1 mg mL⁻¹ penicillin, 1 mg mL⁻¹ streptomycin sulfate, 0.5 mg mL⁻¹ gentamycin, or 0.5 mg L⁻¹ ciprofloxacin purchased from Sigma-Aldrich). All strains were maintained in

natural seawater supplemented with F/2 components (https://ncma.bigelow.org/media/pdf/NCMA-algal-medium-f_2.pdf) in aerated flasks (Sarstedt) under natural light at 20°C. Strains were acclimated for at least 3 weeks to defined culture conditions before analysis. When not stated otherwise, cultures analyzed were grown in Erlenmeyer flasks in growing chambers with constant agitation under constant white light ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 20°C. For nutrient deprivation experiments, artificial seawater was used as the base ($4.1 \times 10^{-1} \text{ M NaCl}$, $8 \times 10^{-3} \text{ M KCl}$, $3.2 \times 10^{-2} \text{ M MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and $2.7 \times 10^{-3} \text{ M CaCl}_2$, pH 8.2, adjusted with NaHCO_3 and HCl) supplemented by F/2 components. One-fold concentrations of NaNO_3 and NaH_2PO_4 were $8.82 \times 10^{-6} \text{ M}$ and $36 \times 10^{-6} \text{ M}$, respectively. Cells were acclimated for 8 d to artificial medium and maintained in exponential growing phase (20 to 30×10^6 cells mL^{-1}) by regular dilution. Cells were switched to medium 10 times enriched in both NaH_2PO_4 and NaNO_3 for control culture (ASW 10N10P) or lacking one of the two elements and enriched in the other (ASW 10N0P or ASW 0N10P) for deprivation. The time of deprivation was chosen so that growth arrest, FA profile changes, and TAG accumulation had occurred in both N- and P-deprived cultures and that the effects could be reversed by nutrient repletion. The initial cell density (20×10^6 cells mL^{-1}) was chosen so that control cells had reached late exponential phase at the end of the experiment in order to obtain sufficient amounts of TAGs for a reliable FA quantification between control and deprived cells. Three days of deprivation was found to be optimal.

Cell Extraction

Cells were disrupted at 4°C in microtubes by bead beating (glass beads; cycles of 30 Hz min^{-1} in a tissue lyzer) in the appropriate solvent depending on whether lipid or total FAME analysis was achieved. Cells were reextracted until a whitish pellet was obtained from the centrifuged extract (10,000g, 10 min). Extracts cleared from cells debris were transferred to glass tubes kept on ice. Extraction corresponded to a yield of 90% to 95% as checked by FAME quantification from the pellet.

FA Analysis

FAME preparation was achieved by extracting samples (cells or purified lipids) in 2 mL of acidic methanol (2% H_2SO_4) containing heptadecanoic acid (2 or 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as an internal standard and butylated hydroxytoluene as an antioxidant (final concentration, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). FA transmethylation was achieved by heating samples at 90°C for 1 h in screw-cap glass tubes. Equal volumes of 2.5% (v/v) NaCl and 1 mL of hexane were added, and FAMES were extracted into hexane. Separation of FAMES was performed by gas chromatography (Hewlett-Packard 5890 series II; Agilent) on a $15\text{-m} \times 0.53\text{-mm} \times 1.2\text{-}\mu\text{m}$ Carbowax column (Alltech) with flame ionization detection. Oven temperature was programmed for 1 min at 150°C, followed by a 5°C min^{-1} ramp to 230°C, and maintained at this temperature (total run time, 30 min). Routinely, FAs were identified by comparing retention times with those of commercial and homemade standards (37-component FAME mix, PUFA source no. 1, PUFA source no. 3 [Sigma-Aldrich], Arabidopsis FAMES for 16:1t and 16:3n-3, and *Chlamydomonas reinhardtii* FAMES for 16:4n-3). FAs were quantified by the surface peak method using 17:0 for calibration. Peak integration was performed using ChemStation software (Agilent), and data were further processed using a homemade Excel macro provided by Dr. Christophe Garcion.

Lipid Analysis

For lipid class analysis, lipids were extracted in chloroform:methanol (2:1, v/v) and 10% butylated hydroxytoluene. Phase separation was achieved by the addition of 0.5 volume of aqueous solution (50 mM Tris, pH 7, and 0.9% NaCl) followed by a brief centrifugation (1,000g, 5 min). The lower organic phase was collected and washed with 0.25 volume of water. The upper aqueous phase was reextracted with 1 volume of chloroform and pooled with the previously collected organic phases. Lipid extracts were concentrated by evaporation under N flux and resuspended in chloroform:methanol (2:1, v/v). This procedure allowed the recovery of intact glycerolipids, as reflected by the absence of or faintly detected PA and free FAs. Lipids were separated by HPTLC onto glass-backed silica gel plates (Merck) using the resolving systems indicated in the text. Routine one-dimensional development was performed in an ADC2-Chamber system (CAMAG) under controlled humidity of 33%. Lipids were revealed either by 2% (v/v) 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid or by primuline. Following FAME preparation, FAs were quantified by GC-FID as

described above. Molybdenum Blue and Draggendorff reagent were obtained as ready-to-use solutions from Sigma-Aldrich.

Acyl-CoA Analysis

Freshly harvested material was frozen in liquid nitrogen, and acyl-CoAs were extracted as described by Larson and Graham (2001) and analyzed using liquid chromatography-MS/MS plus multireaction monitoring in positive ion mode. Acyl-CoA extraction efficiency was normalized to a 17:0 CoA (Sigma-Aldrich) internal standard. All samples were immediately analyzed after extraction and were maintained on a cooled stage prior to liquid chromatography-MS/MS plus multireaction monitoring analysis (using an ABSciex 4000 QTRAP device) as described by Haynes et al. (2008) using an Agilent 1200 LC system with a Agilent Eclipse XDB-C18 ($3 \times 100 \text{ mm}$; $3.5\text{-}\mu\text{m}$ particle size) column. For the purposes of identification and calibration, standard acyl-CoA esters with acyl chain lengths from C14 to C20 were purchased from Sigma-Aldrich as free acids or lithium salts.

Mass Spectrometry

Lipids were resolved by 2D-TLC and eluted for mass spectrometry analysis as described by Abida et al. (2015). Purified lipids were introduced by direct infusion (electrospray ionization-mass spectrometry) into a trap-type mass spectrometer (LTQ-XL; Thermo Scientific) and identified by comparison with standards. In these conditions, the ions produced were present mainly as H_2 , H^+ , NH_4^+ , or Na^+ adducts. Lipids were identified by MS^2 analysis with their precursor ion or by neutral loss analyses. FA positional analysis of glycerolipids was achieved as described previously by Abida et al. (2015), except that the positional analysis of PDPT was performed from adducts obtained in negative mode.

Transmission Electron Microscopy of Nutrient-Deprived *O. tauri* Cells

This procedure was adapted from Henderson et al. (2007). *O. tauri* cells were concentrated by pelleting 50 mL of culture (20 to 40×10^6 cells mL^{-1}) by centrifugation (5,000g, 1 min, 4°C). The cell pellet was gently resuspended in 2 mL of 10% 70-kD Ficoll as cryoprotectant (GE Healthcare Biosciences) in the appropriate cooled artificial seawater medium, transferred to 1.5-mL microcentrifuge tubes, and pelleted again (5,000g, 1 min, 4°C). Most of the supernatant was discarded, leaving $\sim 10 \mu\text{L}$ of liquid to resuspend the cells by gentle finger tap. The loose pellet was kept on ice. Cells were transferred into flat specimen carriers and high pressure frozen in an EM-PACT1 device (Leica). The samples were freeze substituted with 1% osmium tetroxide in pure acetone using the AFS2 system (Leica). Samples were held at -90°C for 48 h and then warmed to room temperature at a rate of 3°C h^{-1} . Samples were then infiltrated progressively, embedded in Spurr resin (Electron Microscopy Science), and polymerized at 70°C for 16 h. Ultrathin sections (70 nm) were obtained with a Reichert Ultratuc S ultramicrotome and observed at 80 kV on the FEI Tecnai G2 Spirit TWIN 120 kV transmission electron microscope equipped with a 16-megapixel Eagle 4k CCD camera. ImageJ software was used for cell measurements.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession number: *O. tauri* Cr. plastidial delta4 homolog, GenBank CEG00114.1.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Identification of DGTA by mass spectrometry.

Supplemental Figure S2. Identification of phosphatidyl dimethylpropane-thiol in *O. tauri*.

Supplemental Figure S3. One-dimensional HPTLC development of polar and neutral lipids of Mamiellales species.

Supplemental Figure S4. Variation of lipid and FA profiles in the genus *Ostreococcus* according to the experimental set.

- Supplemental Figure S5.** FA composition of *O. tauri* PLs and DGTA.
- Supplemental Figure S6.** FA composition of steryl esters of *Ostreococcus* Mediterranean species.
- Supplemental Figure S7.** Positional analysis of FA in polar glycerolipids.
- Supplemental Figure S8.** FA positional analysis in TAGs.
- Supplemental Figure S9.** Effect of N and P deprivation on lipid and FA profiles of various lipid pools.
- Supplemental Figure S10.** FA composition changes upon the kinetics of nutrient depletion and repletion.
- Supplemental Figure S11.** Phylogenetic tree representing chosen photosynthetic organisms.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Garcion for providing an appropriate macro for automated FA chromatogram analysis, M. Le Guédard for technical assistance with GC-FID, and L. Brocard, B. Batailler, L. Gan, and M.S. Ladinsky for technical advice for transmission electron microscopy; imaging was performed at the Bordeaux Imaging Center subgroup of the national infrastructure France BioImaging, and routine lipid analyses were performed at the Metabolome Facility of Bordeaux-MetaboHUB.

Received September 20, 2016; accepted February 23, 2017; published February 24, 2017.

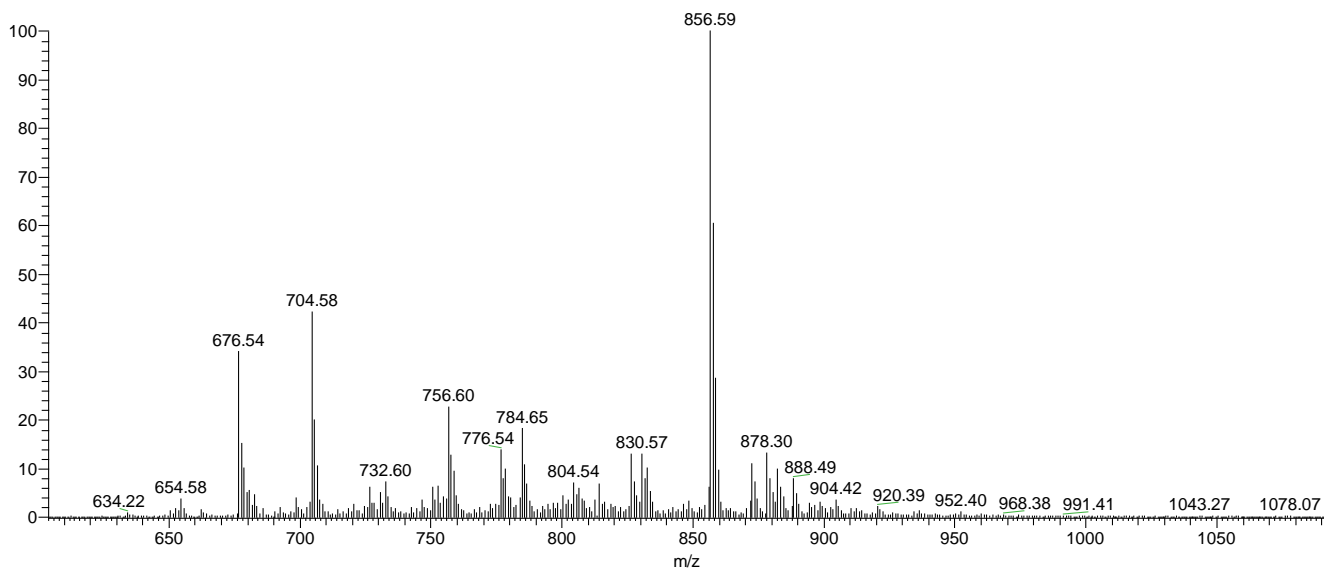
LITERATURE CITED

- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C, et al (2015) Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricornerutum*. *Plant Physiol* **167**: 118–136
- Adarme-Vega TC, Lim DK, Timmins M, Vernen F, Li Y, Schenk PM (2012) Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb Cell Fact* **11**: 96
- Ahmann K, Heilmann M, Feussner I (2011) Identification of a Delta4-desaturase from the microalga *Ostreococcus lucimarinus*. *Eur J Lipid Sci Technol* **113**: 832–840
- Allakhverdiev SI, Los DA, Murata N (2009) Regulatory roles in photosynthesis of unsaturated fatty acids in membrane lipids. In H Wada, N Murata, eds, *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 373–388
- Armada I, Hachero-Cruzado I, Mazuelos N, Ríos JL, Manchado M, Cañavate JP (2013) Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* **95**: 224–233
- Bates PD, Browse J (2012) The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Front Plant Sci* **3**: 147
- Bates PD, Fatih 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 Physiol* **160**: 1530–1539
- Bell MV, Dick JR, Pond D (1997) Octadecapentaenoic acid in a Raphidophytes alga, *Heterosigma akashiwo*. *Phytochemistry* **45**: 303–306
- Benning C, Huang ZH, Gage DA (1995) Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Arch Biochem Biophys* **317**: 103–111
- Berdeaux O, Juaneda P, Martine L, Cabaret S, Bretillon L, Acar N (2010) Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1217**: 7738–7748
- Bisseret P, Ito S, Tremblay PA, Volcani BE, Dessort D, Kates M (1984) Occurrence of phosphatidylsulfocholine, the sulfonium analog of phosphatidylcholine in some diatoms and algae. *Biochim Biophys Acta* **796**: 320–327
- Blanc-Mathieu R, Verhelst B, Derelle E, Rombauts S, Bouget FY, Carré I, Château A, Eyre-Walker A, Grimsley N, Moreau H, et al (2014) An improved genome of the model marine alga *Ostreococcus tauri* unfolds by assessing Illumina de novo assemblies. *BMC Genomics* **15**: 1103
- Boudière L, Michaud M, Petroutsos 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
- Cañavate JP, Armada I, Ríos JL, Hachero-Cruzado I (2016) Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* **124**: 68–78
- Cohen Z, Khozin-Goldberg I, Adlerstein D, Bigogno C (2000) The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochem Soc Trans* **28**: 740–743
- Corellou F, Camasses A, Ligat L, Peaucellier G, Bouget FY (2005) Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* **138**: 1627–1636
- Corellou F, Schwartz C, Motta JP, Djouani-Tahri B, Sanchez F, Bouget FY (2009) Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell* **21**: 3436–3449
- Courties C, Vaquer A, Trousselier M, Lautier J, Chrétiennot-Dinet MJ, Neveux J, Machado C, Claustre H (1994) Smallest eukarotic organism. *Nature* **370**: 255
- 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
- Dembitsky VM (1996) Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Prog Lipid Res* **35**: 1–51
- Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouzé P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynié S, Cooke R, et al (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11647–11652
- Domergue F, Abbadi A, Zähringer U, Moreau H, Heinz E (2005) In vivo characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochem J* **389**: 483–490
- Domergue F, Spiekermann P, Lerchl J, Beckmann C, Kilian O, Kroth PG, Boland W, Zähringer U, Heinz E (2003) New insight into *Phaeodactylum tricornerutum* fatty acid metabolism: cloning and functional characterization of plastidial and microsomal Δ 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
- Dorne AJ, Joyard J, Douce R (1990) Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 71–74
- Dunstan GA, Volkman JK, Jeffrey SW, Barrett SM (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *J Exp Mar Biol Ecol* **161**: 115–134
- Dyhrman ST, Jenkins BD, Ryneerson TA, Saito MA, Mercier ML, Alexander H, Whitney LP, Drzewianowski A, Buligin 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
- Eichenberger W, Gribo C (1997) Lipids of *Pavlova lutheri*: cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry* **45**: 1561–1567
- Evans RW, Kates M (1984) Lipid composition of halophilic species of *Dunaliella* from the dead sea. *Arch Microbiol* **140**: 50–56
- Fields MW, Hise A, Lohman EJ, Bell T, Gardner RD, Corredor L, Moll K, Peyton BM, Characklis GW, Gerlach R (2014) Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 4805–4816
- 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
- Frommolt R, Werner S, Paulsen H, Goss R, Wilhelm C, Zauner S, Maier UG, Grossman AR, Bhattacharya D, Lohr M (2008) Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis. *Mol Biol Evol* **25**: 2653–2667
- Fulton JM, Fredricks HF, Bidle KD, Vardi A, Kendrick BJ, DiTullio GR, Van Mooy BA (2014) Novel molecular determinants of viral susceptibility and resistance in the lipidome of *Emiliania huxleyi*. *Environ Microbiol* **16**: 1137–1149

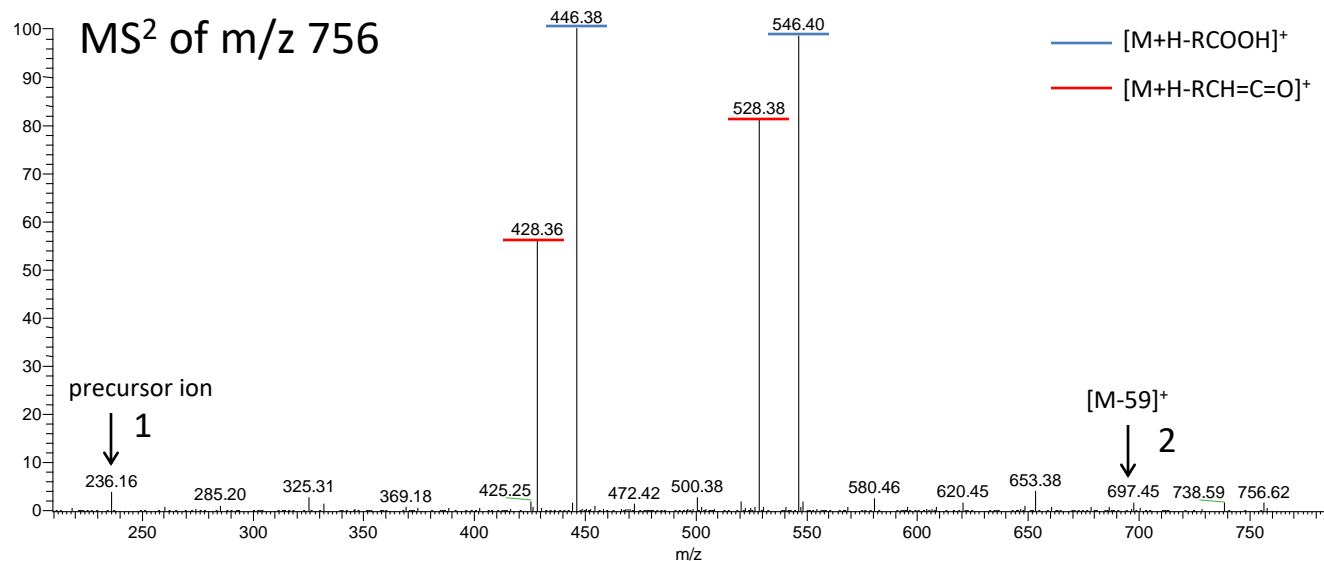
- Ghosh AK, Chauhan N, Rajakumari S, Daum G, Rajasekharan R** (2009) At4g24160, a soluble acyl-coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant Physiol* **151**: 869–881
- Giordano M, Prioretti L** (2016) Sulphur and algae: metabolism, ecology and evolution. In MA Borowitzka, J Beardall, JA Raven, eds, *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 185–209
- Gladyshev MI, Sushchik NN, Makhutova ON** (2013) Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **107**: 117–126
- Güler S, Seeliger A, Härtel H, Renger G, Benning C** (1996) A null mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J Biol Chem* **271**: 7501–7507
- Guschina IA, Harwood JL** (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* **45**: 160–186
- Hamilton ML, Powers S, Napier JA, Sayanova O** (2016) Heterotrophic production of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by trophically converted marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar Drugs* **14**: 14
- Härtel H, Dormann P, Benning C** (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplasmidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10649–10654
- 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. *J Lipid Res* **49**: 1113–1125
- Henderson GP, Gan L, Jensen GJ** (2007) 3-D ultrastructure of *O. tauri*: electron cryotomography of an entire eukaryotic cell. *PLoS ONE* **2**: e749
- Heydarizadeh P, Poirier I, Loizeau D, Ulmann L, Mimouni V, Schoefs B, Bertrand M** (2013) Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids. *Mar Drugs* **11**: 3425–3471
- Hoffmann M, Wagner M, Abbadì A, Fulda M, Feussner I** (2008) Metabolic engineering of omega3-very long chain polyunsaturated fatty acid production by an exclusively acyl-CoA-dependent pathway. *J Biol Chem* **283**: 22352–22362
- 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
- Jiang Y, Yoshida T, Quigg A** (2012) Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiol Biochem* **54**: 70–77
- Juergens MT, Deshpande RR, Lucker BF, Park JJ, Wang H, Gargouri M, Holguin FO, Disbrow B, Schaub T, Skepper JN, et al** (2015) The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **167**: 558–573
- Khazin-Goldberg I, Cohen Z** (2006) The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneanus*. *Phytochemistry* **67**: 696–701
- Khazin-Goldberg I, Cohen Z** (2011) Unraveling algal lipid metabolism: recent advances in gene identification. *Biochimie* **93**: 91–100
- Kim SH, Ahn HM, Lim SR, Hong SJ, Cho BK, Lee H, Lee CG, Choi HK** (2015) Comparative lipidomic profiling of two *Dunaliella tertiolecta* strains with different growth temperatures under nitrate-deficient conditions. *J Agric Food Chem* **63**: 880–887
- Kumari P, Kumar M, Reddy CRK, Jha B** (2013) *Algal Lipids, Fatty Acids and Sterols*. Woodhead Publishing Online doi/10.1533/9780857098689.1.87
- Künzler K, Eichenberger W, Radunz A** (1997) Intracellular localization of two betaine lipids by cell fractionation and immunomicroscopy. *Z Naturforsch C* **52**: 487–495
- Lang I, Hodac L, Friedl T, Feussner I** (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol* **11**: 124
- Larson TR, Graham IA** (2001) A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J* **25**: 115–125
- Leblond DL, Chapman PJ** (2000) Lipid class distribution of highly unsaturated long chain fatty acids in marine dinoflagellate. *J Phycol* **36**: 1103–1108
- Légeret B, Schulz-Raffelt M, Nguyen HM, Auroy P, Beisson F, Peltier G, Blanc G, Li-Beisson Y** (2016) Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids. *Plant Cell Environ* **39**: 834–847
- Lenka SK, Carbonaro N, Park R, Miller SM, Thorpe I, Li Y** (2016) Current advances in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis. *Biotechnol Adv* **34**: 1046–1063
- Letunic I, Bork P** (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* **44**: W242–W245
- Levitan O, Dinamarca J, Zelzion E, Lun DS, Guerra LT, Kim MK, Kim J, Van Mooy BA, Bhattacharya D, Falkowski PG** (2015) Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrogen stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 412–417
- Li T, Gargouri M, Feng J, Park JJ, Gao D, Miao C, Dong T, Gang DR, Chen S** (2015) Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour Technol* **180**: 250–257
- 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
- Liang KH, Zhang QH, Gu M, Cong W** (2013) Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *J Appl Phycol* **25**: 311–318
- Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W** (2015) Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **82**: 504–522
- Liu B, Benning C** (2013) Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Curr Opin Biotechnol* **24**: 300–309
- Lozano JC, Schatt P, Botebol H, Vergé V, Lesuisse E, Blain S, Carré IA, Bouget FY** (2014) Efficient gene targeting and removal of foreign DNA removal by homologous recombination in the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant J* **78**: 1073–1083
- Marin B, Melkonian M** (2010) Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons. *Protist* **161**: 304–336
- Martin GJ, Hill DR, Olmstead IL, Bergamin A, Shears MJ, Dias DA, Kentish SE, Scales PJ, Botté CY, Callahan DL** (2014) Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLoS ONE* **9**: e103389
- Massana R** (2011) Eukaryotic picoplankton in surface oceans. *Annu Rev Microbiol* **65**: 91–110
- Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadì A, Sperling P, Bauer J, Cirpus P, Zank TK, Moreau H, Roscoe TJ, et al** (2004) Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res* **45**: 1899–1909
- Misra N, Panda PK, Parida BK** (2014) Genome-wide identification and evolutionary analysis of algal LPAT genes involved in TAG biosynthesis using bioinformatic approaches. *Mol Biol Rep* **41**: 8319–8332
- Misra N, Panda PK, Parida BK, Mishra BK** (2012) Phylogenomic study of lipid genes involved in microalgal biofuel production-candidate gene mining and metabolic pathway analyses. *Evol Bioinform Online* **8**: 545–564
- Mock T, Kroon BM** (2002) Photosynthetic energy conversion under extreme conditions. I. Important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry* **61**: 41–51
- Moellering ER, Benning C** (2011) Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends Plant Sci* **16**: 98–107
- Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D** (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* **324**: 1724–1726
- Mühlroth A, Li K, Røkke G, Winge P, Olsen Y, Hohmann-Marriott MF, Vadstein O, Bones AM** (2013) Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Mar Drugs* **11**: 4662–4697
- Napoléon C, Raimbault V, Claquin P** (2013) Influence of nutrient stress on the relationships between PAM measurements and carbon incorporation in four phytoplankton species. *PLoS ONE* **8**: e66423
- Nguyen HM, Cuiñé S, Beyly-Adriano A, Légeret B, Billon E, Auroy P, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y** (2013) The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has a single ω -3 fatty acid desaturase that localizes to the chloroplast and impacts both plastidic and extraplasmidic membrane lipids. *Plant Physiol* **163**: 914–928

- Niu YF, Zhang MH, Li DW, Yang WD, Liu JS, Bai WB, Li HY (2013) Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *Mar Drugs* **11**: 4558–4569
- Ohlrogge J, Browse J (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957–970
- Pan X, Peng FY, Weselake RJ (2015) Genome-wide analysis of PHOSPHOLIPID:DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE (PDAT) genes in plants reveals the eudicot-wide PDAT gene expansion and altered selective pressures acting on the core eudicot PDAT paralogs. *Plant Physiol* **167**: 887–904
- Parrish CC (2013) Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography* **2013**: 604045
- Peng KT, Zheng CN, Xue J, Chen XY, Yang WD, Liu JS, Bai W, Li HY (2014) Delta 5 fatty acid desaturase upregulates the synthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *J Agric Food Chem* **62**: 8773–8776
- Pineau B, Girard-Bascou J, Eberhard S, Choquet Y, Trémolières A, Gérard-Hirne C, Bennardo-Connan A, Decottignies P, Gillet S, Wollman FA (2004) A single mutation that causes phosphatidylglycerol deficiency impairs synthesis of photosystem II cores in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **271**: 329–338
- Raven JA (2015) Interactions between nitrogen and phosphorus metabolism. In WC Plaxton, H Lambers, eds, *Annual Plant Reviews: Phosphorus Metabolism in Plants*, Vol 48. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp 187–214
- 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 diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine. *Eukaryot Cell* **13**: 749–757
- 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
- Rodríguez F, Derelle E, Guillou L, Le Gall F, Vulot D, Moreau H (2005) Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environ Microbiol* **7**: 853–859
- Sato N, Mori N, Hirashima T, Moriyama T (2016) Diverse pathways of phosphatidylcholine biosynthesis in algae as estimated by labeling studies and genomic sequence analysis. *Plant J* **87**: 281–292
- Sato N, Suzuki M, Kawaguchi A (2003) Glycerolipid synthesis in *Chlorella kessleri* 11h. I. Existence of a eukaryotic pathway. *Biochim Biophys Acta* **1633**: 27–34
- Schaum E, Rost B, Millar AJ, Collins S (2013) Variation in plastic responses of a globally distributed picoplankton species to ocean acidification. *Nat Clim Chang* **3**: 298–302
- Schmollinger S, Mühlhaus T, Boyle NR, Blaby IK, Casero D, Mettler T, Moseley JL, Kropat J, Sommer F, Strenkert D, et al (2014) Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism. *Plant Cell* **26**: 1410–1435
- Sciuto S, Chillemi R, Morrone R, Patti A, Piattelli M (1988) Two new dragendorff-positive compounds from marine algae. *J Nat Prod* **51**: 1017–1020
- Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM (2012) High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* **5**: 1532–1553
- Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphylidès C, Li-Beisson Y, et al (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol* **11**: 7
- Simonotto 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
- Simon N, Cras AL, Foulon E, Lemée R (2009) Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C R Biol* **332**: 159–170
- Taipale S, Strandberg U, Peltomaa E, Galloway AWE, Ojala A, Brett MT (2013) Fatty acid composition as biomarker of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquat Microb Ecol* **71**: 165–178
- Tavares S, Grotkjær T, Obsen T, Haslam RP, Napier JA, Gunnarsson N (2011) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of eicosapentaenoic acid, using a novel Delta5-desaturase from *Paramecium tetraurelia*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1854–1861
- Trentacoste EM, Shrestha RP, Smith SR, Glé C, Hartmann AC, Hildebrand M, Gerwick WH (2013) Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 19748–19753
- Vaezi R, Napier JA, Sayanova O (2013) Identification and functional characterization of genes encoding omega-3 polyunsaturated fatty acid biosynthetic activities from unicellular microalgae. *Mar Drugs* **11**: 5116–5129
- Van Mooy BA, 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
- Van Mooy BA, Rocap G, Fredricks HF, Evans CT, Devol AH (2006) Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8607–8612
- Vaulot D, Eikrem W, Viprey M, Moreau H (2008) The diversity of small eukaryotic phytoplankton (< or = 3 microm) in marine ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 795–820
- Vitova M, Bisova K, Kawano S, Zachleder V (2015) Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnol Adv* **33**: 1204–1218
- 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
- Wagner M, Hoppe K, Czabany T, Heilmann M, Daum G, Feussner I, Fulda M (2010) Identification and characterization of an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiol Biochem* **48**: 407–416
- Weier D, Müller C, Gaspers C, Frentzen M (2005) Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 1127–1134
- Yamaoka Y, Achard D, Jang S, Legéret B, Kamisuki S, Ko D, Schulz-Raffelt M, Kim Y, Song WY, Nishida I, et al (2016) Identification of a *Chlamydomonas* plastidial 2-lysophosphatidic acid acyltransferase and its use to engineer microalgae with increased oil content. *Plant Biotechnol J* **14**: 2158–2167
- Yap BH, Crawford SA, Dagastine RR, Scales PJ, Martin GJ (2016) Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**: 1671–1680
- Yoon K, Han D, Li Y, Sommerfeld M, Hu Q (2012) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**: 3708–3724
- Zäuner S, Jochum W, Bigorowski T, Benning C (2012) A cytochrome b5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **11**: 856–863
- Zienkiewicz K, Du ZY, Ma W, Vollheyde K, Benning C (2016) Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae: molecular, cellular and physiological insights. *Biochim Biophys Acta* **1861**: 1269–1281

A



B

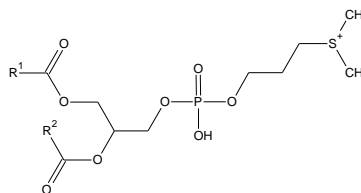


Supplemental figure 1. Identification of DGTA by mass spectrometry.

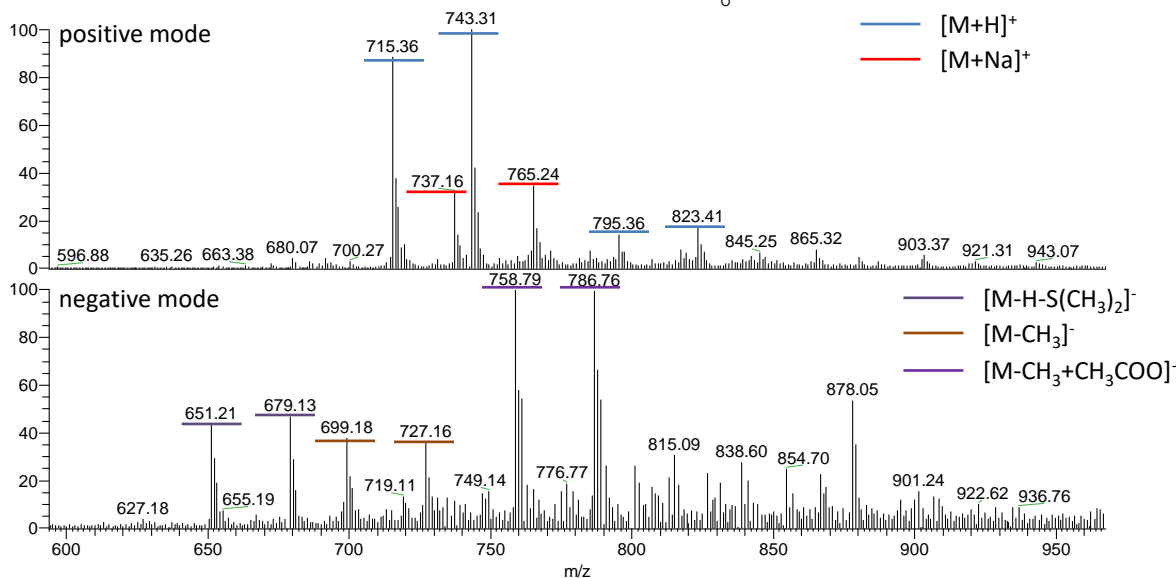
A. Full scan spectrum in positive mode of the 2D-TLC spot called DGTA in Figure 3. B. MS² analysis of the m/z 756. Arrow heads indicate fragments corresponding to the DGTA signature: 1: precursor m/z 236 corresponds to the polar head mass of either DGTA or DGTS 2: the fragment 697 results from a neutral loss of 59 from m/z 756 that is characteristic of DGTA and DGTS. 3: absence of a m/z 669 corresponding to a neutral loss of 87 characteristic to DGTS (Armada et al., 2013)

A

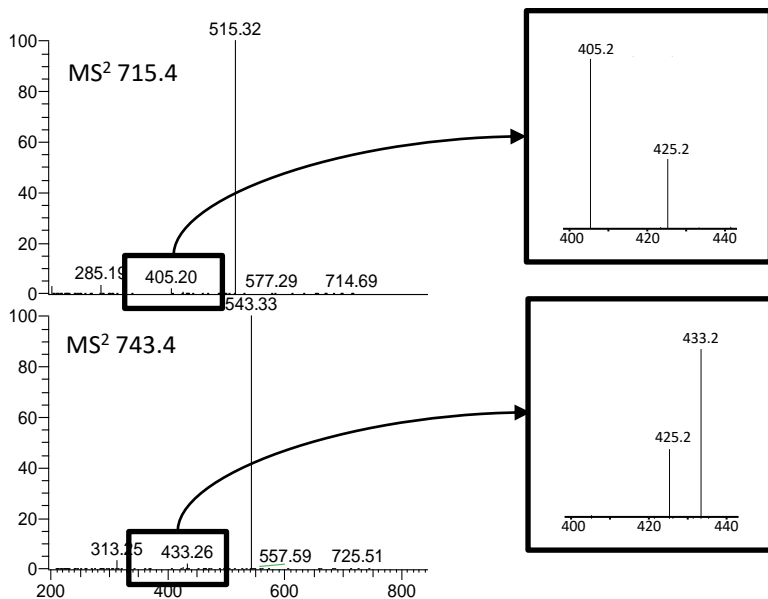
Phosphatidyl dimethylpropanethiol



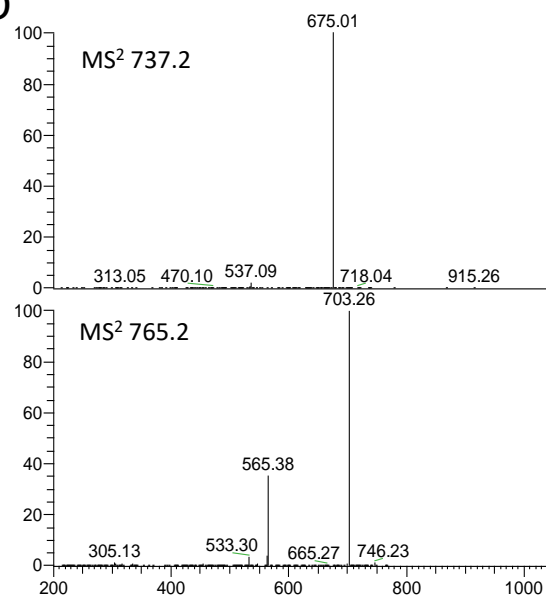
B



C



D

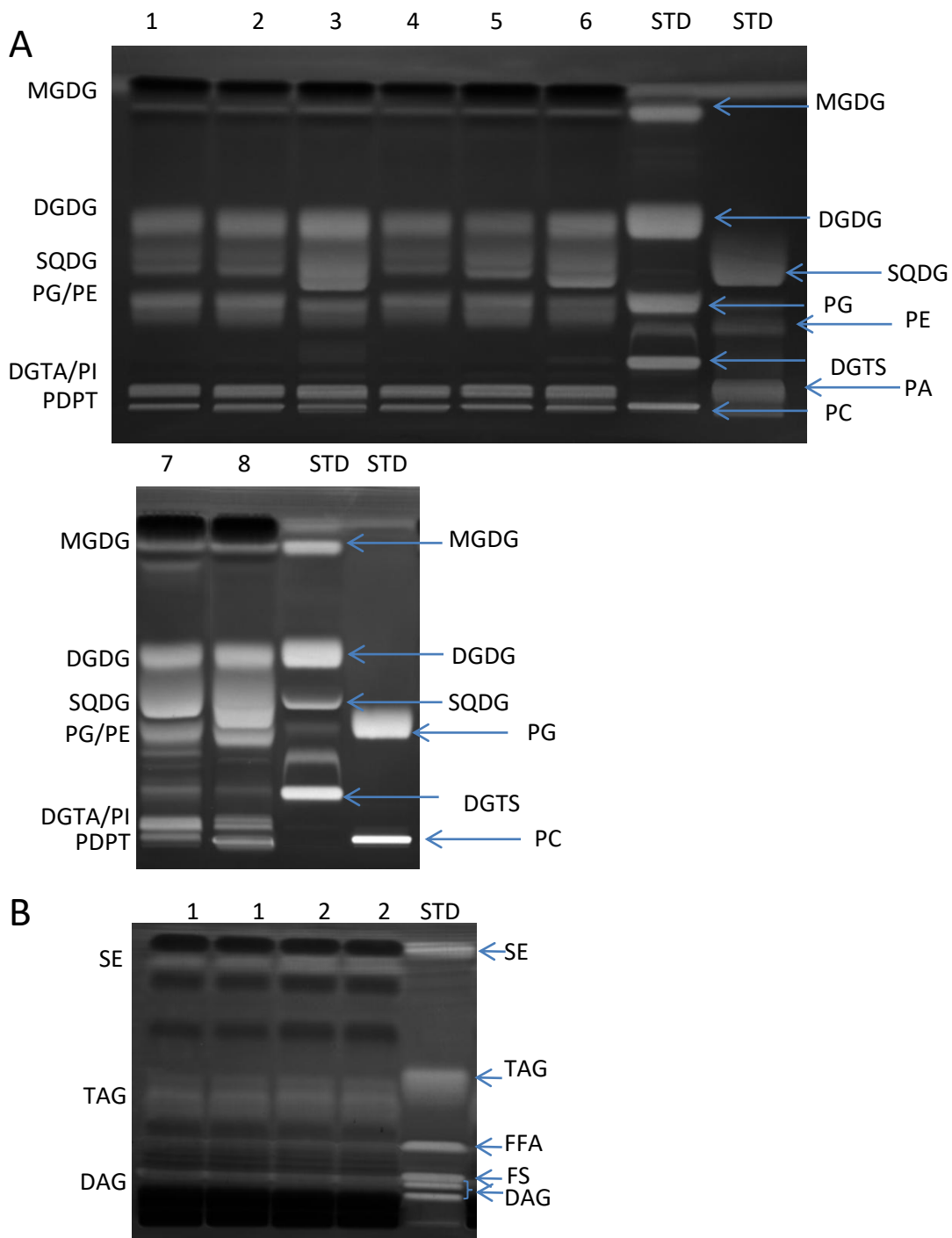
Supplemental figure 2. Identification of phosphatidyl dimethylpropanethiol in *O. tauri*

A. Structure of the sulfonolipid phosphatidyl dimethylpropanethiol

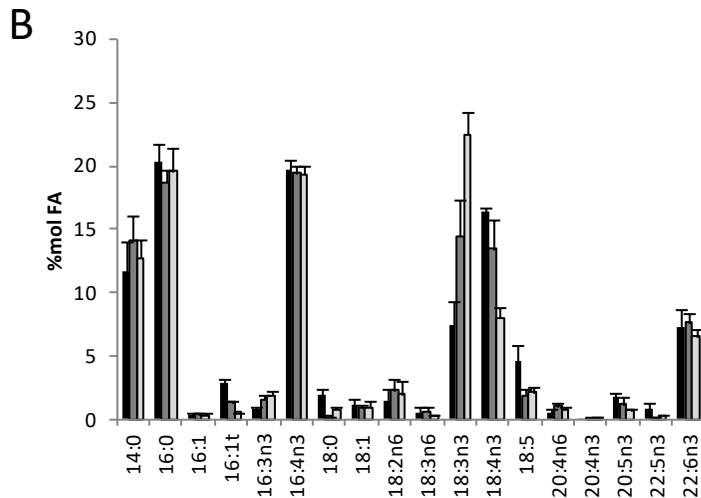
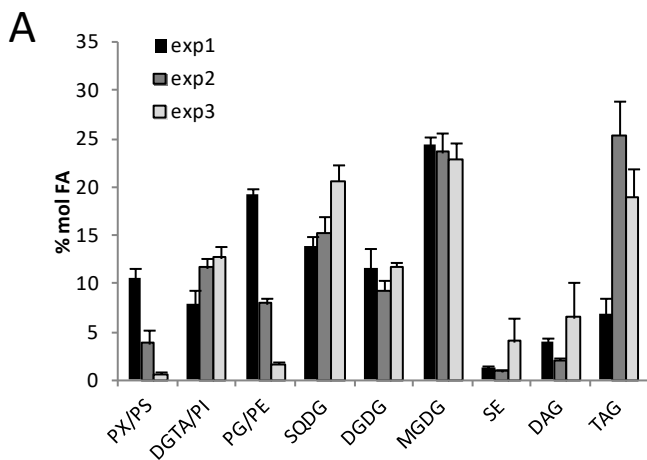
B- Fullscan analysis in positive and negative mode of the PX spot from Figure 3. Two adducts ([M+H]⁺ and [M+Na]⁺) are visible in positive mode. The [M+H]⁺ adducts 715.4 and 743.4 in negative mode give rise to 3 adducts [M-15], [M+44] and [M-63] corresponding to [M-CH₃]⁻ (respectively m/z 699.2 and 727.2), to [M-CH₃+CH₃COO]⁻ (respectively m/z 758.8 and 786.8) by analogy with PC and to [M-H-S(CH₃)₂]⁻ (respectively m/z 651.2 and 679.1).

C. MS² analysis of the [M+H]⁺ adducts 715.4 and 743.4. They both give rise to a neutral loss of 200 corresponding to the polar head of PDPT as described in Fulton et al., 2014. In the insert a zoom of the 400 m/z region show the fragments [M+H-S(CH₃)₂-RCOOH]⁺ showing that m/z 715 and 743 correspond to the molecule 14:0/16:4 and 16:0/16:4 respectively.

D. MS² analysis of the [M+Na]⁺ adducts 737.2 and 765.2. They both give rise to a neutral loss of 62 corresponding to the loss of S(CH₃)₂ probably the same way the sodium adduct of PC is losing N(CH₃)₃ (m/z 59). The isolated m/z 765.2 [M+Na]⁺ adduct is probably contaminated with an [M+H]⁺ adduct that will give the neutral loss of 200.

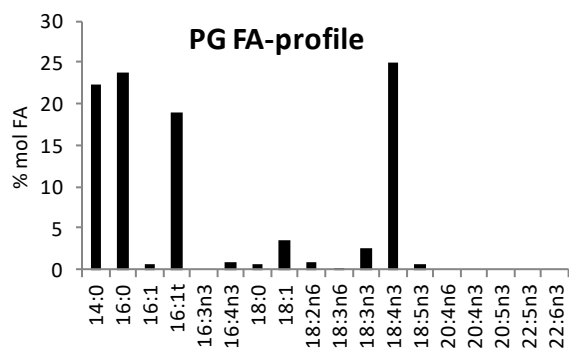
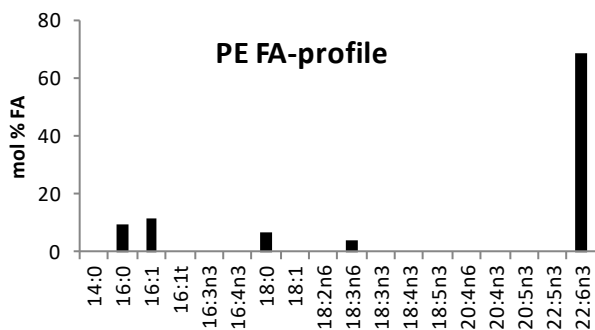
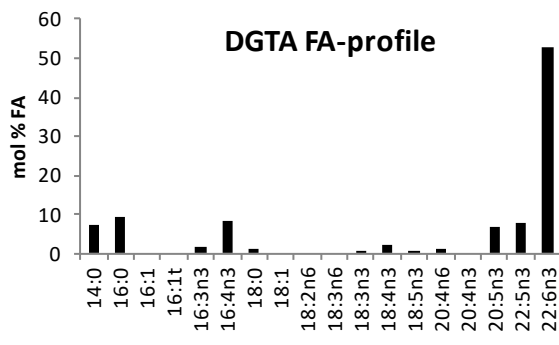
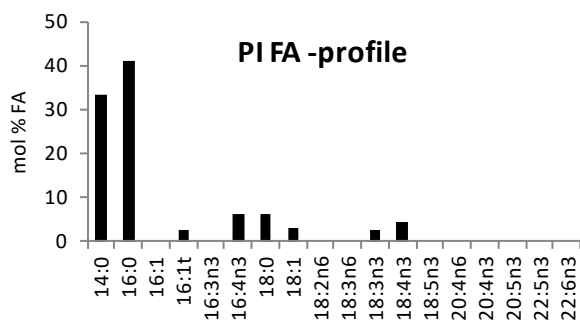
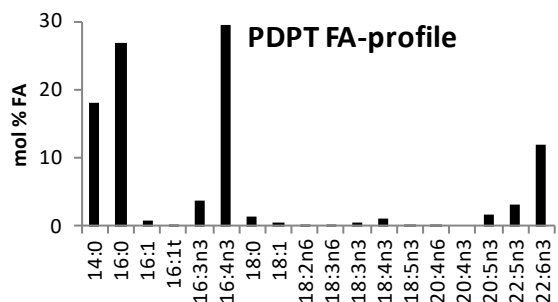
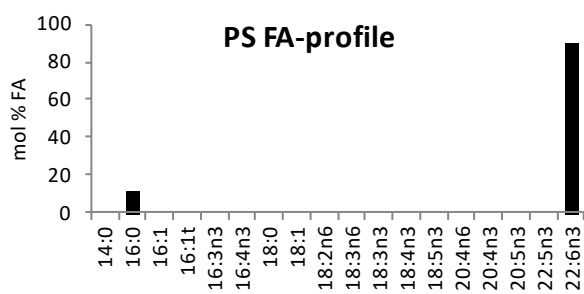


Supplemental figure 3. 1D-HPTLC developments of polar and neutral lipids of Mamiellales species. The polar solvent used was that described by Mock and Kroon (2002) and consisted in a mixture of methyl acetate/isopropanol/chloroform/methanol/KCl 0.25% (25:25:25:10:4 v/v/v/v). (A). Neutral lipids were separated in hexane/diethyl-ether/glacial-acetic-acid (60:10:1.22 v/v/v) (B). Lipids fraction deduced from standard migration (STD right from the figure) and MS-MS analysis are indicated on the left. Standard (STD) are indicated on the right. Top labels correspond to species: 1. *O. sp. RCC788*, 2. *O. mediterraneus*. 3. *O. lucimarinus RCC802*, 4. *O. sp. RCC808*, 5. *O. tauri*, 6. *O. lucimarinus RCC3401* 7. *Micromonas pusilla* 8. *Bathycoccus prasinos*

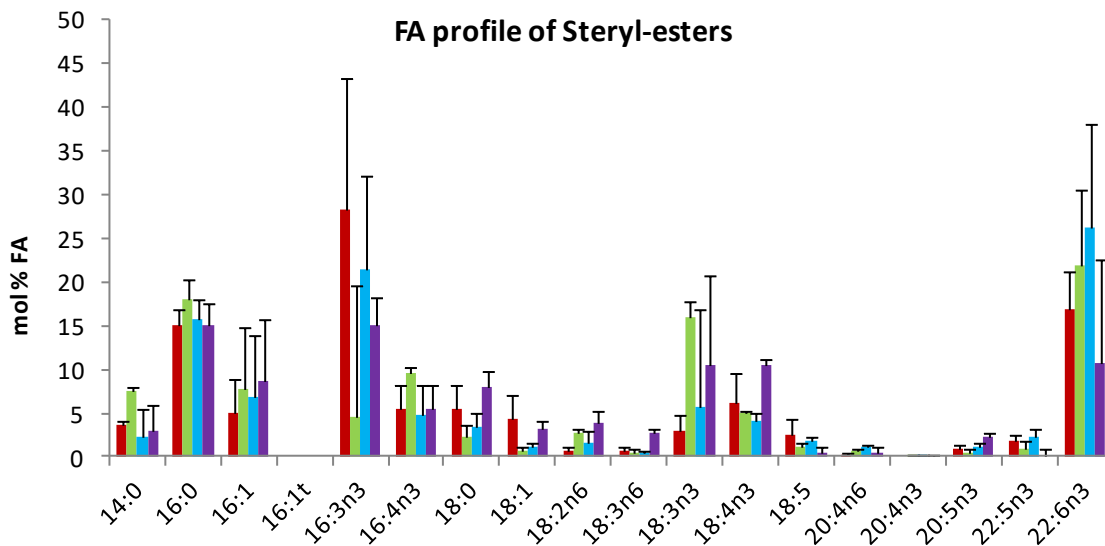


Supplemental figure 4. Variation of lipid- and FA- profiles in the genus *Ostreococcus* according to the experimental set.

The 4 different species of *Ostreococcus* have been averaged for each experiment. Error bars are SEM. Note that variations are reduced compared to the variations observed for a given species between the three experiments: differences were greater between experimental sets than between species. TAGs were accumulated in experiment 2 and 3 and phospholipids were decreased while non-phosphorus lipids were increased (SQDG, DGTA). ALA was increased at the expense of SDA in experiment 2 and 3. These changes were shown to be the result of phosphorus limitation in *O. tauri* (see below). It is therefore likely that the lots of natural sea water used as culture media basis in these experiments might have contained more or less phosphorus. Though not intended, the variations observed allowed further to deduce that the glycerolipidome from the distinct *Ostreococcus* clades varied in a similar way depending on the nutrient enrichment of the culture media.



Supplemental figure 5. FA composition of *O. tauri* phospholipids and DGTA. Phospholipids and DGTA were resolved by 2D-developments and analyzed by FAMES-GC-FID.

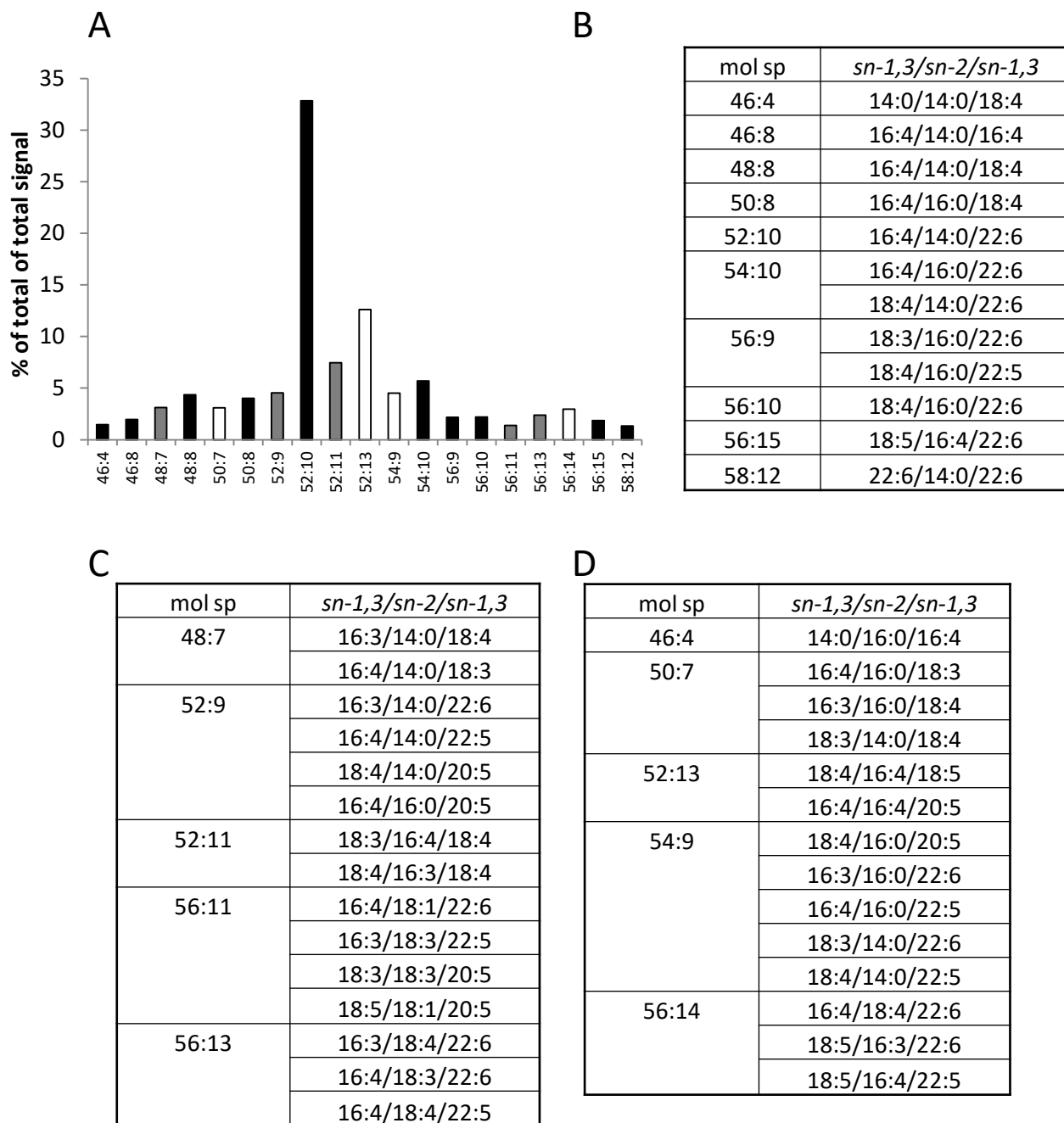


Supplemental figure 6. FA composition of steryls esters of *Ostreococcus* mediterranean species.

mol sp	sn-1/sn-2	PG	SQDG	MGDG	DGDG	PI	PS	PE	PDPT	DGTA
28:0	14:0/14:0	12	4		2	35				
28:1	14:0/14:1									1
30:0	14:0/16:0 - 16:0/14:0	9	13		4	54				
30:1	14:0/16:1 (S); 16:0/14:1 (B)		2							1
30:3	14:0-16:3								9	3
30:4	14:0/16:4								35	9
32:0	16:0/16:0				4	10			=	
32:1	16:1/16:0	4								
32:2	18:2/14:0					3				
32:3	18:3/14:0 (S,M,D) - 16:3/16:0 (S) 16:0/16:3 (T,B)		5	2		15			9	3
32:4	18:4/14:0 (S,D) - 16:4/16:0 (S) - 16:0/16:4 (P,T,B)		7	2		16			36	11
32:5	18:5/14:0 (D)		1	2		5				
32:6	na		4	1						
32:7	16:3/16:4				1					
32:8	16:4/16:4					2				
34:1	18:1-16:0 (P)	6	1							
34:2	18:2/16:0 (S)	4	5			3				
34:3	18:3/16:0	9	29			12				
34:4	18:4/16:0 (P, S, M,D)- 16:0/18:4 ;14:0/20:4; 18:0-16:4 (B)	25	32	2		5				2
34:5	18:4/16:1 (P) ; 14:0-20:5 (B)	32	1	3						1
34:6	18:3-16:3 ; 18:2-16:4				5					
34:7	18:3/16:4 (M, D) ; 18:4/16:3 (D)				26	11				
34:8	18:4/16:4				40	12				
34:9	18:5/16:4				16	8				
36:5	14:0/22:5									3
36:6	14:0/22:6								5	6
36:7	22:6/14:1									1
36:8	20:4/16:4									2
36:9	20:5/16:4									2
38:5	16:0/22:5									2
38:6	16:0/22:6								6	5
38:9	22:6/16:3, 22:5/16:4, 20:5/18:4									3
38:10	22:6/16:4									4
40:9	18:3/22:6									2
40:10	20:5-20:5 ; 18:4/22:6									2
42:10	22:6/20:4 ; 22:5/20:5									2
42:11	22:6/20:5									3
44:11	22:5/22:6									8
44:12	22:6/22:6						100	100		26

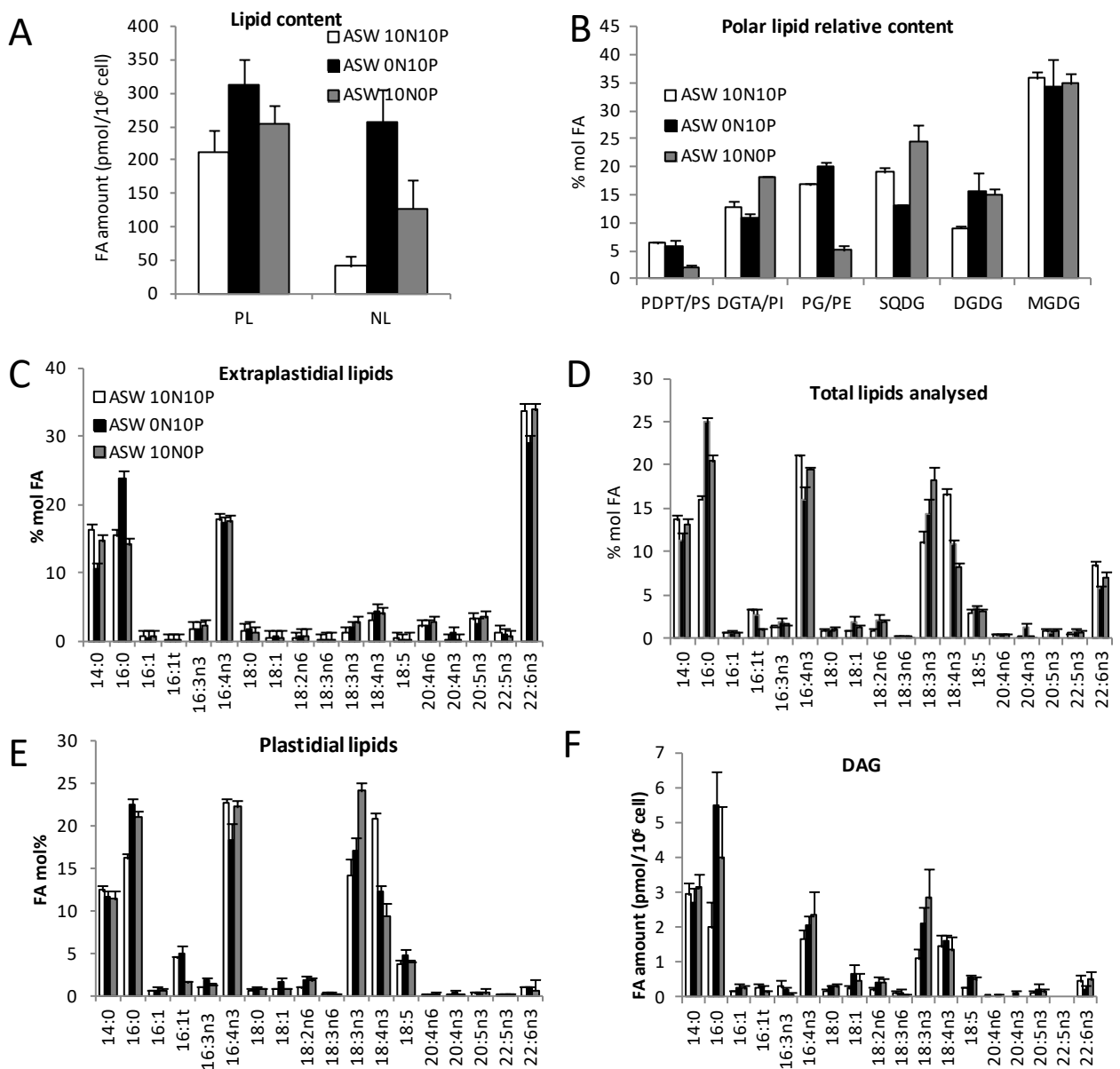
Supplemental figure 7. Positional analysis of FA in polar glycerolipids.

Molecular species (mol sp) and the corresponding *sn-1/sn-2* combinations are shown in column 1 and 2. The letters in brackets refers to the lipid class in which the FA combination was detected. (P: PG S: SQDG, D:DGDG, M: MGDG, B: DGTA T: PDPT). The percentage of the total signal for each lipid class analyzed is indicated and corresponding bars are scaled according to the highest percentage detected in each lipid class. na: not analyzed.

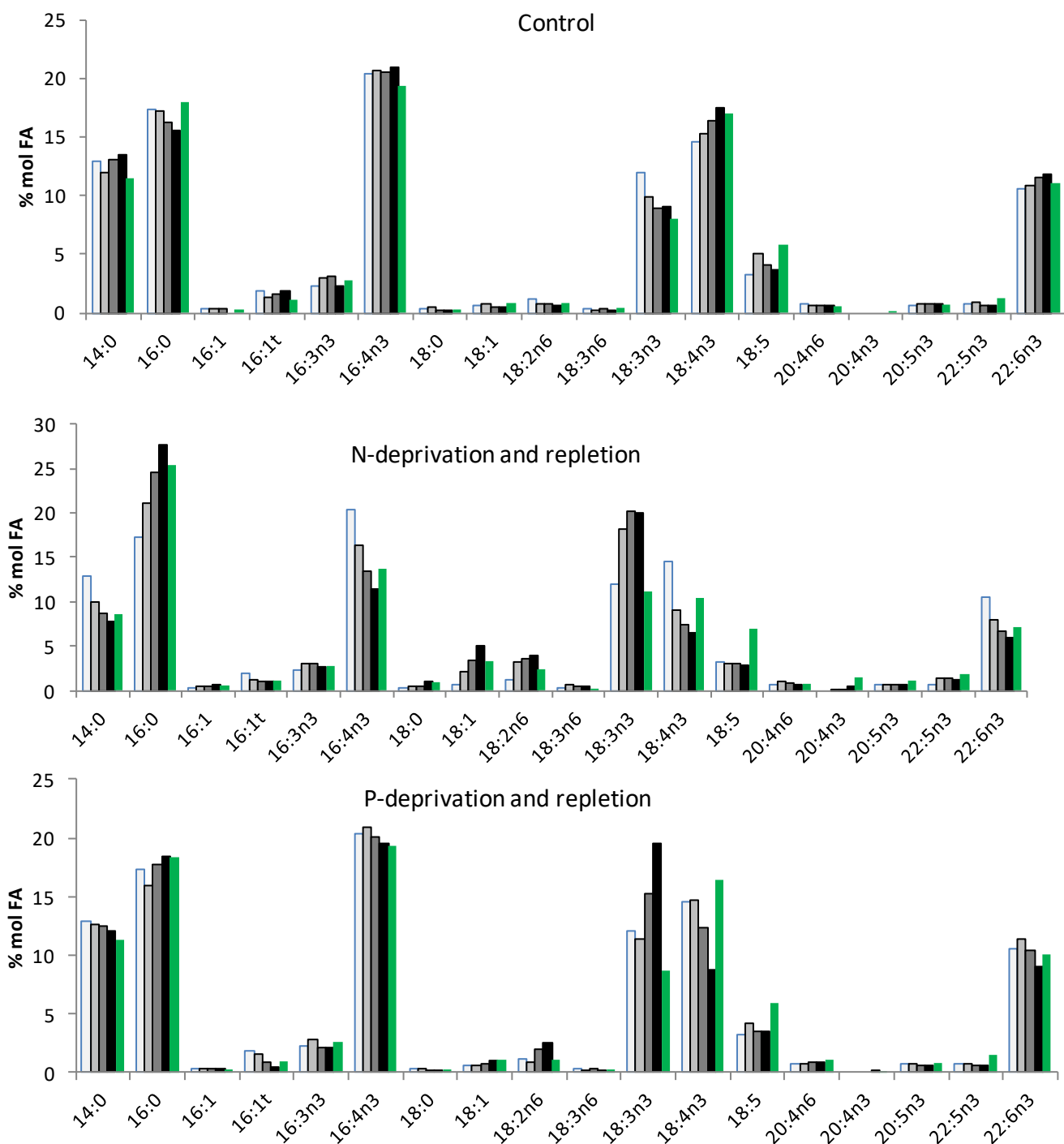


Supplemental figure 8. FA positional analysis in TAGs.

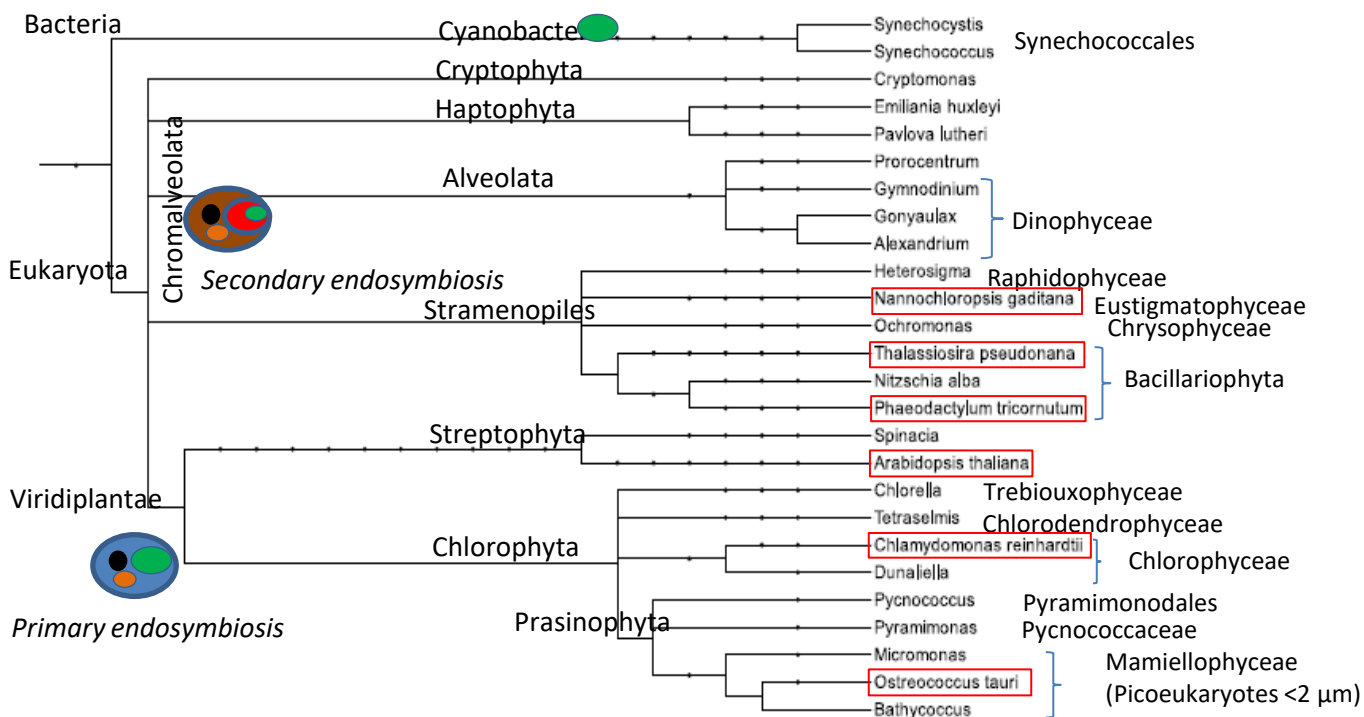
A. Relative abundance of detected molecular species (mol sp) indicated in absciss expressed as percentage of the total signal from analyzed peaks. Colour of the bars reflect the degree of confidence in the corresponding FA-positional analysis : black correspond to certainty, grey to likely position that would require MS³ to be ascertained; white correspond to mix of molecular species whose FA-position could not be determined. (B-C) FA-positional analysis of TAGs shown in (A). B. TAGs Molecular species for which the FA-position is determined. C. TAGs species for which the FA-position is the most likely but would require MS³ nalysis to be ascertained. D. TAGs molecular species of undetermined FA position.



Supplemental figure 9. Effect of N and P deprivation on lipid and FA-profiles of various lipid pools. Cells were starved for three days. Means of three independent experiments are shown. Bars are SEM. A. Cellular amounts of polar and neutral lipids. B. Content of structural glycerolipids relative to the total of FA in polar lipids. A to E. Relative FA composition variations in various lipid pools upon N and P deprivation. PDPT/PS, DGTA/PI were assigned to the pool of non plastidial lipids in (A), while PG, SQDG, MGDG, DGDG were assigned to the pool of plastidial lipids in (B). F. FA amounts in DAGs.



Supplemental figure 10. FA composition changes upon a kinetics of nutrient depletion and repletion. Global FA profile of control cells, N deprived cells and P deprived cells are shown at the start of the experiment (white bars) , 1 day (light grey bars), 2 days (grey bars) 3 days (black bars) after depletion and 17hrs after medium repletion (green bars). Repletion was performed adding 10N and 10 P to N and P starved culture respectively, and adding 10N 10P to control cultures.



Supplemental figure 11. Phylogenetic Tree representing of chosen photosynthetic organisms. The tree has been designed by PyloT (<http://phylot.biobyte.de/>) (Letunic and Bork 2016). Super-group, division, and when relevant, class are indicated. Genus /species represented correspond to organisms that were informative with respect to lipid and/or FA composition for the present work. Red boxes indicates the availability of a complete molecular tool-box. Primary and secondary endosymbiotic events are schematized : the engulfment of cyanobacteria by an ancestral non photosynthetic eukaryote (black nucleus, orange mitochondria) gave rise primary chloroplast (two membranes); the engulfment of photosynthetic eukaryote, a red microalga in the case of chromalveolates, gave rise to secondary plast which display additional membranes.

2 Quelle(s) origine(s) pour les TAG générés en carence azote chez *O. tauri* ?

En conditions normales de croissance, les microalgues sont très efficaces dans l'utilisation de l'énergie solaire pour la production de composés biochimiques tels que l'amidon, la cellulose ou d'autres carbohydrates (John et al., 2011; Jones and Mayfield, 2012). Quand elles sont placées dans des conditions de stress, certaines microalgues produisent de l'amidon comme produit de stockage de carbone et d'énergie (Brányiková et al., 2011; Dragone et al., 2011). Chez d'autres microalgues appelées oléagineuses, cette fonction est assurée par la production de grandes quantités de lipides neutres typiquement sous la forme de TAG, qui s'accompagne de changements de composition en FA dans les lipides (Chisti, 2007; Hu et al., 2008). Les microalgues oléagineuses ne produisent que peu de TAG durant les conditions de croissance ou environnementales optimales, sous lesquelles les lipides membranaires polaires sont souvent majoritaires (Hu et al., 2008). Les stress peuvent être de nature chimique ou non-chimique ; les stress chimiques majoritaires dans l'accumulation des TAG sont les limitations en nutriments tandis que les stress non-chimiques principaux sont les variations de température et d'intensité lumineuse. La phase de croissance et l'âge de la culture affectent également le contenu en TAG et la composition en acides gras, sans doute parce que les nutriments deviennent limitants et que les toxines s'accumulent lorsque les cultures entrent en phase stationnaire (pour revue, Du and Benning, 2016). Une hypothèse classique est que la synthèse de TAG *de novo* sert à dissiper les électrons en excès de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons, afin de contrecarrer autant que possible la sur-réduction qui peut conduire à la formation de dangereux dérivés réactifs d'oxygène (ROS pour 'reactive oxygen species') préjudiciables à la photosynthèse (Hu et al., 2008). Une autre explication possible sur rôle de l'accumulation des TAG est le stockage transitoire et sécurisé de chaînes acyles, pour une resynthèse future des membranes lorsque les conditions le permettent. En effet, au-delà du rôle des TAG en tant que réserve énergétique (dégradation des chaînes acyles par la β -oxydation), les TAG sont de plus en plus reconnus comme de véritable plateforme pour le renouvellement des lipides structuraux (Zienkiewicz et al., 2016). La carence en azote est la condition la plus fréquemment étudiée pour l'accumulation des TAG chez les différentes algues (Hu et al., 2008). Les microalgues, incluant les algues vertes et les diatomées, accumulent 20 à 50% de TAG en déficience en azote (Hu et al., 2008). Dans ces conditions, les FA incorporés dans les TAG sont majoritairement saturés provenant de la synthèse *de novo* et n'impliquant pas de processus de modification des acides gras (Kumari et al., 2013). Néanmoins, la compréhension des modifications du métabolisme des lipides et FA et du rôle des TAG lors de carences nutritives reste largement à préciser chez les microalgues.

Nos résultats montrent que les carences nutritives chez *O. tauri* provoquent une inhibition importante de la désaturation des espèces lipidiques chloroplastiques 18:3 *n*-3. Cette modification en FA est

concomitante à un remodelage des glycérolipides se traduisant notamment par une accumulation de TAG. La caractérisation des voies de biosynthèse des TAG mérite une attention particulière car : (i) les TAG sont suspectés d'être une plateforme de régulation des chaînes acyles des lipides structuraux et par conséquent leur rôle pour le remodelage des chaînes acyles des lipides doit être pris en compte dans les réponses physiologiques (Fan et al., 2011; Li et al., 2012; Yoon et al., 2012); (ii) l'incorporation de FA insaturés dans les TAG au cours de carence en macronutriments, notamment en nitrate, est rare chez les microalgues. En complément de ces analyses et toujours avec l'objectif de mieux comprendre la dynamique de transfert entre lipides structuraux et TAG, nous avons réalisé des expériences préliminaires en marquage radioactif ainsi que l'analyse de l'expression de gènes candidats intervenant (dans d'autres microalgues) dans la synthèse des TAG. Cette analyse transcriptionnelle a été réalisée sur les mêmes échantillons analysés en HPLC-MS pour leur composition lipidique. Enfin, sur la base de l'analyse positionnelle des chaînes acyles des lipides structuraux et des TAG, nous discutons des mécanismes possiblement impliqués dans le modelage acyle des glycérolipides.

2.1 La carence azote provoque rapidement et efficacement l'accumulation des TAG par rapport à d'autres stress

Le scénario physiologique de la carence en azote (N) est reconnu comme le plus efficace pour l'accumulation de TAG chez les microalgues (Hu et al., 2008) notamment chez *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011), *P. tricornutum* (Abida et al., 2015; Popko et al., 2016), et *N. gaditana* (Simionato et al., 2013). Nous avons montré que c'est également le cas chez *O. tauri*; en comparaison la carence en phosphate provoque une accumulation moindre de TAG (Degraeve-Guilbault et al., 2017; Sato et al., 2014). Etant donné que la carence azotée est associée à une inhibition de la division plus importante, nous avons voulu appréhender l'impact de l'arrêt de la division seul ou celui d'un stress sans effet sur la division, sur l'accumulation de TAG. Pour ce faire nous avons utilisé l'hydroxyurée (HU, inhibiteur de la ribonucléotide réductase) d'une part, connue pour activer le point de contrôle de réplication de l'ADN chez *O. tauri* (Corellou, 2005), et le refroidissement des cultures à 14°C d'autre part, que nous avons déterminé comme permettant une croissance normale pendant laquelle les cellules acclimatées à basse température contiennent 3 à 5 fois de TAG que les cultures contrôle (voir partie 2).

Les cellules cultivées à 24°C en ASW jusqu'à une densité de 38.10^6 cellules.mL⁻¹ (phase exponentielle) ont été séparées en 4 cultures de 200 mL et soumises aux différents traitements : la carence N, le traitement par l'HU (1mM), le passage à 14°C. Ces traitements ont été appliqués 30 heures ; ce temps court a été choisi en fonction de la carence N dont nous savons qu'elle provoque rapidement une accumulation de TAG et pour éviter que les cellules ne soient en phase stationnaire (ce qui aurait été le cas au bout d'un traitement de 3 jours utilisé dans notre article). Le taux de division au moment de la récolte était de 40% pour le contrôle, 5% pour la carence N, 0% pour l'HU, et 30% pour les cellules

refroidies. Le contrôle était donc en fin de phase exponentielle, ce qui était souhaité dans le but d'avoir une quantité suffisante de TAG pour en analyser le profil acyle. Dans ces conditions ni l'HU qui bloque efficacement le cycle de division, ni le refroidissement qui ne bloque pas la division, ne provoquent d'accumulation de TAG qui semble significative (respectivement 1,1 et 1,4 par rapport au le contrôle) bien que le refroidissement semble ici plus efficace (Fig. 34A). Au contraire la carence N provoque une accumulation de TAG (multiplié par 5) avec un changement de profil acyle caractéristique (Fig. 34A et B). On notera que l'augmentation du DGDG (qui est dans cette expérience contre balancée par une baisse de la quantité relative de MGDG) est un phénomène précoce lors de la carence N (Fig. 34C). Les profils FA de l'HU et du contrôle sont similaires alors qu'une nette augmentation du 18:5 et du DHA est observée dans les cellules refroidies après 30h (Fig. 34D). Ces changements au cours du refroidissement seront plus amplement discutés en deuxième partie du manuscrit. Enfin, alors que le profil acyle des TAG subit un remaniement caractéristique en carence N, il reste assez similaire au contrôle dans les autres conditions (abstraction faite d'un signal anormal sur le 20:4n-3 et d'une baisse de 16:4n-3) (Fig. 34B).

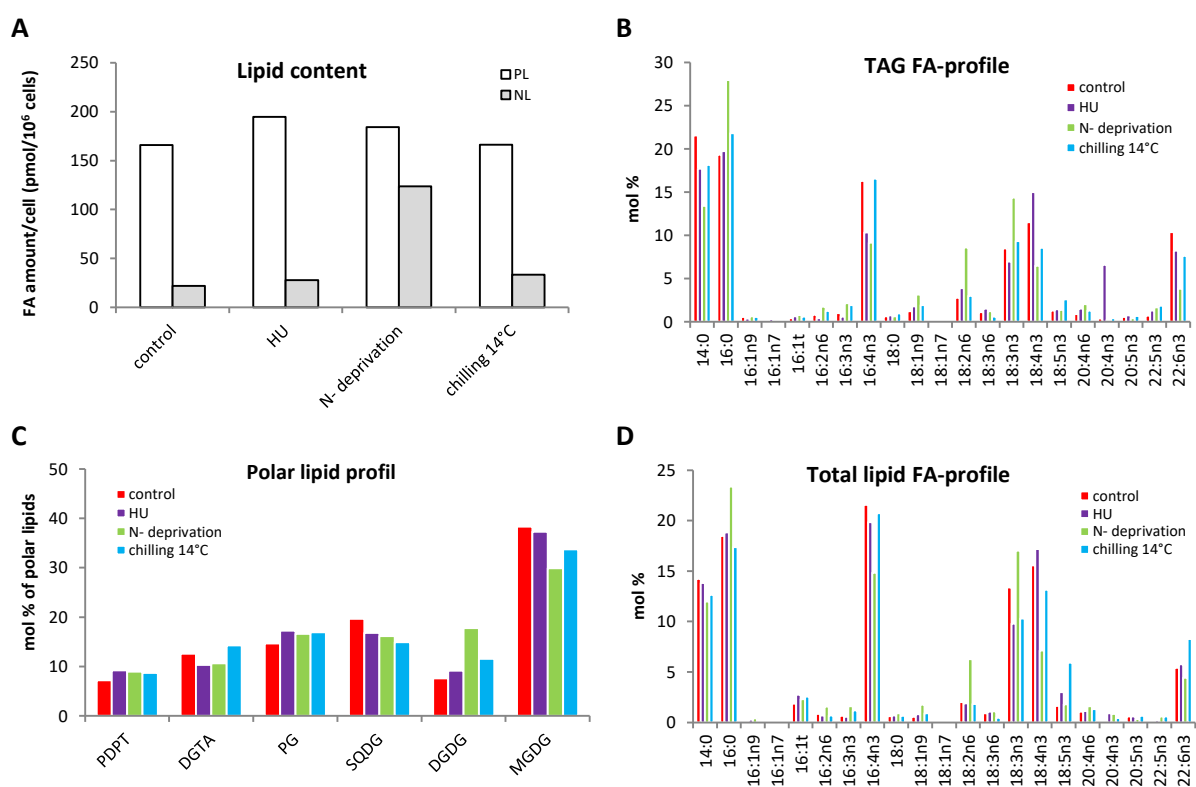


Figure 34 : Comparaison de l'effet de différents scénarios pour augmenter le contenu en TAG chez *O. tauri*.

A, Quantité de lipides : polaires (PL) et neutres (NL). **B**, Profil en acides gras des TAG. **C**, Pourcentage des lipides polaires. **D**, Profils en acides gras des glycérolipides totaux.

Les cellules ont été récoltées après 30 heures de traitement, et après séparation sur HP-TLC, leur contenu a été analysé en GC-FID. (n=1)

2.2 Analyse positionnelle et quantification des espèces de TAG synthétisés en carence azote

2.2.1 Caractérisation des espèces de TAG

Dans le but d'obtenir des indices plus précis sur l'origine des TAG, notamment en carence N, des analyses complémentaires ESI-MS/MS sur les molécules de TAG accumulées en carence azote ont été réalisées. Nous espérons pouvoir préciser l'analyse positionnelle initiale en effectuant de la MS³ sur les espèces de TAG. En effet, chez *O. tauri* la diversité combinatoire importante des espèces de TAG et l'impossibilité d'effectuer une analyse positionnelle *sn-1/sn-2* des DAG, en raison de la contamination pigmentaire des DAG séparés par HP-TLC (bruit de fond trop important), complexifient l'étude des mécanismes de génération de TAG. L'origine des DAG servant à la construction des TAG et l'identification des chaînes acyles en positions *sn-3* ne peuvent donc être déduites qu'à partir de l'analyse positionnelle des espèces moléculaires des glycérolipides, par détermination du FA en *sn-2* réalisée par analyse ESI-MS/MS. L'analyse MS³ n'a malheureusement pas permis d'en savoir plus, le fractionnement supplémentaire des molécules entraînant une dégradation de celles-ci. L'analyse HPLC-MS permet, quant à elle, une quantification relative des combinaisons (m/z) par rapport à des standards pour chaque classe de lipide. Cette quantification a été effectuée sur les glycérolipides structuraux et les TAG de cultures carencées en azote et de cultures entrant en phase stationnaire. Nous espérons que la dynamique de changement des espèces moléculaires dans chacune des classes de lipides nous renseigne sur la dynamique d'un transfert des lipides structuraux vers les TAG. J'ai donc apporté un soin tout particulier à la seconde analyse. Cette analyse est qualitativement plus précise en ce qui concerne les TAG et elle apporte des éléments quantitatifs nouveaux sur la variation des espèces au sein de chaque classe de lipide.

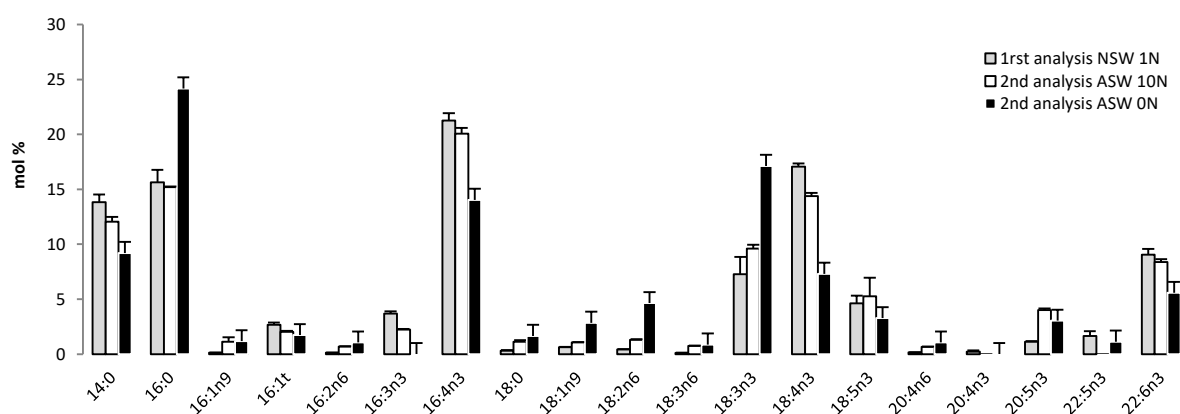


Figure 35 : Profil des FA totaux des échantillons qui ont servi à la détermination des espèces moléculaires des TAG. La première analyse est réalisée en eau de mer naturelle (NSW). La seconde est réalisée en eau de mer artificielle (ASW) supplémentée en azote (10N) ou non (0N). Les profils ont été obtenus lors du dosage des extraits lipidiques en GC-FID après méthanolyse (n=3).

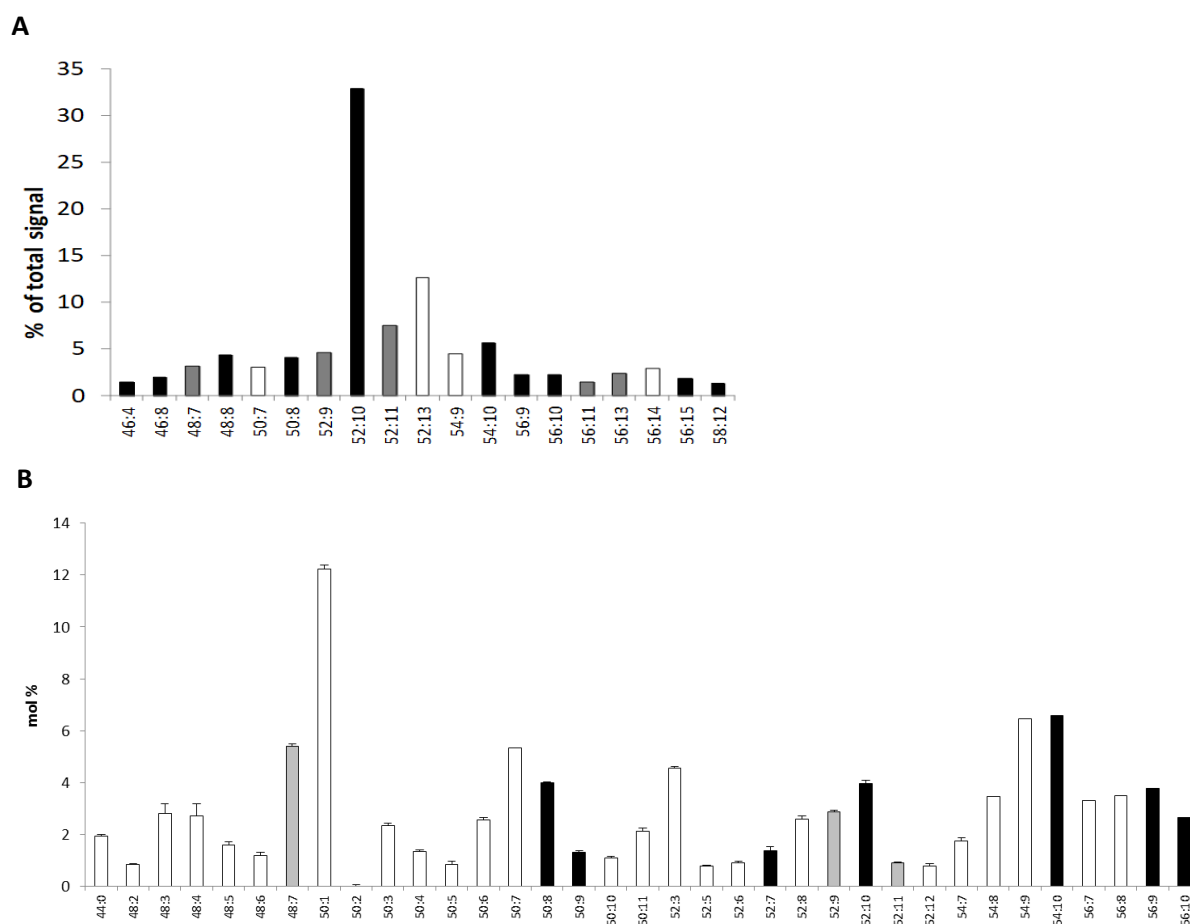


Figure 36 : Quantification relative des espèces de TAG.

A, Culture en eau de mer naturelle (figure supplémentaire 8A dans Degraeve-Guilbault et al., (2017)). Le pourcentage de chaque espèce moléculaire est donné par rapport à l'intensité du signal obtenu en spectrométrie de masse à ionisation par électrospray. Les couleurs correspondent au degré de certitude de la combinaison : position certaine (noir), position probable que nous pensions pouvoir préciser en MS3 (gris), non déterminée (blanc). **B**, Culture en eau de mer artificielle supplémentée en azote et phosphate (ASW 10N10P). le pourcentage molaire de chaque espèce est donné par analyse en HPLC-MS. Les couleurs de combinaisons présentes dans la première analyse ont été reportées et incrémentées. Les combinaisons sont données dans l'annexe 4.

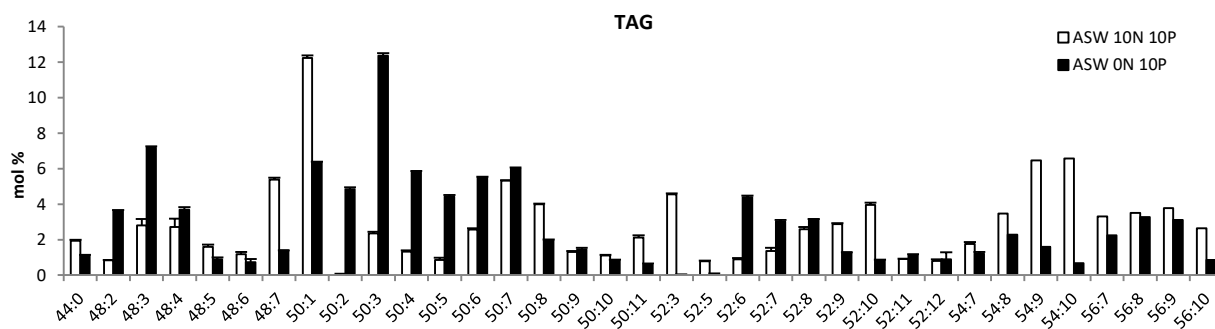
Les profils FA des échantillons qui ont servi à la première et la deuxième analyses sont indiqués figure 35. Indépendamment de l'origine de l'eau de mer, les contrôles de la première (NSW) et de la seconde analyse (ASW) présentent le même profil en FA totaux. L'échantillon carencé (ASW 0N) présente bien les caractéristiques décrites dans Degraeve-Guilbault et al., (2017) soit l'inversion du ratio 18:3/18:4 qui reflète probablement l'inhibition d'une activité $\Delta 6$ désaturase, ainsi qu'une augmentation de la saturation des C16 via la diminution du 16:4 et l'augmentation du 16:0. Pour rappel, les premières analyses de quantification relative des TAG publiées ont été réalisées en ESI-MS/MS après migration en HPLC ; les espèces moléculaires majoritaires de TAG publiées sont présentées figure 36A. Lors de la seconde analyse, les espèces majoritaires de TAG présentes et préalablement vérifiées par analyse ESI-MS/MS ont été ajoutées, si nécessaire, au répertoire des TAG à quantifier par HPLC-MS (fig. 36B, annexe 4). La quantification des espèces moléculaires des glycérolipides, (lipides structuraux inclus), a été réalisée

en triplicats pour chaque condition. Les espèces inférieures à 1.5% (m/z) ne sont pas montrées, mais la liste de la totalité des espèces moléculaires de TAG identifiées en ESI-MS/MS figure en annexe 4.

Lors de la deuxième analyse toutes les espèces combinatoires identifiées précédemment sont présentes sauf deux espèces minoritaires 46:4 et 46:8 (Fig. 36 et annexe 4); le nombre d'espèces moléculaires de TAG détectées par ESI-MS est beaucoup plus important (35 supérieures à 1.5%) que lors de la première analyse (19) ; le nombre de combinaisons possibles correspondant à une même espèce moléculaire (m/z) contenant des FA similaires était trop important pour déterminer une analyse positionnelle sur bon nombre d'espèces, (ce qui était notre objectif initial). Les espèces quantifiées en HPLC-MS portent un code couleur associé au degré de confiance accordé en combinant les 2 analyses positionnelles effectuées figures 36.

L'espèce majoritaire, identifiée par quantification HPLC-MS, est 50:1 (16:0/16:0/18:1) et non 52:10 (16:4/14:0/22:6), espèce qui prédominait largement dans l'analyse ESI-MS/MS précédente (plus de 30%) ; Parmi les sept espèces majoritaires suivantes, qui représente chacune 4 à 6% des espèces analysées, on retrouve l'espèce 52:10 ainsi que les espèces 54:9 et 54:10 (contenant du DHA ou DPA) et 48:7 (14:0/16:X/18:X où x= 3 ou 4) et deux espèces non identifiées dans la première analyse (50:7 et 52:3). Les espèces qui contiennent un VLC-PUFA (52:9 et plus sauf 52:11, 52:12 et en partie 54:10) notamment le 56:X sont très diversifiées et représentent un pourcentage plus élevé que dans l'analyse publiée. Enfin, il existe aussi bien des espèces tri-saturées (44:0) que des espèces tri-insaturées dont des tri-VLC-PUFA (66:18, voir annexe 4).

Dans cette seconde étude, l'analyse positionnelle des FA des TAG (Fig. 37) suggère que bon nombre de DAG précurseurs de TAG pourrait être d'origine plastidiale. En effet, les espèces di-saturées (48:2, 48:3) et mono-insaturées (50:8, 50:9, 52:7, 54:10), présentent de manière certaine un FA saturé (14:0 ou 16:0) en *sn*-2 ce qui est une spécificité positionnelle retrouvée chez des lipides plastidiaux (Degraeve-Guilbault et al., 2017 et voir Fig. 38, Résultats-discussion §2.2.3). De plus, on observe de manière générale un grand nombre combinaisons retrouvées dans des espèces abondantes de lipides plastidiaux (18:3/14:0, 18:4/14:0, 18:3/16:0 14/16:0 18:4/16:4 18:5/16:4), ainsi que les combinaisons originales des espèces 50:9 et 50:10 qui comportent une association de 16:4/16:3 et 16:4/16:4 correspondant à des espèces minoritaires de MGDG. Ces observations laissent supposer une origine plastidiale du squelette glycérol servant à la synthèse des TAG. Enfin, le fait que les VLC-PUFA soient situés à l'extrémité des molécules dont la position centrale est pour majorité (en nombre d'espèce et en quantité) occupée par un FA saturé (52:10, 54:10, 56:9, 56:10) suggère que ces espèces sont issues du transfert de VLC-PUFA par des DGAT sur des squelettes glycérol d'origine plastidiale.



mol sp combinaison FA (position sn-1/sn-2/sn-3 possibles)

44:0 14:0/14:0/16:0

48:2 18:2/14:0/16:0

48:3 18:3/14:0/16:0

48:4 16:0/16:0/16:4 - 14:0/16:0/18:4

48:5 14:0/16:4/18:1 - 14:0/16:0/18:5

48:6 18:2/14:0/16:4

48:7 18:4/14:0/16:3 - 18:3/14:0/16:4

50:1 16:0/16:0/18:1

50:2 16:0/16:0/18:2

50:3 16:0/16:0/18:3

50:4 16:0/16:0/18:4 - 16:1/16:0/18:3 - 18:1/14:0/18:3 - 14:0/14:0/20:4

50:5 16:4/16:0/18:1 - 14:0/18:2/18:3

50:6 16:4/16:0/18:2 - 16:3/16:0/18:3

50:7 16:4/16:0/18:3 - 16:3/16:0/18:4 - 18:3/14:0/18:4

50:8 18:4/16:0/16:4

50:9 16:4/16:0/18:5

50:10 16:4/16:3/18:3

50:11 16:4/16:4/18:3

52:3 18:1/16:0/18:2

52:5 18:2/16:0/18:3

52:6 18:3/16:0/18:3

52:7 18:3/16:0/18:4

52:8 18:4/16:0/18:4 - 18:1/16:4/18:3 - 18:2/16:4/18:2 - 18:3/16:0/18:5

52:9 16:3/14:0/22:6 - 16:4/14:0/22:5 - 18:4/14:0/20:5 - 16:4/16:0/20:5

52:10 16:4/14:0/22:6

52:11 18:3/16:4/18:4 - 18:4/16:3/18:4

52:12 18:4/16:4/18:4 - 18:3/16:4/18:5

54:7 18:2/14:0/22:5 - 18:1/14:0/22:6 - 18:1/18:2/18:4 - 18:2/18:2/18:3 - 18:1/18:3/18:3 - 18:1/18:1/18:5

54:8 18:2/14:0/22:6 - 18:3/14:0/22:5 - 18:4/16:0/20:4 - 18:3/16:0/20:5 - 18:2/18:4/18:2 - 18:2/18:3/18:3

54:9 18:4/16:0/20:5 - 16:4/16:0/22:5 - 18:3/14:0/22:6 - 18:4/14:0/22:5 - 18:3/18:3/18:3 - 20:4/20:5/14:0

54:10 16:4/16:0/22:6 - 18:4/14:0/22:6 - 16:4/18:2/20:4 - 18:3/18:4/18:3 - 18:4/18:4/18:2

56:7 18:1/16:0/22:6 - 18:2/16:0/22:5

56:8 18:2/16:0/22:6 - 18:3/16:0/22:5

56:9 18:3/16:0/22:6 - 18:4/16:0/22:5

56:10 18:4/16:0/22:6

Figure 37 : Analyse positionnelle comparative des TAG en carence azotée.

Les espèces moléculaires (mol sp) écrites en gras sont celles déjà identifiées dans la première analyse. Les combinaisons en gras sont celles dont le positionnement est certain. Le soulignement indique une certitude de positionnement acquis lors de la seconde analyse. Les espèces augmentées en carence (ASW 0N) par rapport au contrôle (ASW 10N) sont indiquées en vert, celles qui diminuent en rouge. Pour faciliter le suivi de l'analyse dans le texte principal les VLC-PUFA sont surlignés en bleu, le 18:5 en vert, et le 16:4 en jaune.

Nous observons néanmoins, des espèces tri-insaturées composés de combinaisons de FA C18 et ne comportant ni un 16:4 ni un 18:5 (FA majoritaire plastidiaux), qui sont détectées dans les TAG 54:7, 54:9 et 54:10. Ces espèces sont très vraisemblablement issues de précurseurs de DAG synthétisés dans le RE, tout comme les espèces minoritaires di-VLC-PUFA (62:14, 62:15, 62:16, 66:8) non quantifiées mais détectées en ESI-MS/MS. Les espèces qui présentent un 18:X central en association avec un VLC-PUFA à une des extrémités et à 16:4 à l'autre extrémité (56:13, 56:14) seraient également d'origine microsomale avec pour précurseur des DAG 18:X/20:X plutôt que 16:4/18:X puisque, dans les lipides structuraux, le 16:4 n'est jamais retrouvé en *sn*-1, excepté dans le SQDG où il n'est cependant pas associé à un 18:X. Le transfert du 16:4 absent dans le pool d'acyl-CoA s'effectuerait alors probablement par trans-estérification directe entre lipides et DAG. En ce qui concerne, les espèces di-VLC-PUFA comportant un C18:X, elles pourraient provenir soit de squelettes glycérol de type 18:X/VLC-PUFA ou VLC-PUFA/VLC-PUFA. Ces combinaisons sont trouvées uniquement chez le DGTA. L'ajout d'un VLC-PUFA en *sn*-3 comme c'est obligatoirement le cas chez le TAG 66:8 (22:6/22:6/22:6) peut se faire à partir du DHA provenant du PDPT ou du DGTA par trans-estérification directe entre lipide et DAG ou *via* le pool d'acyl-CoA.

En résumé, si l'on ne prend en compte que les spécificités des acyltransférases intervenant dans la synthèse des lipides structuraux et responsables de la signature positionnelle distinctif des lipides du RE et les lipides du chloroplaste, la synthèse des TAG ferait intervenir principalement des DAG (ou moitié glycérol de glycérolipides) d'origine plastidiale et dans une moindre mesure des DAG d'origine endosomale. Les caractéristiques des combinaisons de TAG typiques d'*Ostreococcus* et décrites dans Degraeve-Guilbault et al., (2017) sont retrouvées dans l'analyse présentée ici et comparées à la première analyse. Ces caractéristiques correspondent à: (i) un nombre prépondérant d'espèces moléculaires comportant un 16:0, qui quand il est en *sn*-2 (hypothèse la plus probable) suggère une origine plastidiale des squelette diacylglycérol, (ii) la présence de VLC-PUFA préférentiellement aux extrémités *sn*-1 et/ou *sn*-3 des TAG d'origine supposés d'origine plastidiale, qui suggère l'intervention de DGAT sur des squelette glycérol d'origine plastidiale, (iii) des combinaisons présentant un 16:4 en position latérale qui suggère l'existence d'un transfert direct des lipides structuraux à 16:4 (majoritairement en *sn*-2) aux DAG précurseurs de TAG et (iv) la présence de 18:5, marqueur des galactolipides, aux extrémités des TAG supposés d'origine endosomale, qui suggère le transit du 18:5 via le pool d'acyl-CoA et son transfert sur des DAG du RE.

2.2.2 Dynamique des espèces de TAG en carence azote

Nous pouvons comparer de manière fiable la quantification relative effectuée lors de la seconde analyse entre l'échantillon contrôle et l'échantillon carencé de cette deuxième analyse. La quantification par GC-FID rejoint l'analyse en HPLC-MS. Globalement il y a une diminution du taux d'insaturation reflétée

par l'augmentation du 16:0, la diminution du 16:4 ainsi que du 18:4 au profit d'une augmentation du 18:3 (Fig. 35). Cette balance 18:3/18:4 est nette dans les profils totaux et se retrouve au niveau des TAG. Les espèces de TAG concernées par cette augmentation de 18:3 comportent majoritairement une combinaison 18:3/16:0 (Fig. 37, en vert dans le tableau des combinaisons). L'augmentation spectaculaire de 16:0/16:0/18:3 (50:3) s'accompagne d'une altération importante de la quantité des espèces de 50:1 à 50:6; l'espèce majoritaire 16:16:0/18:1 diminue de moitié au profit de l'apparition de 50:2 (16:0/16:0/18:2) dans la même proportion. On observe également une augmentation des espèces 50:4, 50:5, 50:6 qui comprennent des combinaisons du 18:3; la diminution de moitié du TAG 50:8 (18:4/16:0/16:4) ne peut être rendue compte à elle seule de la hausse des espèces à 18:3 précédemment évoquées. D'autres espèces contenant en partie des combinaisons à 18:4 diminuent de manière importante (54:9 et 54:10) et sont possiblement associées à la baisse importante de 18:4 dans les TAG (Degraeve-Guilbault et al., 2017). Le profil des TAG est également marqué par une diminution des TAG contenant des VLC-PUFA dont ceux probablement d'origine eucaryotique ce qui inclut une disparition des TAG di-VLC-PUFA (Annexe 4). Ensemble, ces résultats indiquent une régulation négative des mécanismes impliqués dans la synthèse de TAG supposés provenir de la voie endosomale.

2.2.3 Dynamique des espèces de lipides structuraux en carence azote

L'observation de la dynamique de changement d'espèces dans chaque classe de lipides structuraux en carence azote permet d'appréhender le remodelage des chaînes acyles sur les squelettes glycérol issus de la synthèse endosomale et plastidiale qui sont des précurseurs potentiels de TAG. Il n'est pas possible d'établir des relations quantitatives entre la dynamique des espèces observées dans chaque classe de lipides et les TAG car ces quantités sont biaisées par l'ionisation différente des différents lipides (Matériel et méthode, §3.3.1.5); néanmoins nous pouvons comparer la variation d'une espèce donnée dans une même classe de lipides entre la condition contrôle et la condition carencée (Fig. 38).

Chez les lipides extraplastidiaux on observe en carence une diminution des espèces PDPT et DGTA 14:0/16:4 et une augmentation des espèces PDPT 16:0/16:3 et 16:0/16:4. Ces combinaisons ne sont retrouvées que chez les espèces SQDG mais en position *sn-1/sn-2* inversés. Il est cependant remarquable que les espèces 16:3/16:0 et 16:4/16:0 diminuent dans la classe prépondérante SQDG de manière concomitante à l'augmentation des espèces 16:0/16:3 et 16:16:4 du PDPT. Par ailleurs, les espèces de DGTA di-VLC-PUFA diminuent significativement en carence et traduisent probablement l'arrêt d'un transfert de VLC-PUFA dans le pool d'acyl-CoA et vers les TAG.

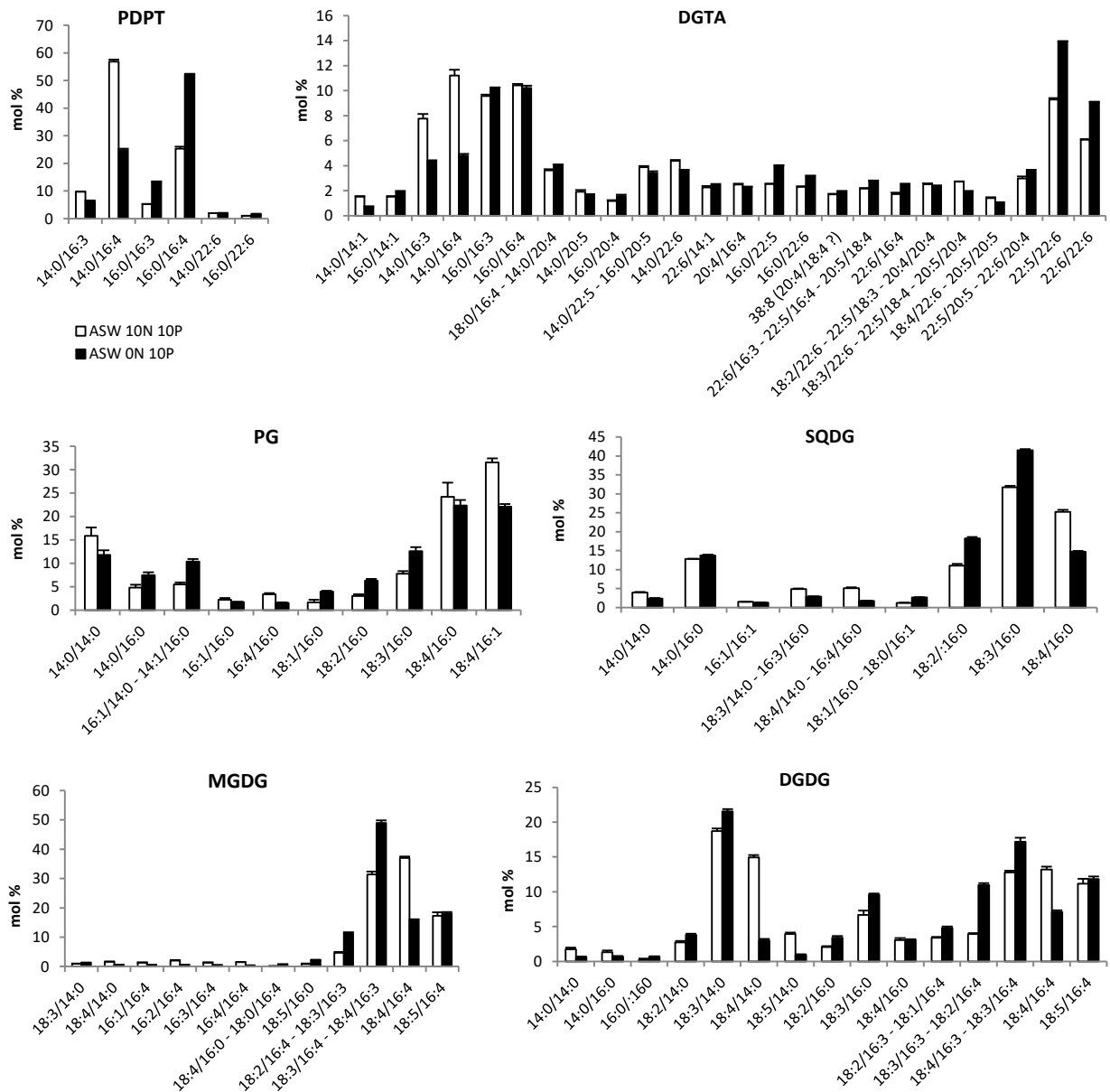


Figure 38 : Analyse positionnelle comparative des lipides structuraux en carence azotée (ASW 0N) par rapport aux conditions contrôle (ASW 10N).

Les C18 PUFA sont majoritaires dans les lipides plastidiaux et représentent 50% des FA du MGDG, 40% du SQDG, 30% du PG, 45% du MGDG (Degraeve-Guilbault et al., 2017). Les combinaisons 18:X/16:0 (X>1) prédominent dans le SQDG (57% des espèces du SQDG), le PG (40%) et représentent plus de 10% des espèces du DGDG. Chez ces classes de lipides, on observe une diminution des espèces 18:4/16:0 au profit des espèces 18:3/16:0 et une forte baisse des espèces 18:4/14:0 dans le DGDG. Chez les galactolipides on observe de surcroît une nette augmentation des espèces comprenant du 18:3/16:4 (et dans une moindre mesure de celle comprenant du 18:2/16:4) au détriment des espèces 18:4/16:4. Ce phénomène est vraisemblablement lié à une inhibition d'une activité $\Delta 6$ désaturase plastidiale car l'augmentation des combinaisons à 18:3 se répercute sur les mêmes combinaisons à 18:1 et 18:2 dans

tous les lipides plastidiaux. La dynamique des combinaisons est cohérente avec l'hypothèse d'un transfert de squelette glycérol plastidial vers les TAG, passant ou non par les lipides plastidiaux. Ainsi la hausse des espèces 18:2/16:0 ou 14:0, 18:3/16:0 ou 14:0 (SQDG et DGDG) est cohérente avec la hausse des mêmes combinaisons dans les TAG (48:2, 48:3), tout comme la baisse de 18:4/16:0 qui pourrait intervenir dans la diminution du TAG 50:8 (16:4/16:0/18:4). Néanmoins, en raison de la diversité des combinaisons dans les espèces de TAG rien ne permet d'affirmer que ce mécanisme est majoritaire par rapport à un export des 18:3 18:4 plastidiaux vers le pool d'acyl-CoA servant à la synthèse de DAG puis de TAG. Par ailleurs, la stabilité des espèces 16:0/16:0 du DGDG minoritaires et l'augmentation des espèces 18:1/16:0 en carence azote ne sont pas cohérentes avec la forte baisse de l'espèce TAG majoritaire 50:1 (18:1/16:0/16:0).

Outre les voies GPAT et LPAAT servant à la synthèse de DAG on peut supposer l'existence d'une voie spécifique de synthèse des TAG à partir de MAG. Elle pourrait être responsable de la synthèse de 16:0-MAG et 14:0-MAG et ne pas dépendre de la spécificité des acyltransférases impliquées dans la synthèse des lipides structuraux.

Chez *O. tauri*, l'analyse positionnelle indique une contribution de tous les glycérolipides structuraux à la synthèse des TAG sous tendu par des mécanismes qui semblent multiples et restent à élucider.

2.2.4 Dynamique de transfert du ¹⁴C entre lipides structuraux et TAG

Afin d'appréhender la dynamique du transfert entre lipides structuraux et TAG, des expériences de marquage radioactif ont été mises en place. Les cellules sont incubées avec du ¹⁴C acétate pendant 4 heures (charge) afin de marquer les FA néo-synthétisés. Après deux lavages, la carence est initiée et le transfert de la radioactivité fixée nous informe sur le transfert de carbone entre les lipides (glycérol et chaînes acyles). Au cours du suivi (prélèvement à 0, 3, 9, 24 et 48 h), la somme de la radioactivité retrouvée dans les lipides reste constante et montre qu'aucune radioactivité ne provient d'un pool acétate marqué qui aurait persisté dans la cellule.

Au moment initial la radioactivité est principalement confinée (à 85%) dans les lipides plastidiaux (Fig. 39A) qui sont les lipides majoritaires chez *O. tauri* (environ 85%) (Degraeve-Guilbault et al., 2017). En détail, la radioactivité est principalement incorporée dans le PG (40%), secondairement dans le MGDG (20%) et enfin dans le DGDG et SQDG (12% et 15%). Le PG, dont la quantité est inférieure au MGDG, est pourtant le plus marqué ; le PG serait donc le lipide synthétisé le plus rapidement. Pour les autres lipides plastidiaux, le marquage correspond à leur prépondérance chez *O. tauri*. Les 10% de radioactivité incorporés dans les lipides extraplastidiaux sont partagés de manière équivalente entre le PDPT et le DGTA (bien que le DGTA représente le double du PDPT). L'évolution de la radioactivité est ensuite très différente entre les lipides plastidiaux et extraplastidiaux.

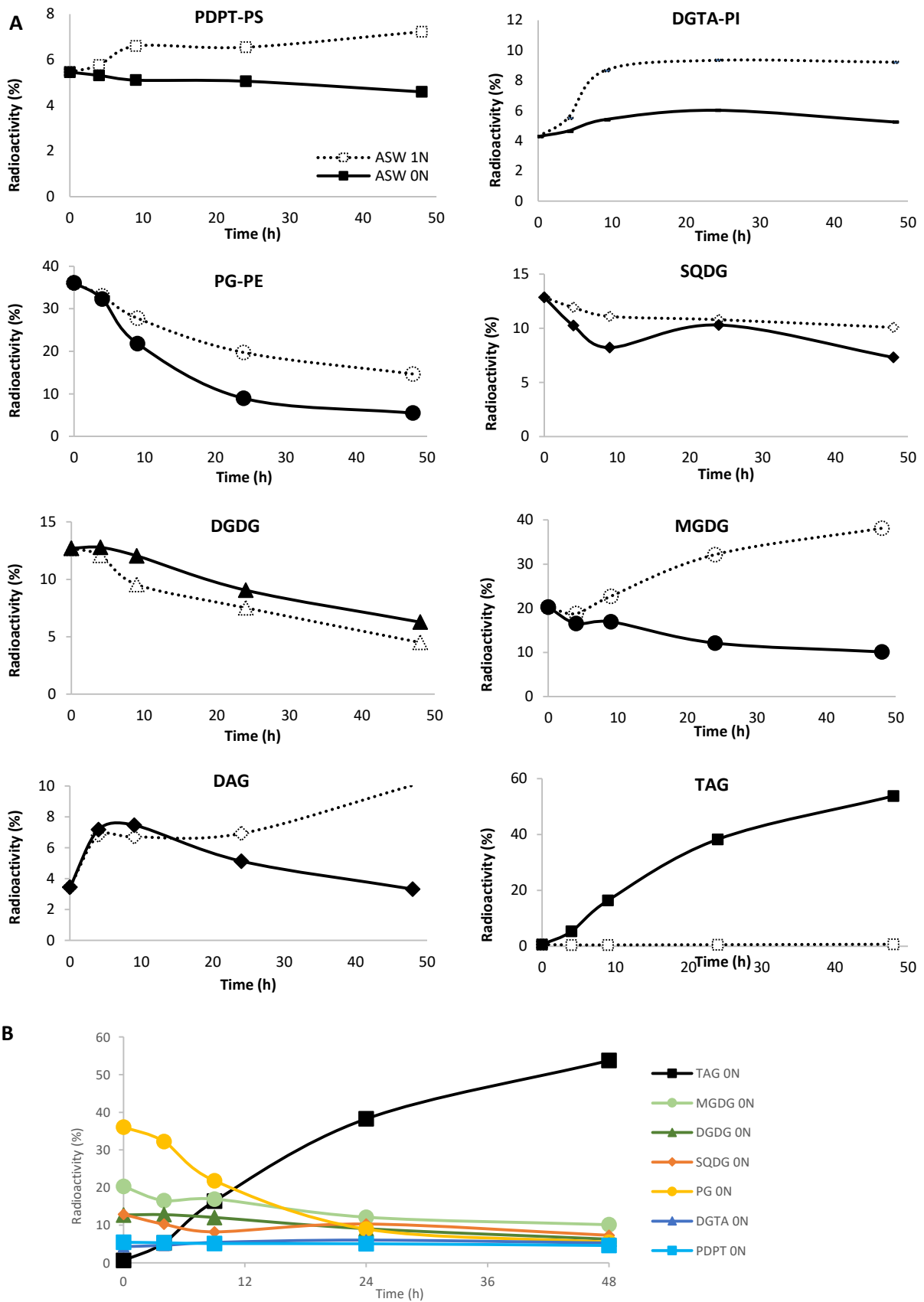


Figure 39 : Suivi de la radioactivité dans les lipides de cultures contrôle ou carencée marquées à l'acétate.

A, Pourcentage de radioactivité dans chaque classe de lipides en conditions non carencées et carencée. **B**, Pourcentage de radioactivité dans les lipides majoritairement marqués en carence azotée. Les cellules ont été marquées pendant 3h au ^{14}C – acétate. La chase est ensuite observée en milieu contrôlé (ASW 10N) ou carencé (ASW 0N).

Dans la culture contrôle (Fig. 39A), on observe en 24 h une baisse de la moitié de la radioactivité du PG (20% de la radioactivité totale) et une hausse de 20% dans le MGDG. Etonnamment dans le DGDG, qui est issu du MGDG, la radioactivité diminue pendant tout le suivi, mais de manière plus marquée durant les premières 24 h. En ce qui concerne les lipides extraplastidiaux la radioactivité double à 9 h dans le DGTA et reste ensuite constante, alors qu'elle ne varie pas dans le PDPT. Si l'augmentation initiale de la radioactivité dans le DGTA suggère un import initial de carbone dans ce lipide, la stabilité de la radioactivité dans les lipides extraplastidiaux sur près de 40 h, où la densité cellulaire fait plus que doubler, suggère que le flux sortant, qui a forcément lieu dans des cellules en division métaboliquement actives, est masqué par un flux entrant. De manière similaire la radioactivité du SQDG ne varie pas dans le contrôle sans doute pour les mêmes raisons.

Lors de la carence azotée qui provoque rapidement l'accumulation de TAG, dès 9 h on observe dans une baisse de la radioactivité dans tous les lipides structuraux par rapport à leur contrôle respectifs à l'exception du DGDG (Fig. 39A et 39B). En parallèle la radioactivité s'accumule progressivement dans les TAG et passe de 20% de la radioactivité totale à 9 h et 50% à 48 h. La contribution du PG semble être la plus marquée, suivie par celle du MGDG, et possiblement du SQDG qui diminue précocement. Nous retrouvons bien une contribution plastidiale majoritaire à la synthèse de TAG en carence N.

Discussion

L'ensemble de ces résultats confirme l'origine préférentiellement plastidiale des TAG en carence azotée, à l'instar de ce qui a été décrit initialement chez *C. reinhardtii* (Fan et al., 2011). Néanmoins, chez *O. tauri* les espèces de TAG à VLC-PUFA restent présentes mais diminuent et les espèces di- et tri-VLC-PUFA ne sont plus détectées. Dans tous les cas, les VLC-PUFA transférés sur les TAG ne peuvent provenir que des lipides extraplastidiaux. Or, il n'y a pas de baisse de radioactivité sur ces lipides, ni dans les contrôles, ni en carence. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que ces lipides ne soient pas suffisamment marqués et que de faibles transferts vers les TAG ne puissent être détectés, soit par le fait que le flux sortant radioactif est masqué par un flux entrant radioactif (absence de FA synthétisé *de novo*). Il est possible que le DGTA soit accepteur de 18:X d'autres lipides comme cela a été décrit pour d'autres espèces (Vogel and Eichenberger, 1992). Dans notre cas il est possible que les 18:3 et/ou 18:4 issus de désaturation sur les lipides plastidiaux lui soient transférés.

D'après les analyses de radiomarquage à l'acétate, l'origine plastidiale des TAG en carence N fait intervenir un apport carboné provenant du majoritairement du PG et du MGDG mais également du SQDG. PG et SQDG pourraient être à l'origine du squelette DAG 18:X/16:0, notamment du 18:3/16:0 présent dans le TAG majoritaire (50:3) en carence azote. Les autres espèces majoritaires de type 18:X/14:0 (avec $X \neq 4$) sont présentes dans le DGDG mais également dans le PG. Au vu des résultats de

radiomarquage et dans le cadre de l'hypothèse d'un transfert de squelette glycérol des lipides plastidiaux vers les TAG, le PG pourrait être impliqué.

Les combinaisons non matures du MGDG de type 18:X/14:0 ou 18/X/16:0 ne s'accumulent pas et semblent être orientées vers la synthèse de DGDG au vue des espèces moléculaires des galactolipides et de la voie de biosynthèse du DGDG décrite dans l'introduction (§4.2.2.1). Ces espèces 18:X/14:0 et 18/X/16:0 contiennent d'avantage d'acides gras néo-synthétisés donc froid (par rapport aux espèces matures radiomarquées), pouvant expliquer la non-augmentation de la radioactivité dans le DGDG alors que nous savons que la proportion de celui-ci augmente en carence azotée (Degraeve-Guilbault et al., 2017). Nous pouvons aussi imaginer qu'en condition de carence, un acheminement des espèces de MGDG intermédiaires servant à la synthèse du DGDG (donc saturées) soient acheminées vers la synthèse des TAG.

Ces expériences de radiomarquage nécessitent d'être reproduites pour confirmer ces résultats ; il serait judicieux de le faire sur un temps de charge plus long (12 h ou 24 h) afin de s'assurer que tous les lipides soient bien radiomarqués, notamment le DGTA. Il serait également judicieux de réaliser un suivi de marquage au glycérol radioactif qui permettrait de pouvoir appréhender les transferts de moitiés glycérol et éventuellement de DAG vers les TAG.

2.3 Régulation transcriptionnelle des gènes du métabolisme des TAG

Afin de comprendre quelles enzymes sont potentiellement impliquées dans la synthèse des TAG, nous avons réalisé des expériences préliminaires de RT-qPCR dans les conditions propices à l'accumulation de TAG, c'est-à-dire en carence azote (ASW 0N10P). Un ensemble de gènes candidats, connus pour participer à la synthèse des TAG, a été choisi et est présenté dans le tableau 11.

La voie canonique de biosynthèse des lipides implique des GPAT et des LPAAT dans les compartiments microsomaux et plastidiaux. Il est important de rappeler que la spécificité de ces deux classes d'acyltransférases diffère selon leur compartiment et confère une signature positionnelle particulière en acides gras des glycérolipides (Introduction, §4.2.1). Chez *C. reinhardtii*, la transcription des gènes *GPAT* et *LPAAT* n'est pas activée en carence N, contrairement à ce qui est observée lors de la carence en soufre (Sato et al., 2014). Chez cette microalgue verte en carence N, il a même été montré que les gènes codant les enzymes responsables de la synthèse des acides gras (PDC pour 'complexe pyruvate deshydrogénase', ACCase, KAS) sont réprimés (López García de Lomana et al., 2015). Le gène *LPAAT* a cependant été montré comme régulé transcriptionnellement positivement lors de l'accumulation de TAG en phase stationnaire chez *C. reinhardtii*. Et la transcription des *GPAT* et *LPAAT* de *Neochloris oleabundans* est activée en carence N (Rismani-Yazdi et al., 2012). La GPAT plastidiale de *P. tricornutum*, qui semble montrer une préférence pour les acides gras insaturés, contribue à augmenter le

métabolisme des TAG lorsque son gène est surexprimé (Niu et al., 2016). De même, la surexpression du gène de la GPAT, cette fois-ci endosomale, de *Lobosphaera incisa* chez *C. reinhardtii* conduit à une augmentation de 50% en TAG (Iskandarov et al., 2016). Ensemble ces résultats ouvrent ainsi de nombreuses possibilités pour l'ingénierie des TAG (Iskandarov et al., 2016; Niu et al., 2016).

Tableau 11 : Présentation des gènes d'*O.tauri* codant les enzymes impliquées dans la synthèse des TAG.

Sur cinq protéines contenant le domaine DGAT (en gras), trois séquences de DGAT2 d'*O. tauri* (soulignées) ont été identifiées par (Wagner et al., 2010) et caractérisées chez la levure déficiente en TAG (BY4741 Iro1Δ dga1Δ).

* : son domaine DGAT est moins bien conservé que chez les quatre autres DGAT et un domaine hydrolase est présent en N-terminal. Cette enzyme est homologue d'un phytol ester synthase chez *Arabidopsis* (AT3G26840).

Les scores des peptides signal (SP) sont indiqués: plastidiaux (C) en vert, mitochondriaux (M) en bleu. Les scores autres (O) ou associés à la voie sécrétoire (S) sont en blanc.

Les recherches par blast effectuées par F. Corellou sont indiquées (\$). Les références bibliographiques ayant identifiées ces séquences comme homologues sont indiquées.

Function	Accession	Predalga SP-Score (max 5)	Loc.	Comments
GPAT1	CAL52024.1	0.69	C	Glycerol3phosphate O- acyltransferase, chloroplast
Putative GPAT2	CEG00561.1	0.11	O	Homology to GPAT9, GAPT3 family (\$) (Iskandarov et al., 2016)
Soluble LPAAT	CEF98793.1	3.07	C	(Misra et al., 2012)
LPAAT1	CEF98793.1	3.73	C	(Misra et al., 2012)
SFR2	CEF99665.1	1.29	S	Glycosyl hydrolase family (\$) Identities : 105/407 : 26% - Positives : 171/407 : 42%
LPCAT	CAL58542.1	0.18	S	MBOAT domain (\$)
<u>DGAT2A</u>	CEG01508.1	1.84	C	Low activity in BY4741 Iro1Δ dga1Δ. The sequence study determines an upstream Met : the elongated GAT2A is predicted plastidial
<u>DGAT2B</u>	CAL58088.1	2.36	S	Corresponds to the DGTT2 which has a strong activity in yeast BY4741 Iro1Δ dga1Δ. The extended sequence has an increased targeting score (initial score 0.91)
<u>DGAT2C</u>	CEG00074.1	1.35	M	Absence of activity in BY4741 Iro1Δ dga1Δ, Sequence used might not have been complete. The extended sequence has a mitochondrial score
<u>DGAT2D</u>	CEF99849.1	1.48	S	Extended genomic sequence (\$)
<u>DGAT2E*</u>	CEG01641.1	0.50	C	Homology phytol ester synthase (\$)
PDAT	CAL55479	4.31	C	(Yoon et al., 2012)
PGD1	CEG01940.1	2.72	C	Homolog to Cre03.g193500.t1.2 (\$) (Li et al., 2012)

Lors de l'accumulation de TAG en carence N, les gènes d'autres acyltransférases, les DGAT de type 2, sont connus pour être transcriptionnellement activés chez *N. oceanica* (IMET1) (Li et al., 2014a) et *C. reinhardtii* (Boyle et al., 2012; Sato et al., 2016). Les DAGT sont considérées comme des enzymes primordiales dans l'ingénierie des TAG (Zienkiewicz et al., 2016). Les microalgues de la classe des Mamiellales, sont caractérisées par l'unique présence de DGAT2 (Wang et al., 2015; Zienkiewicz et al., 2016) et seules trois DGAT2 avaient été identifiées chez *O. tauri* en 2010 par Wagner et al. (A, B et C). Cependant, par alignement *in silico* avec les données génomiques actuelles nous avons identifié la présence d'au moins une autre DGAT2 dans le génome d'*O. tauri* : la DAGT2D (la DGAT2E s'apparente d'avantage à une phytol ester synthase). Il est probable que la DGAT2B utilisée par Wagner

ne corresponde pas à la séquence complète que nous avons déduite à partir du séquençage récent (2014); l'allongement des séquences disponibles annotées automatiquement permet souvent d'obtenir une prédiction de localisation qui est indiquée dans le tableau 11. Les DGAT, la PDAT et PGD1 sont des enzymes majeures impliquées dans les étapes finales de la synthèse des TAG chez les microalgues (Zienkiewicz et al., 2016). La PDAT a été montrée comme jouant un rôle crucial pour la synthèse des TAG d'origine plastidiale chez *C. reinhardtii* et l'expression de son gène est activée en carence N (Boyle et al., 2012; Yoon et al., 2012). PGD1 est une lipase qui utilise préférentiellement le FA *sn-1* du MGDG pour la synthèse de TAG (Li et al., 2012).

D'autres gènes nous ont semblé également intéressants à étudier : *LPCAT*, *SFR2*, et *WRI-1*. En effet, la *LPCAT* est responsable de l'échange des chaînes acyle et de l'alimentation du pool d'acyl-CoA. Or le 22:6-CoA diminue très fortement dans le pool d'acyl-CoA en carence azote (Degraeve-Guilbault et al., 2017) ; nous voulions donc savoir s'il existait une régulation transcriptionnelle en carence N sur la *LPCAT* putative d'*O. tauri*. En réponse au froid chez les plantes, le produit du gène *SFR2*, la GGGT, utilise le MDGD comme donneur moitié glycérol pour la formation de DAG, qui forment ensuite des TAG (pour revue Moellering and Benning, 2011). La proportion de TAG d'origine plastidiale chez *O. tauri* augmentant en carence N, nous ne pouvions exclure une régulation transcriptionnelle particulière d'un homologue putatif de *SFR2* dans ce contexte. Enfin *WRINKLED-1* (*WRI-1*), facteur de transcription identifié chez *A. thaliana* qui favorise la biosynthèse d'acides gras pour l'accumulation de TAG dans la graine (To et al., 2012) et dont l'homologue putatif de chez *C. reinhardtii* (*Cre16.g667900*) semble jouer un rôle en carence N, nous a semblé potentiellement intéressant dans cette approche gène candidat. Il convient de noter que gènes putatifs codant le facteur de transcription *WRI-1* et la GGGT (gène *SFR2*), possèdent une homologie faible rapport aux séquences identifiées chez *A. thaliana* (Tab. 11).

Deux expériences ont été conduites indépendamment pour appréhender les régulations transcriptionnelles de ces gènes en carence N. Le protocole d'étude est identique et les cellules ont été récoltées à différents temps après centrifugation et re-suspension en milieu carencé ou non, soit dans une expérience à 72h et soit au cours d'une cinétique plus rapprochée dans une autre expérience 3h, 6h, 12h, 36h (Fig. 40).

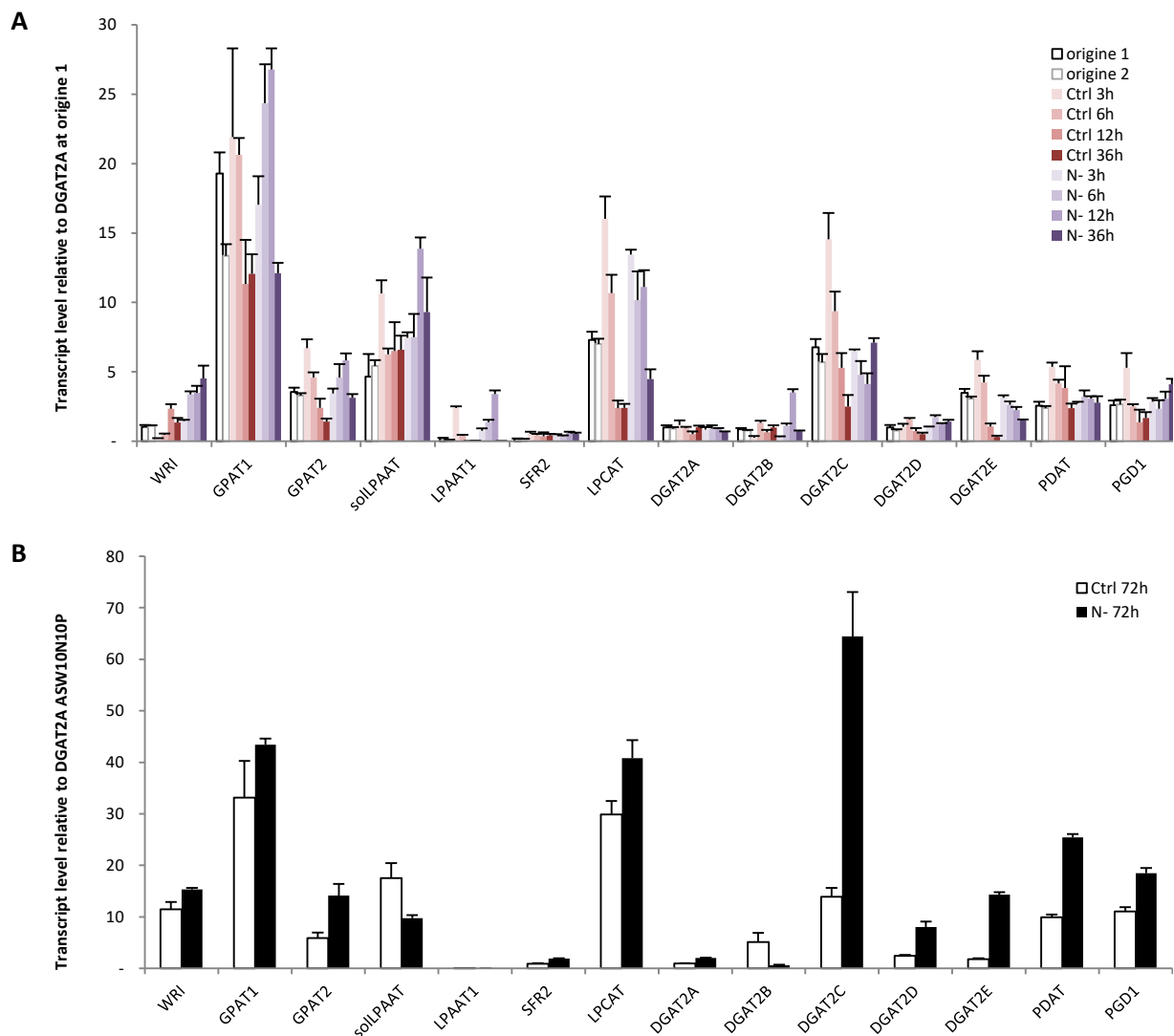


Figure 40 : Régulation transcriptionnelle exploratoire des gènes impliqués dans la biosynthèse des TAG au cours de la carence azotée, normalisée par rapport à l'expression de DGAT2A.

A, Cinétique conduite sur 36h. Les origines correspondent aux cultures avant centrifugation nécessaire au changement de milieu; Les cellules contrôles sont également centrifugées. L'expression des gènes a été normalisée par rapport à la moyenne géométrique des gènes de ménage (*EF1 α* , *CAL* et *ARP2*). **B**, Point indépendant à 72h de carence. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de ménage *EF1 α* .

Dans les deux expériences, les niveaux d'expression sont indiqués par rapport à celui de la DGAT2A respectivement au point origine 1 ou au point contrôle 72h. (n=1, les barres d'erreurs = écart-types de répliques techniques de qPCR).

Le profil de l'expression des gènes, normalisée arbitrairement par rapport à celle de *DGAT2A*, est similaire dans les cultures contrôle des deux expériences, tout comme les tendances de changement d'expression entre cellules non carencées et carencées aux temps 36h et 72h. Le gène *GPAT1* possède le niveau d'expression relatif le plus important. Ensuite sont retrouvés *solLPAAT*, codant la LPAAT soluble, et *DAGT2C*, puis *GPAT2*, *PGD1* et *PDAT*, et enfin *DAGT2E* qui est relativement mieux exprimée dans les cellules 'origine' (Fig. 40A). Au cours de la cinétique jusqu'à 36h, l'expression du gène *GPAT1* et de l'homologue de *SFR2* d'*A. thaliana* (Tab. 11) augmente puis revient à sa valeur d'origine dans l'échantillon contrôle et dans l'échantillon carencé (Fig. 40A et annexe 5A), on obtient donc une dynamique de changement d'expression des gènes étudiés similaire entre le contrôle et les

cellules carencées. La manipulation physique des cellules est inévitable et est très probablement accompagnée de changement d'expression de gènes; c'est pourquoi les variations transcriptionnelles en carence N chez *O. tauri* des deux expériences présentée figure 40, ont été normalisées par rapport au contrôle de chaque temps correspondant. Cette normalisation nous permet de comparer plus simplement l'évolution de l'activation ou de la répression des gènes sur une période total de 3h à 72h comme représentée figure 41. Les analyses individuelles de chaque expérience où l'expression de chaque gène est normalisé par rapport à son expression chez le contrôle au premier temps de l'analyse est disponible dans l'annexe 5.



Figure 41 : Ratio de transcription des gènes de métabolisme des TAG en carence azotée.

L'expression de chaque gène en carence à chaque temps donné déterminée précédemment (Fig. 40) a été divisée par son expression en condition contrôle au même temps. Les deux expériences présentées indépendamment figure 40A et 40B ainsi normalisées sont présentées ensemble. L'étoile (*) indique cependant que le point à 72h ne provient pas du même set que les autres points de la cinétique (n=1)

La tendance globale est une augmentation de l'expression de la plupart des gènes étudiés qui est particulièrement marquée pour trois des gènes contenant des domaines DGAT notamment *DGAT2D*, *DGAT2E* et *DGAT2C* (Fig. 41). *DGAT2E* qui code sans doute une phytyl estérase plastidiale, présente la plus forte augmentation de son expression ; d'un facteur 7 à 72h par rapport au contrôle du même temps. Les gènes *DGAT2C* et *DGAT2D*, dont les enzymes sont prédites être respectivement localisée dans la mitochondrie et sécrétée avec un score relativement faible (de l'ordre de 1,3/5, Tab. 11), sont environ 5 fois plus exprimés de manière durable. Le gène *WRI-1 like* est le seul gène dont la forte activation de sa transcription est initiée précocement (à 3h et 6h). D'une moindre manière, d'autres gènes sont activées en carence : *GPAT2* et *PGD1* dont l'expression environ double à 72h. Concernant les autres gènes étudiés, il est difficile de statuer car ils semblent présenter des points hors tendance : *GPAT1* (12h ?), *LPCAT* (12h ?), *DGAT2A* (36h ?) et *solLPAAT* (12h ou 72h?) qui semblent être légèrement induits en carence azotée ; *DGAT2B* (12h ?) qui semble être le seule gène réprimé par la carence azotée. Le gène *LPAAT1* quand à lui est très faiblement exprimé que ce soit en condition

contrôle ou en carence N (Fig. 40). Les résultats nous nous permettaient pas d'avoir une vision fiable sortant d'un bruit de fond éventuel alors son ratio d'expression n'est pas représenté sur la figure 41.

Discussion

O. tauri présente deux GPAT, chacune étant prédite dans un compartiment différent (chloroplaste/RE). En carence azotée chez *O. tauri*, l'augmentation des cDNA de la GPAT2, supposée endosomale, est plus marquée que celle de la GPAT1 (plastidiale) comme chez *N. oceanica* (lignée chromalveolate) (Li et al., 2014a). La GPAT de endosomale de *Lobosphaera incisa* a été montré comme répondant positivement à la carence en azote (Iskandarov et al., 2016). Chez *C. reinhardtii* (lignée verte) c'est la situation inverse qui est observée : l'expression du gène de la GPAT chloroplastidiale est plus induite que celle de l'homologue de OtGPAT2 en condition d'accumulation de TAG (Sato et al., 2014). *O. tauri* présente également une LPAAT de type 1 (plastidiale) et une LPAAT soluble (prédite plastidiale) présente à un exemplaire chez toutes les microalgues et *A. thaliana* (Misra et al., 2012). L'amplification de *LPAAT1* est très faible par rapport aux autres gènes et nous tenons à dessiner un autre couple de primer pour confirmer que *LPAAT1* est induit en carence azote, ce qu'indiquent nos premiers résultats. La LPAAT1 de *C. reinhardtii* a une préférence pour 16:0-CoA par rapport aux 18:1-CoA *in vitro*, ce qui est cohérent avec la signature *sn-2* en C16:0 observée chez cet organisme comme chez *O. tauri* (Yamaoka et al., 2016). Son expression est modérée dans des conditions normale et induite au bout de 12h en carence azote. Chez *O. tauri*, les cDNA de la LPAAT soluble augmentent transitoirement à 12h en carence azote. La LPAAT soluble d'*A. thaliana* est prédite mitochondriale et possède, en plus de son activité LPAAT acyl-CoA-dépendante, des activités plus faibles TAG-lipase et phospholipase (Ghosh et al., 2009). Le rôle *in vivo* de ces LPAAT solubles ainsi que leur spécificité restent à être étudiés. De plus, chez *O. tauri*, l'absence de LPAAT endosomale, mais présente par exemple chez *N. oceanica* (Li et al., 2014a), est intrigante et on ne peut que spéculer sur les mécanismes à l'origine de la composition acyle des lipides extraplastidiaux.

Les gènes des acyltransférases PGD1 et PDAT, impliqués dans la synthèse de TAG d'origine plastidiale, sont transcriptionnellement induits en carence azote chez *C. reinhardtii* (Boyle et al., 2012; Li et al., 2014a) et est cohérent avec nos observations chez *O. tauri*. Le fait que ces deux protéines dont la prédiction chloroplastidiale est élevée, soient transcriptionnellement induites en condition d'accumulation de TAG, renforce l'hypothèse d'une voie de synthèse majoritairement plastidiale des TAG chez *O. tauri*. Chez *C. reinhardtii*, l'enzyme PGD1 fournit les TAG en chaîne acyles en hydrolysant préférentiellement l'acide gras en position *sn-1* du MGDG (Li et al., 2012) et l'enzyme PDAT a été montrée comme possédant une activité lipase assez diversifiée mais particulièrement spécifique du MGDG par rapport au DGDG et pour les phospholipides anioniques comme PA, PS, PI et PG (Yoon et al., 2012). Son activité de transfert de chaîne acyles du MGDG (et non du SQDG ou

DGDG) aux TAG a aussi été mise en évidence. L'ensemble de nos résultats suggèrent que, chez *O. tauri*, le MGDG et le PG possèdent au moins un rôle de donneurs de chaîne acyle pour la synthèse des TAG. En l'absence de PC chez *O. tauri*, la question du substrat de la LPCAT dont la transcription n'est pas clairement activée en carence et prédite comme étant extraplastidiale, pose question. Au vu des compositions des TAG observées en ESI-MS/MS, le DGTA pourrait être un donneur potentiel de VLC-PUFA pour la synthèse des TAG.

Chez *N. oceanica* (IMET1), la seule DAGT qui possède un signal d'adressage à la mitochondrie, DGAT2I, jouerait plutôt un rôle dans la synthèse des TAG en conditions non carencées (Li et al., 2014a). Pourtant chez *O. tauri*, c'est le gène de DGAT2C prédite mitochondriale, dont l'expression est majoritaire en condition contrôle, qui est fortement activé transcriptionnellement en réponse à la carence azotée, devant les *DGAT2-D* et *-A* et devant les autres gènes. Chez *O. tauri* on observe alors une activation différentielle des gènes de DAGT2 comme chez *N. oceanica* (Li et al., 2014a) alors que chez *C. reinhardtii*, tous les gènes de DGAT2 exprimés voient leur expression doublée en réponse à la carence azotée (Miller et al., 2010; Sato et al., 2014). Cette différence d'activation des *DGAT* en carence azote constitue le critère initial pour sélectionner les *DGAT* de microalgues d'intérêt biotechnologique ; chez *N. oceanica* (CCMP1779), en fonction de leur profil d'expression, six des douze *DGAT2* ont été testées en complément fonctionnelle chez la levure et ont montré que NoDGAT2-5 permet la plus forte accumulation de TAG (Zienkiewicz et al., 2017). De plus chez *O. tauri*, il semblerait que l'expression de *DGAT2B* soit réprimée en absence d'azote, ce qui est aussi le cas chez *N. oceanica* où l'expression de six des treize gènes de *DGAT* est inhibée (Li et al., 2014b). La régulation différentielle de la transcription des *DGAT2* chez *O. tauri* comme chez d'autres microalgues (Zienkiewicz et al., 2016), suggère que toutes les *DGAT* de microalgues ont des rôles non redondants dans la synthèse des TAG lors de carences nutritives. En effet, l'étude de leur spécificité montre de nombreuses différences entre les différents homologues au sein d'un même organisme et constitue le second critère d'intérêt en biotechnologie. Ainsi trois *DGAT* de *C. reinhardtii* ont été caractérisées et montrent une variabilité importante de préférence de substrat, aussi bien pour le receveur DAG que pour le donneur acyl-CoA (Liu et al., 2016). Chez *O. tauri*, nous pouvons supposer au vu des profils de TAG en ESI-MS/MS qu'au moins l'une d'entre elles, probablement plastidiale, possède une spécificité accrue pour les DAG procaryotiques et une spécificité pour les chaînes acyles plutôt saturées. La *DGAT2B* dont la localisation est prédite être dans la voie sécrétoire (2.35/5), a été étudiée par Wagner en système levure. Elle restaure aisément la déficience en TAG de *S. cerevisiae* (BY4741 *lro1Δ dga1Δ* dépourvue de *DGAT* et *PDAT*) et présente selon les auteurs une large spécificité de substrats, tout comme la *DAGT2-5* de *N. oceanica* (Zienkiewicz et al., 2017). Cette conclusion repose sur l'efficacité égale de *DGAT2B* à incorporer les FA 18:3 *n*-6, 18:3 *n*-3, 20:3 *n*-3, 20:3 *n*-6 ajoutés dans le milieu. Néanmoins, il faut noter que le 20:3 n'est pas détecté chez *O. tauri* et que l'incorporation de VLC-PUFA qui sont enrichis dans le pool d'acyl-

CoA et notamment de 22:6n-3, n'a pas été testée. *In vivo* il est probable que la concentration des espèces dans le pool d'acyl-CoA joue un rôle dans la préférence de substrat des enzymes ; ainsi la réduction de l'incorporation de 22:6 dans les TAG pourrait résulter de la baisse conjointe de 22:6 dans le pool d'acyl-CoA qui est drastique en carence N et de la baisse de l'expression du gène de la DGAT responsable de son transfert. Une hypothèse est que la répression transcriptionnelle de *DGATB* limite l'incorporation de VLC-PUFA. L'étude des DAGT de microalgues également menées chez *P. tricornutum* (Guihéneuf et al., 2011) et *N. oleabundans* (Klaitong et al., 2017) ouvre le champ des possibles pour la bioingénierie d'organismes servant à la production d'huile à la composition en FA particulière et encourage donc à caractériser les DGAT2 d'*O. tauri*, notamment A, C, D en séquence complète et de vérifier leur localisation ; la DAGAT2A étant le seule prédite plastidiale mais dont le gène est faiblement exprimé en condition contrôle et peu activé en réponse à la carence azotée.

Enfin, il est intéressant de constater que les augmentations d'expression des gènes du métabolisme des TAG décrites ci-dessus sont souvent initiées 12h après la carence. Sauf l'homologue de WRINKLED-1 (*WRI-1*) un facteur de transcription qui chez *A. thaliana* favorise la biosynthèse d'acides gras pour l'accumulation de TAG dans la graine (To et al., 2012), et qui voit son expression augmentée précocement dès 3h après la carence chez *O. tauri*. Une étude de transcriptomique révèle que, chez *C. reinhardtii*, *AP2-15* ou *CreWRI-1-like* (Cre16.g667900) reste relativement constant durant les deux premières heures de carence N puis augmente pendant 24h et voit son expression multipliée par 2.5 (Gargouri et al., 2017). Chez *O. tauri* la cinétique d'activation de la transcription de ce candidat *WRI-1* est plus précoce et moins durable. Ces candidats *WRI-1* restent très divergents et nécessitent une étude fonctionnelle pour préciser leur rôle dans le métabolisme des lipides. Une étude transcriptomique/protéomique approfondie permettrait d'appréhender les acteurs intervenant dans le métabolisme des TAG et pourrait peut-être permettre d'esquisser un réseau de régulation plus simple que chez *C. reinhardtii* (Gargouri et al., 2017).

Partie 2 : Identification fonctionnelle des désaturases impliquées dans le refroidissement

Le degré d'insaturation des FA joue un rôle essentiel dans le maintien de la fluidité membranaire, et donc des fonctions membranaires, notamment en réponse aux changements de température (Allakhverdiev et al., 2009; Los et al., 2013) incluant le refroidissement (15°C) et le 'gel' (<0°C). La température de transition d'un acyl-lipide dépend essentiellement de la longueur et du degré d'insaturation de ses chaînes acyles : plus la chaîne acyle est insaturée et courte plus la température de transition sera basse. Lorsque la température décroît la composition lipidique des biomembranes s'adapte de telle manière à ce que sa fluidité soit globalement maintenue : c'est la réponse homeovisqueuse (Allakhverdiev et al., 2009). Cette réponse essentielle pour les organismes poïkilothermes (Hayward et al., 2014) et vitale pour les unicellulaires, fait intervenir les FA désaturases qui sont activées à basse température ; la hausse de température est accompagnée, quant à elle, d'un remplacement des FA désaturés par des FA saturés synthétisés *de novo* et par l'incorporation de protéines de stabilisation des membranes (Los et al., 2013). En réponse au froid, l'activation transcriptionnelle de FA désaturases est un mécanisme de régulation très répandu des bactéries aux animaux (Los et al., 2013). Chez les plantes, l'activation transcriptionnelle de désaturases essentielles pour la réponse au froid a également été rapportée (Barrero-Sicilia et al., 2017). L'introduction d'une seule double liaison suffit à ajuster la fluidité membranaire chez *B. subtilis*, *C. cerevisiae* et *C. elegans* alors que les FA di- et tri-énoïques interviennent dans le maintien des activités des membranes photosynthétiques (pour revues : Allakhverdiev et al., 2009; Los et al., 2013). L'implication des PUFA à haut degré d'insaturation dans la régulation de la fluidité membranaire est moins claire.

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse est de caractériser chez le phytocoeucaryote marin *O. tauri* la dynamique du glycérolipidome en condition d'abaissement de la température et le rôle des désaturases et des élongases dans les variations en PUFA. Cela s'inscrit dans l'objectif plus global qui est (i) d'étudier la dynamique des FA et la régulation du métabolisme lipidique selon des vecteurs environnementaux, et (ii) de comprendre quelles sont les cibles enzymatiques potentielles de ces régulations.

Les résultats présentés ici mettent en parallèle au cours de refroidissement l'évolution de la composition en chaînes acyles avec la réponse transcriptionnelle des désaturases et des élongases. Certaines des désaturases activées au froid ont été choisies pour réaliser une étude fonctionnelle. Leur localisation a été vérifiée chez *N. benthamiana* et elles ont été caractérisées en terme d'activité en système hétérologue

(*S. cerevisiae/N. benthamiana*) et surexprimées chez *O. tauri* en système homologue. Les résultats qui en découlent et encouragent la poursuite de l'exploration des désaturases d'*O. tauri* sont présentés ci-dessous.

1 Remodelage des glycérolipides et de leurs chaînes acyles lors du refroidissement

1.1 Impact de l'adaptation au froid sur le glycérolipidome

1.1.1 Démarche expérimentale

Afin de déterminer les différences de composition lipidique et la potentielle implication des PUFA en réponse au froid chez *O. tauri*, nous avons cherché des conditions de culture au froid qui induisent une différence de profil de FA totaux et portent le minimum de préjudice à la croissance des cellules. Dans un premier temps nous avons cherché à savoir si le refroidissement pouvait induire des changements de profils en FA sur des cellules en phase stationnaire. Ces cultures à la croissance réduite nous ont paru intéressantes pour s'affranchir des changements en FA liés à la différence de croissance entre les cultures à haute température et à basse température (longue phase stationnaire). Pour le choix des températures, nous nous sommes basés sur les expériences réalisées chez les microalgues comme *P. lutheri* (Tatsuzawa and Takizawa, 1995) et *E. huxleyi* (Kotajima et al., 2014). Nous avons choisi des températures comprises entre 10 et 32°C (la température standard chez *O. tauri* est de 20°C) avec un delta de température de 10°C. Mais le métabolisme ralenti des cellules en phase stationnaire ne donnait pas de réponse nette en termes de FA et la mortalité de ces cellules cultivées à basse ou très haute température était importante. Dans un second temps, nous avons donc réalisé le même travail préliminaire sur des cellules en croissance. Nous avons déterminé que pour s'affranchir au maximum des différences de croissance (phase de latence et taux de croissance), les températures de 14°C versus 24°C sont idéales. En effet, (i) contrairement à ce que nous observions à 12°C, à 14°C chez *O. tauri* comme chez *T. pseudonana*, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella tertiolecta* (Roleda et al., 2013), il n'y a pas de phase de latence lors de la mise en culture et les cellules à basse température possèdent un taux de croissance similaire à celles cultivées à température standard, (ii) le refroidissement de 24°C à 14°C n'induit pas de diminution significative du taux de croissance et (iii) les cellules acclimatées ou refroidies à 14°C présentent des changements reproductibles en FA par rapport aux cellules à température standard.

L'ensemble des résultats de ce long travail de mise en place des conditions d'étude a permis de réaliser néanmoins une analyse en composante principale (PCA) sur l'ensemble des profils en FA totaux des cellules (Fig. 42). La hausse du 18:5 *n*-3 que nous voyions de manière reproductible chez les cellules à

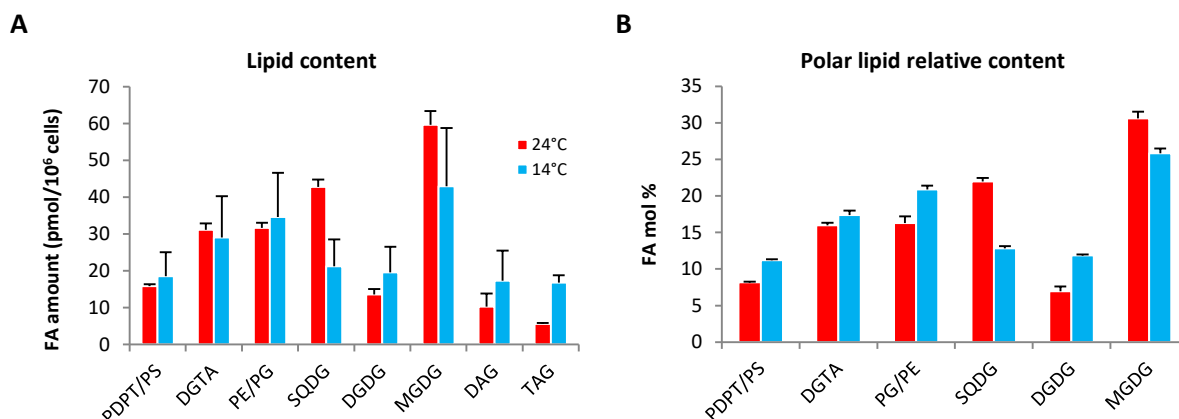


Figure 43 : Effet de la basse température de culture de cellules acclimatées sur leur contenu lipidique.
 A, Variation quantitative du contenu lipidique. B, Proportion des différentes classes de lipides structuraux. (n=3 (inoculum de départ identique), barres d'erreur = écarts-types).

Les cellules acclimatées au froid se distinguent par une augmentation de la quantité de leurs TAG et une variation de la quantité de leurs lipides plastidiaux (Fig. 43) sans variation significative de leur quantité de lipides totaux (résultats non montrés). Les variations majeures sont la diminution de la proportion du SQDG et l'augmentation de celle du DGDG, toutes deux de 45%. La légère baisse du MGDG et la hausse du DGDG engendrent une diminution du ratio MGDG/DGDG. Les phospholipides plastidiaux PG, et extraplastidiaux PDPT, augmentent tous les deux d'environ 25%. Les variations des lipides plastidiaux PG, SQDG et DGDG sont retrouvées en proportions équivalentes au cours de la carence azote (Degraeve-Guilbault et al., 2017) et indiquent un lien possible entre membranes plastidiales/thylakoïdales, réponse au froid et carence azote.

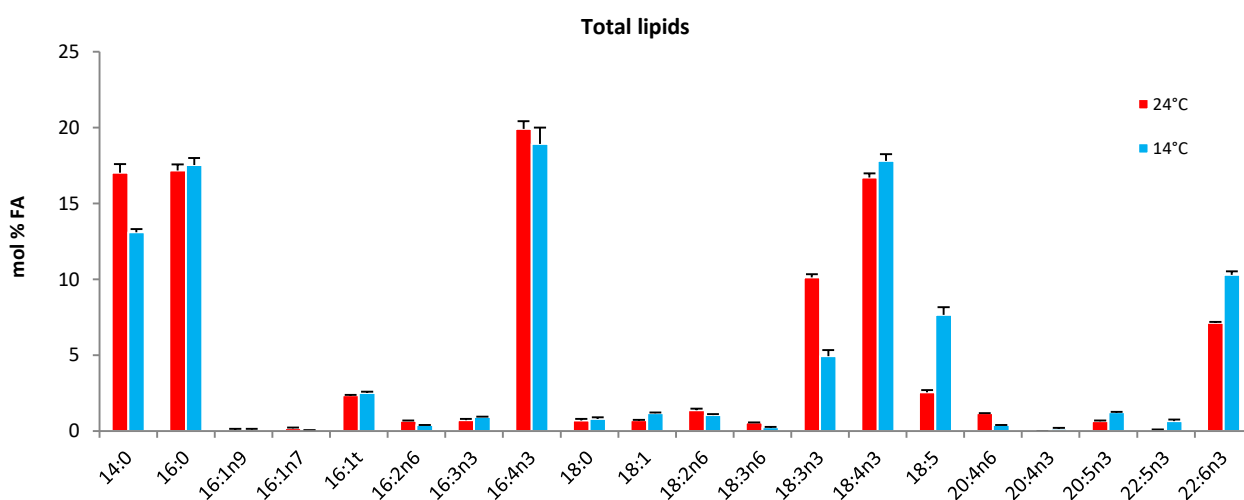


Figure 44. Effet de la basse température de culture de cellules acclimatées sur les proportions en FA de leurs glycérolipides
 La composition en lipides de ces cultures est donné figure 43. (n=3 (batch de départ identique), barres d'erreur = écart-type)

Des variations de la composition en FA des glycérolipides de ces cultures à 14°C sont observées : (i) concernant les C18 PUFA, le 18:5 augmente tandis que le 18:3 diminue, (ii) concernant les VLC-PUFA, le DHA augmente tandis que l'ARA diminue (iii) concernant les FA saturés, le 14:0 diminue (Fig. 44). Il est important de noter que dans les profils FA de cellules acclimatées à différentes températures d'autres expériences présentées en annexe 7, les variations en 14:0 et 18:5 sont retrouvées entre cellules à température standard et à basse température, tandis que la proportion de DHA reste équivalente et que le 18:3 et le 18:4 peuvent soit diminuer, soit augmenter, soit être équivalents entre les deux températures.

De manière plus détaillée, nous avons comparé la composition des lipides entre ces cellules acclimatées à 24°C et 14°C (Fig. 45) que nous avons confrontée aux glycérolipides des cellules à 12°C et 22°C d'une étude préliminaire (annexe 8). Les deux expériences indiquent les mêmes tendances : chaque classe lipidique possède un PUFA particulier qui augmente au froid. Dans les lipides plastidiaux, les basses températures engendrent une augmentation de la proportion du PUFA ω 3 le plus insaturé (indépendamment de sa longueur de chaîne) : la proportion de 18:5 est multipliée par 3 (+200%) dans le MGDG et DGDG et constitue le changement prépondérant de la réponse au froid. Dans le DGDG est également observée une moindre augmentation du 16:4. Dans le PG et le SQDG c'est le 18:4 qui augmente d'environ 50%. Au froid, la teneur du PUFA majoritaire des lipides extraplastidiaux augmente : le 16:4 n-3 pour le PDPT et le 22:6 n-3 pour le DGTA (+30%). L'augmentation d'autres précurseurs du DHA : 20:5 n-3 et 22:5 n-3, est retrouvée dans le DGTA et les TAG. L'augmentation de ces PUFA ω -3 se fait au profit des PUFA ω -6 correspondants (Fig. 42), ce qui laisse supposer l'augmentation d'une activité ω 3 désaturase. La diminution du 14:0 à basse température est très importante chez le PG et les DAG (-40%). Dans les TAG dont la quantité de tous les FA augmente (Annexe 9), sont retrouvées en termes de proportion : la baisse du 14:0, la hausse du 18:5 et la hausse des VLC-PUFA intermédiaires de la synthèse du DHA (Fig. 45).

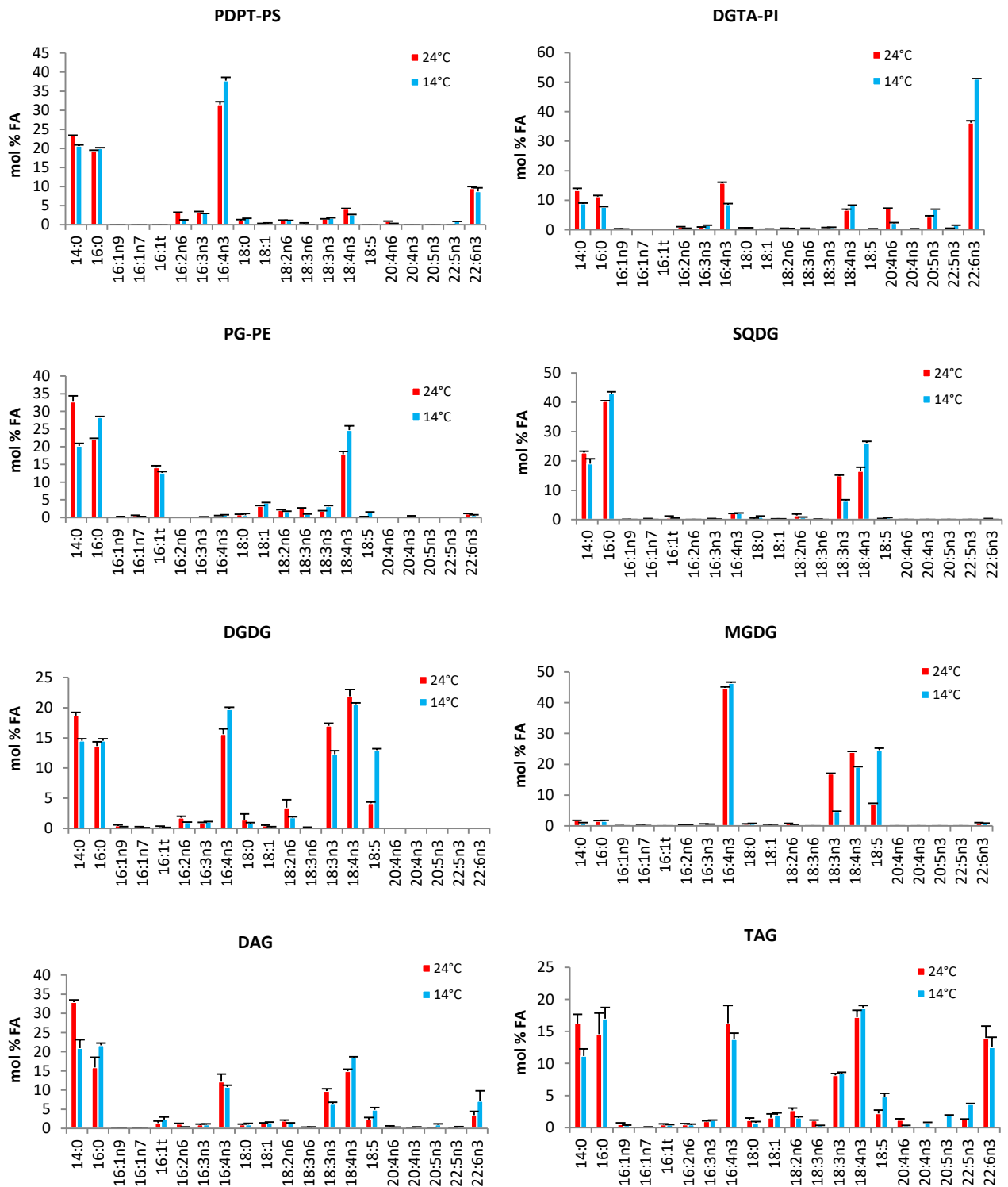


Figure 45. Effet de la basse température de culture de cellules acclimatées sur la composition en pourcentage molaire de leurs différentes classes de lipides.

La composition en lipides de ces cultures est donné figure 43 et leur profil en acides gras totaux figure 44 (n=3 (batch de départ identique), barres d'erreur = écart-type).

1.2 Cinétique des effets du refroidissement sur les FA totaux

Afin d'avoir une vision dynamique de la réponse au froid, nous avons suivi la composition en acides gras et l'expression de gènes (désaturases et élongases) à des temps précoces du refroidissement. Dans ces expériences, un Erlenmeyer de cellules en phase exponentielle, et acclimatées à la température contrôlée, est transféré à basse température. Dans nos conditions le refroidissement s'effectue en 30 min et l'évolution du profil de FA totaux de cellules refroidies est suivi à 0h ou 1h, 3h, 6h, 12h et 24h après le refroidissement et est comparée au profil FA des cellules acclimatées (à température standard et basse température).

Deux expériences de refroidissement ont été réalisées indépendamment en conditions différentes. La première en lumière continue (LL) a pu être réalisée à 12 et 22°C sans ralentissement de croissance des cellules à 12°C. Néanmoins, tout changement de l'environnement peut entraîner la synchronisation de cellules cultivées en LL ; un changement de température et/ou d'éclairement notamment est perçu comme un signal donneur de temps (Bieniawska et al., 2008). Ce recalage peut dans notre cas entraîner une synchronisation des cellules transférées à basse température, ce qui aurait pour conséquence de comparer des cellules synchronisées (entraînées par l'abaissement de température) à des cellules asynchrones (arythmiques). Lors du passage au froid en condition LL, nous avons effectivement observée une synchronisation transitoire de l'expression du gène CCA1 (pour 'circadian clock associated') contrôleur de l'horloge (résultats non montrés), grâce à la lignée rapportrice CCA1-Luc (Corellou et al., 2009). En condition jour/nuit (LD) l'oscillation du gène CCA1 est calée sur les cycles de lumière imposée ; en suivant l'oscillation du gène rapporteur *in vivo*, nous avons pu constater que le passage au froid ne décalait que peu la phase de CCA1-Luc. Ainsi, lors de la seconde expérience de refroidissement, nous avons imposé aux cellules une synchronisation importante par un rythme LD de 16h/8h afin d'éviter un recalage incontrôlé de l'horloge. Dans ces conditions LD les cellules sont refroidies 3h après le lever du jour, moment où la plupart des désaturases sont activées transcriptionnellement et où l'induction des gènes au froid est connue pour être la plus importante (Espinoza et al., 2008; Monnier et al., 2010).

Au cours d'une cinétique de 24h, les profils en FA des glycérolipides totaux des cellules acclimatées à température standard et basse température restent constants, à l'exception de variations minimales (Annexe 7). Les profils des cellules acclimatées sont équivalents en termes de teneur en 18:3 et 22:6 ce qui dénote d'avec l'expérience décrite précédemment figure 44. L'évolution du profil en FA de cellules refroidies est présenté figure 46.

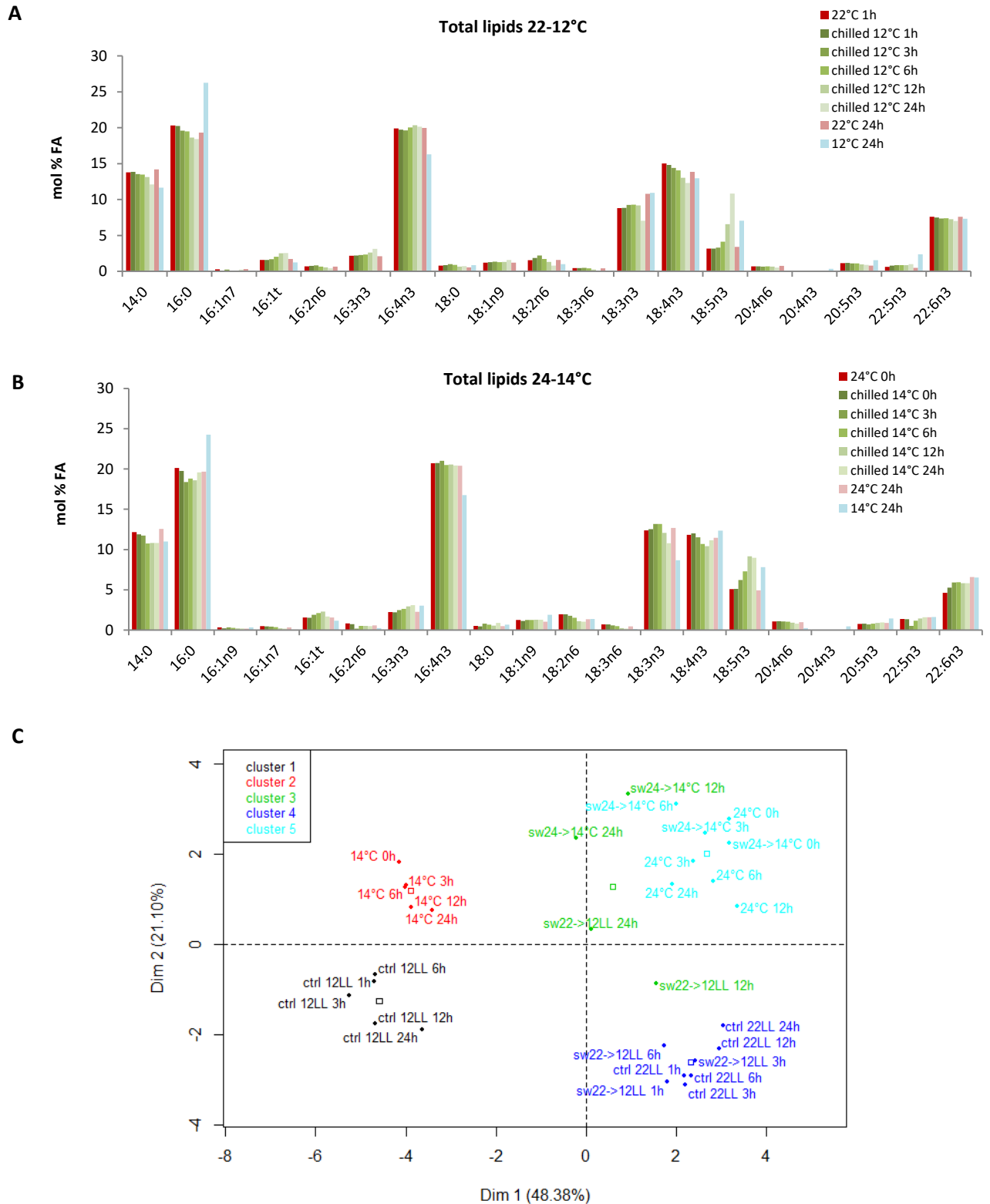


Figure 46 : Effet d'un refroidissement de 10°C sur le profil en FA totaux de cellules acclimatées à température standard.
 Le passage au froid a lieu à 0h et le refroidissement des cultures (chilled) s'opèrent en 30 min. **A**, cellules cultivées en lumière continue, les températures contrôles sont de 22°C (standard) et 12°C (basse) (n=1). **B**, cellules cultivées en jour/nuit (16h/8h), les températures contrôles sont de 24°C (standard) et 14°C (basse) (n=1). **C**, cartographie des cultures en fonction de leur profil en acides gras totaux (pourcentage molaire) lors des expériences de refroidissement A et B de cette figure. Les cellules acclimatées contrôles '24°C', '14°C' sont cultivées respectivement à 24°C et 14°C en jour/nuit (16h/8h) et les cellules acclimatées contrôles 'ctrl12LL' 'ctrl12LL' sont cultivées respectivement à 22°C et 12°C en lumière continue. Les cellules refroidies (sw) présentent leur température de départ et leur température d'arrivée. Les analyses statistiques ont été réalisées sous R.

La première modification observée chez les cellules refroidies concerne l'accroissement de la proportion de 18:5 à 6h pour les cellules en LL (Fig. 46A) et plus rapidement, dès 3h, pour les cellules en LD 16/8 (Fig. 46B). Dans un second temps, à 12h pour les cellules en LL et dès 6h pour les cellules en LD, la proportion de 14:0 décroît pour atteindre sa valeur minimale proche de la valeur contrôle basse température à 24h. Au bout de 24h les cellules refroidies présentent donc un profil intermédiaire entre les cellules acclimatées à basse température par l'ajustement de leurs proportions en 18:5 et 14:0, et les cellules acclimatées à la température de départ avec des proportions en 16:0 et 16:4 similaires (Fig. 46C). Une observation plus longue sur 120h en LL, ne montre pas d'autres changements que ceux intervenants en 24h (Annexe 10)

Discussion

Au froid, l'augmentation de la proportion de TAG chez des cellules d'*O. tauri* acclimatées (x3) sans modification significative de la quantité de lipides totaux est également observée chez *T. pseudonana* (x2), *Odontella aurita* (x2), lorsqu'elles sont cultivées à 10°C (température standard 20°C) (Roleda et al., 2013) et semble être une réponse assez commune chez les microalgues. La diminution du MGDG observée chez *O. tauri* est également très souvent rapportée chez de nombreux organismes comme la microalgue *P. lutheri* (Tatsuzawa and Takizawa, 1995) et les plantes : *A. thaliana* et le riz (Degenkolbe et al., 2012; Moellering et al., 2010). Chez *O. tauri* cette diminution du MGDG est concomitante à une hausse du DGDG ce qui accentue l'augmentation du ratio DGDG/MGDG. La modulation de ce ratio est connue comme ayant lieu en réponse à de nombreux stress abiotiques chez les plantes incluant la sécheresse (Gigon et al., 2004; Torres-Franklin et al., 2007) et les variations de température. Chez *A. thaliana*, en réponse à des températures proches du gel, le MGDG diminue au profit de la formation du DGDG et de TAG via l'activité de la GGGT (Introduction, §4.2.2.1). Chez *O. tauri* il est peu probable que ce genre de mécanisme intervienne car (i) les mécanismes dépendants la GGGT décrits chez les plantes sont impliqués dans la réponse au gel mais n'affectent pas la régulation des processus d'acclimatation au froid (Fourrier et al., 2008; Thorlby et al., 2004) (ii) aucune activité GGGT n'a été démontrée chez les microalgues et (iii) le gène d'*O. tauri* possédant le plus d'homologie avec *SFR2*, le gène qui code la GGGT chez les plantes, reste cependant éloigné. Il est intéressant de noter que le ratio MGDG/DGDG est modifié dans la même tendance également en réponse aux fortes températures, chez les plantes (Chen et al., 2006) et chez la microalgue verte *C. reinhardtii* (Légeret et al., 2016). Les variations des autres lipides plastidiaux observées chez *O. tauri* ne sont pas unanimement rapportées. La diminution du SQDG qui constitue la plus grande modification chez *O. tauri* en réponse au froid est inversée chez *P. lutheri* où la proportion de SQDG double à une température de croissance de 10°C (par rapport à une température de croissance contrôle de 25°C) (Tatsuzawa and Takizawa, 1995). Par contre une élévation de température de 22°C (température standard) à 38°C chez la cyanobactérie *Anacystis nidulans* provoque une augmentation de la proportion de SQDG, ce qui est comparable à la différence

observée entre 14°C et 24°C chez *O. tauri* (Sato et al., 1979). L'augmentation du PG au froid est retrouvée chez *P. lutheri* à une température de croissance de 10°C (par rapport à une température de croissance contrôle de 25°C) tandis qu'une diminution est observée chez *A. thaliana* (-6°C) et chez le riz (10°C) (Chen et al., 2006). Il a été montré que la diminution d'insaturation en *cis* dans le PG au profit d'acides gras saturés et monoinsaturés en *trans*, engendre une sensibilité au refroidissement (Sakamoto et al., 2004). Il est possible que la modification de la teneur en PG dépende de son contenu en chaînes acyles ; notons que chez *O. tauri*, on observe un abaissement de la saturation du PG. Une réelle diversité est observée dans les modifications des proportions des lipides plastidiaux en réponse au froid ; il est possible qu'elles soient liées à la composition en chaînes acyles de ces lipides. L'abaissement de la température a également pour conséquence l'augmentation de lipides polaires extraplastidiaux tels que les BL chez *P. lutheri* (Tatsuzawa and Takizawa, 1995) ou la PC chez *N. laevis* (à 15° et 19°C par rapport à 23°C) (Chen et al., 2008). Chez *O. tauri*, seule l'augmentation du PDPT est notable parmi les lipides extraplastidiaux

Les cellules d'*O. tauri* acclimatées aux basses températures (contrôle froid) sont caractérisées par la diminution de leur contenu en 14:0, 18:3 et de l'augmentation en 18:5 et 22:6, ce qui leur confère une augmentation globale de leur degré d'insaturation. Ce phénomène a largement été décrit notamment chez les cyanobactéries (Allakhverdiev et al., 2009) et est par exemple retrouvé chez d'autres microalgues comme *Navicula* (UMAC 231) et différentes *Chlorella* (UMAC 237 et UMAC 234) qui ajustent leur contenu en acides gras saturés et/ou monoinsaturés et/ou polyinsaturés afin de posséder un profil plus insaturés à 9°C qu'à 20°C (Teoh et al., 2004) ou chez *Chlamydomonas* sp. ICE-L entre 0°C et 15°C (An et al., 2013). Chez *O. tauri*, l'augmentation du 18:5 *n*-3 est la réponse la plus précoce qui survient dès 3h après le début du refroidissement. Ce type de réponse a déjà été décrite chez *E. huxleyi* qui, 24h après son transfert de 25°C à 10°C, accumule du 18:5 graduellement (Kotajima et al., 2014). Ce changement est concomitant à une diminution en 18:4 *n*-3 et une accumulation de 18:1 *n*-9 et de 18:3 *n*-3. Chez *E. huxleyi* les galactolipides à 18:5 correspondent aux espèces 18:4/18:5 18:5/18:5 et le DGDG 14:0/18:5 dont le précurseur potentiel détecté est le DGDG 14:0/18:4 ; les espèces de galactolipides contenant du 18:3 ne sont pas rapportés (Fulton, 2014) il semble donc que l'augmentation de 18:5 dans les galactolipides en réponse au froid dépende de la conversion des espèces 18:4. Chez le dinoflagellé d'eau douce froide *Borghiella dodgei*, ce sont les espèces di-18:5 de galactolipides qui sont plus élevées à 3 et 5°C qu'à 7°C (Flaim et al., 2012). Chez *O. tauri*, les galactolipides en 18:5 sont majoritairement les espèces 18:5/16:4 (18:5/16:0 et 18:5/14:0 très minoritaires). L'augmentation du 18:5 résulte donc vraisemblablement de la conversion des espèces 18:3/16:4 et 18:4/16:4 qui serait responsable de la baisse du 18:3 et 18:4 des galactolipides ; ceci suggère un lien de type substrats/produits dans les espèces de galactolipides (18:3, 18:4 et 18:5) et donc l'existence d'une désaturase qui agit en Δ^3 du 18:4. Par ailleurs on observe de manière plus discrète une augmentation des espèces 18:4 au détriment des espèces

18:3 dans le PG et le SQDG, ce qui peut suggérer l'activation d'une activité $\Delta 6$ désaturase. Les variations totale de 18:3 et de 18:4 ne sont statistiquement pas reliées à la température contrairement à celles concernant le 18:5 (comme évoqué précédemment). Néanmoins, nous savons qu'il existe une régulation fine du ratio 18:3 $n-3$ et 18:4 $n-3$ au cours de la croissance et nette en carence nutritive ; la superposition de deux tendances inverses sur les espèces 18:3, 18:4 des lipides plastidiaux peut probablement masquer l'effet spécifiquement dû au changement de température. De la même manière, on observe bien à long terme sur des cellules acclimatées à basse température l'augmentation du DHA dans le DGTA et sa baisse dans les TAG. Ce changement subtil n'a pas été décelé de la même manière dans les expériences exploratoires. Le DHA varie sensiblement au cours de la croissance et la dynamique des VLC-PUFA en carence indique que le flux vers les TAG est régulé pour maintenir un niveau stable dans les lipides structuraux. Il est possible que pour une acclimatation longue à des températures fraîches, le flux de DHA vers les TAG soit inhibé afin d'augmenter sensiblement sa teneur dans le DGTA. Il faut néanmoins être vigilant par rapport à des effets qui ne seraient pas directement reliés aux différences de température mais qui seraient dus à une croissance plus ou moins longue (une phase stationnaire atteinte plus tardivement à une concentration de cellule plus élevée observés également chez *C. reinhardtii* (Hema et al., 2007; Valledor et al., 2013)) et/ou à la plus forte irradiance liée au plus faible auto-ombrage des cellules.

2 Identification des désaturases impliquées dans la réponse au refroidissement

2.1 Identification *in silico* et phylogénie des désaturases présentes chez *O. tauri* : données génomiques

La hausse précoce de la proportion de 18:5 pose la question de l'activation d'une désaturase $\Delta 3$ putative ou d'une autre désaturase capable d'alimenter la voie de biosynthèse vers la formation de cet acide gras unique. Les séquences des désaturases d'*O. tauri* ont été analysées *in silico* afin de prédire leur spécificité et leur localisation subcellulaire.

Grâce aux deux séquençages du génome d'*O. tauri* en 2006 (Derelle et al., 2006) et en 2014 (Blanc-Mathieu et al., 2014), ainsi qu'à des données RNAseq récentes (Botebol et al., 2017) utilisée pour effectuer une nouvelle contiguation (V. Arondel), nous avons pu obtenir des données relativement complètes concernant les séquences de désaturases présentes chez *O. tauri*. Le croisement de ces données nous a permis d'éliminer les séquences doubles et artéfactuelles. Par blast des séquences nucléotidiques et protéiques prédites, nous avons pu annoter les fonctions putatives de ces désaturases et les regrouper par famille. Cependant, certaines difficultés se sont présentées concernant l'obtention

de la totalité des séquences codantes. Tout d'abord, certaines séquences semblaient incomplètes dont certaines en partie 5' (parfois sans méthionine de départ). La lecture du génome en amont de ces séquences a permis de retrouver la/les méthionine(s) manquante(s) (Met) car certaines séquences possédaient plusieurs méthionines de départ possibles. Dans ce cas, chaque Met a dû être testée par amplification PCR sur ADNc afin d'identifier celle correspondante au codon 'start'. D'autres séquences possédaient un vide dans le séquençage indiqué par 'X_n', ces vides pouvant dus à un problème de séquençage des zones riches en GC. Ces vides peuvent complexifier le contigage et être à l'origine d'un mauvais assemble de cette partie du génome. Lorsque ces vides étaient seulement dû à un problème de séquençage, nous avons pu les combler par amplification en PCR avec des amorces flaquant les bases manquantes. Lorsque ces vides étaient liés à une mauvaise contigation, nous n'avons pas pu les amplifier et ces séquences nécessitent d'être traitées par amplification rapide d'extrémités de ADNc par PCR (RACE PCR pour 'rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction'). Par manque de temps la prise en charge de ces séquences n'a pu être réalisée dans le cadre de ma thèse mais sera traitée ultérieurement.

Le génome minimal d'*O. tauri* possède 14 désaturases, sans compter celle identifiée comme homologue de FAD4 qui se rapproche des ubiquitine ligases (Gao et al., 2009). Par rapport à sa grande diversité en FA, c'est un nombre relativement faible de gènes (17 pour *A. thaliana* (Dolch and Maréchal, 2015), 13 pour *C. reinhardtii* (Li-Beisson et al., 2015) et 11 ou 12 pour *P. tricornutum* (Dolch and Maréchal, 2015)) qui suggère une faible redondance de gènes et qui valide à nouveau l'intérêt de ce modèle pour l'étude des voies complexes de biosynthèse des (V)LC-PUFA. L'arbre phylogénétique de la figure 47 permet de les replacer dans les familles de désaturases présentées dans l'introduction et les caractéristiques des séquences de désaturases d'*O. tauri* sont présentées dans le tableau 12.

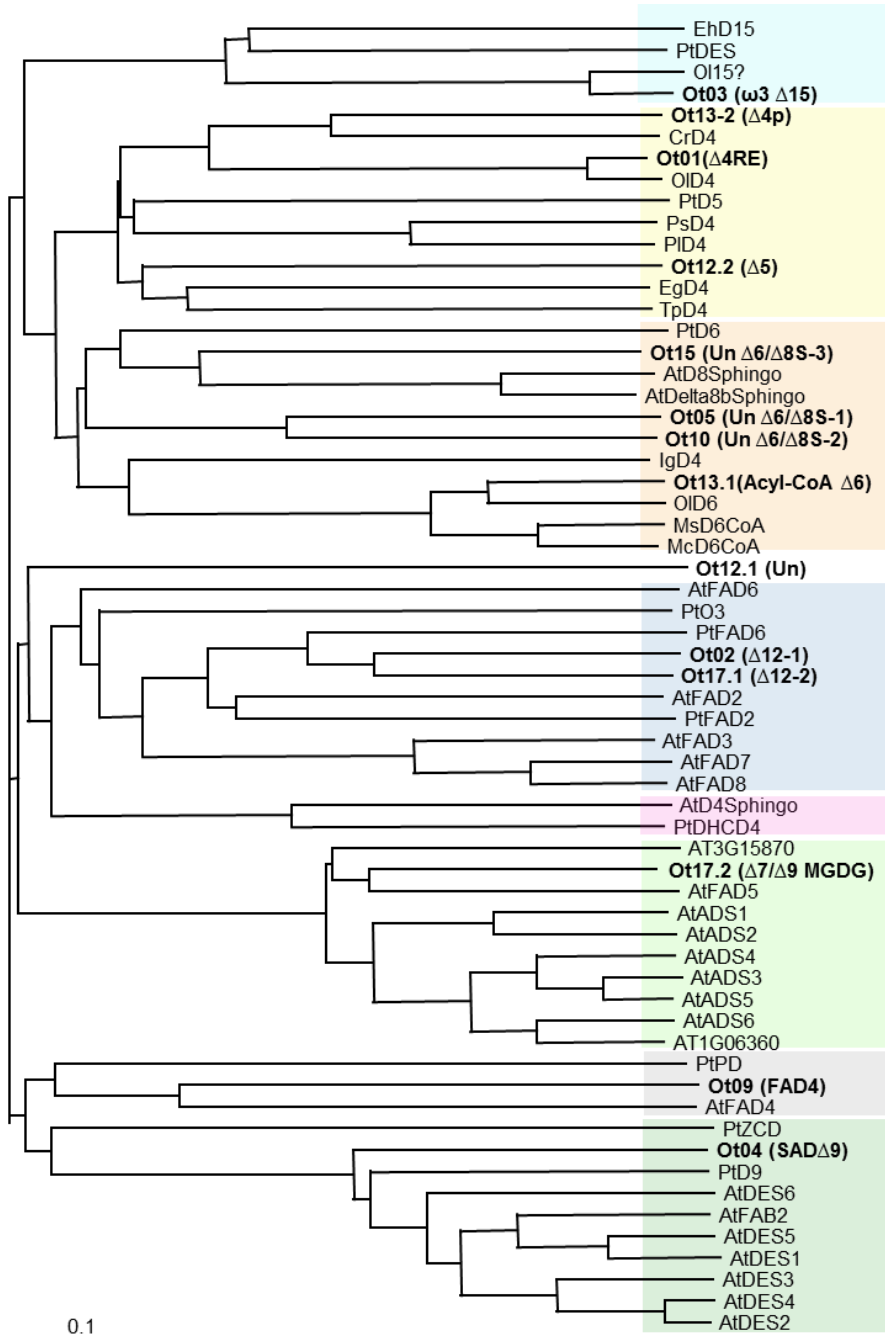


Figure 47 : Arbre phylogénétique positionnant les désaturases d'*O. tauri* (Ot) parmi celles d'*Arabidopsis thaliana* (At), *O. lucimarinus* (Ol), *Phaeodactylum tricorutum* (Pt), *Micromonas commoda* (Mc), *Mantoniella squamata* (Mi), *Thalassiosira pseudonana* (Tp), *Euglenas gracilis* (Eg), *Emiliania huxleyi* (Eh), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Pavlovas lutheri* (Pl), *Pavlova salina* (Ps).

En vert, les 'first' désaturases ; acyl-ACP désaturases (vert foncé) et first désaturases membranaires (vert clair)

En jaune/orange : 'front-end' désaturases : $\Delta 4$ et $\Delta 5$ - désaturases (jaune) et $\Delta 6$ -FA et $\Delta 8$ -sphingolipides désaturases (orange).

En bleu, les omega désaturases : $\Delta 12$ désaturases (bleu foncé) et $\Delta 15$ désaturases (bleu clair).

En rose : les $\Delta 4$ sphingolipide désaturases.

En gris : les FAD4 responsables du $16:1^{\Delta 3 trans}$ du PG.

Les alignements en aa (ClustalX) et l'arbre phylogénétique (Tree View) ont été réalisés par F. Domergue.

Tableau 12 : Présentation des désaturases d'*O. tauri* et des caractéristiques de leurs séquences nucléotidiques.

a: séquence 5' incluse (avant un gap de séquençage) a un score chloroplastidial (CS) de 2,32
b: séquence 5' incluse (plus 16 aa) à partir d'une méthionine en amont en phase a un CS de 2,51
c: l'accession la plus récente (OT_ostta03g03040) est plus courte de 76 aa
d: l'accession la plus récente (OT_ostta05g00100) est partielle (429 aa CS 2,23); la séquence complète provient de la contiguation de données RNAseq issu du projet PRJNA304086.
e: l'accession (OT_ostta10g02580) est partielle (gap, 459aa CS 0); la séquence complète provient de la contiguation de données RNAseq issu du projet PRJNA304086.
f: l'accession la plus récente (OT_ostta15g01140) est partielle (CS 1.71) et comprenait un gap de séquençage qui a pu être comblé par PCR. Elle a pu être amplifiée à partir du cDNA.
g: l'accession la plus récente (OT_ostta01g00780) est partielle sans méthionine et avec un gap de séquençage en 5' (384 aa CS 0); la séquence complète provient de la contiguation de données RNAseq issu du projet PRJNA304086. Elle a pu être amplifiée à partir du cDNA.

L'analyse de ces séquences (Blast X/P) et le travail de contigage ont été réalisés par F. Corellou.

Putative function	Code	Accession	Length (aa)	CS (max 5)	Signal peptide (aa)	Domains
SAD	Ot04	OT_ostta04g03510	393	2,03	19	Acyl ACP Des
$\Delta 7$ MGDG ^a	Ot17.2	OT_ostta17g02010	262	0		FAD
$\Delta 12-1$	Ot02	OT_ostta02g05510	442	3,76	38	FAD
$\Delta 12-2^b$	Ot17.1	OT_ostta17g01930	442	1,44	55	FAD
$\Delta 4p$	Ot13.2	OT_ostta13g01550	518	3,04	51	CYTB5 FAD
$\omega 3\Delta 15^c$	Ot03	Ot03g03040	491	4,53	56	FAD
$\Delta 6$ AcylCoA	Ot13.1	OT_ostta13g01040	456	0		CYTB5 FAD
Un $\Delta 6/\Delta 8-1^d$	Ot05	Ot05-LBM	479	2,89	62	CYTB5 FAD
Un $\Delta 6/\Delta 8-2^e$	Ot10	Ot10-LBM	500	1,98	15	CYTB5 FAD
Un $\Delta 6/\Delta 8-3^f$	Ot15	Ot15-LBM	538	3,11	42	CYTB5 FAD
Un	Ot12.1	OT_ostta12g01890	389	0		FAD
D5	Ot12.2	OT_ostta12g02740	394	2,42	26	CYTB5 FAD
D4 ^g	Ot01	Ot01-LBM	488	2,31	77	FAD

Trois désaturases ont été caractérisées chez le genre *Ostreococcus* : AcylCoA $\Delta 6$ désaturases (Ot13) du RE d'*O.tauri* (Domergue et al., 2005), la $\Delta 5$ du RE de *O. tauri* (Ot12.2) et *O. lucimarinus* (Tavares et al., 2011) et une $\Delta 4$ du RE d'*O. lucimarinus* (Ahmann et al., 2011) homologue de Ot01. Par homologie de séquence, il semblerait qu'il y a ait une désaturases de chaque spécificité, hormis deux putatives $\Delta 12$ et trois désaturases soit $\Delta 6$ lipide-désaturase soit $\Delta 8$ sphingolipide-désaturase. En effet ces deux types de désaturases, $\Delta 6$ lipide- et $\Delta 8$ sphingolipide-, partagent une forte homologie de séquence ; chez le cassis, une zone d'une centaine d'aa en C-terminal de la désaturases permet de distinguer un céramide (substrat de $\Delta 8$ sphingolipide-désaturase) d'un acyle-PC (substrat de $\Delta 6$ lipide-désaturase) (Song et al., 2014). Une désaturase sans fonction identifiée (OtUn) se distingue de tous les clades formé par les différentes familles de désaturases et se rapproche potentiellement des $\Delta 4$ sphingolipide-désaturases (Fig. 47).

La plupart des enzymes sont prédites comme étant plastidiales d'après l'analyse de leur séquence par PredAlgo (Tardif et al., 2012) (Tab. 12). Seules l'acylCoA $\Delta 6$ désaturase fonctionnelle chez la levure ne possède pas de séquence de transit au chloroplaste (Domergue et al., 2005) et la désaturase inconnue

OtUn sont prédites comme localisant dans le RE. Etonnamment, la $\Delta 4$ (Ot01) et la $\Delta 5$ (Ot12.2) intervenant dans la voie de synthèse du DHA possèdent un bon score de prédiction plastidiale. L'analyse *in silico* révèle que six des désaturases d'*O. tauri* possèdent un domaine Cytb5 fusionné soit entier soit partiel, phénomène peu fréquent (Napier et al., 2003). Etonnamment cinq d'entre elles sont prédites plastidiales alors que le Cytb5 est l'accepteur d'électron des enzymes microsomales et qu'à l'heure actuelle, seule la Δ plastidiale de chez *C. reinhardtii* possède un Cytb5 fusionné (Zauner et al., 2012). Les prédictions de localisation nécessitent donc d'être vérifiées pour aller plus loin dans la caractérisation de ces désaturases.

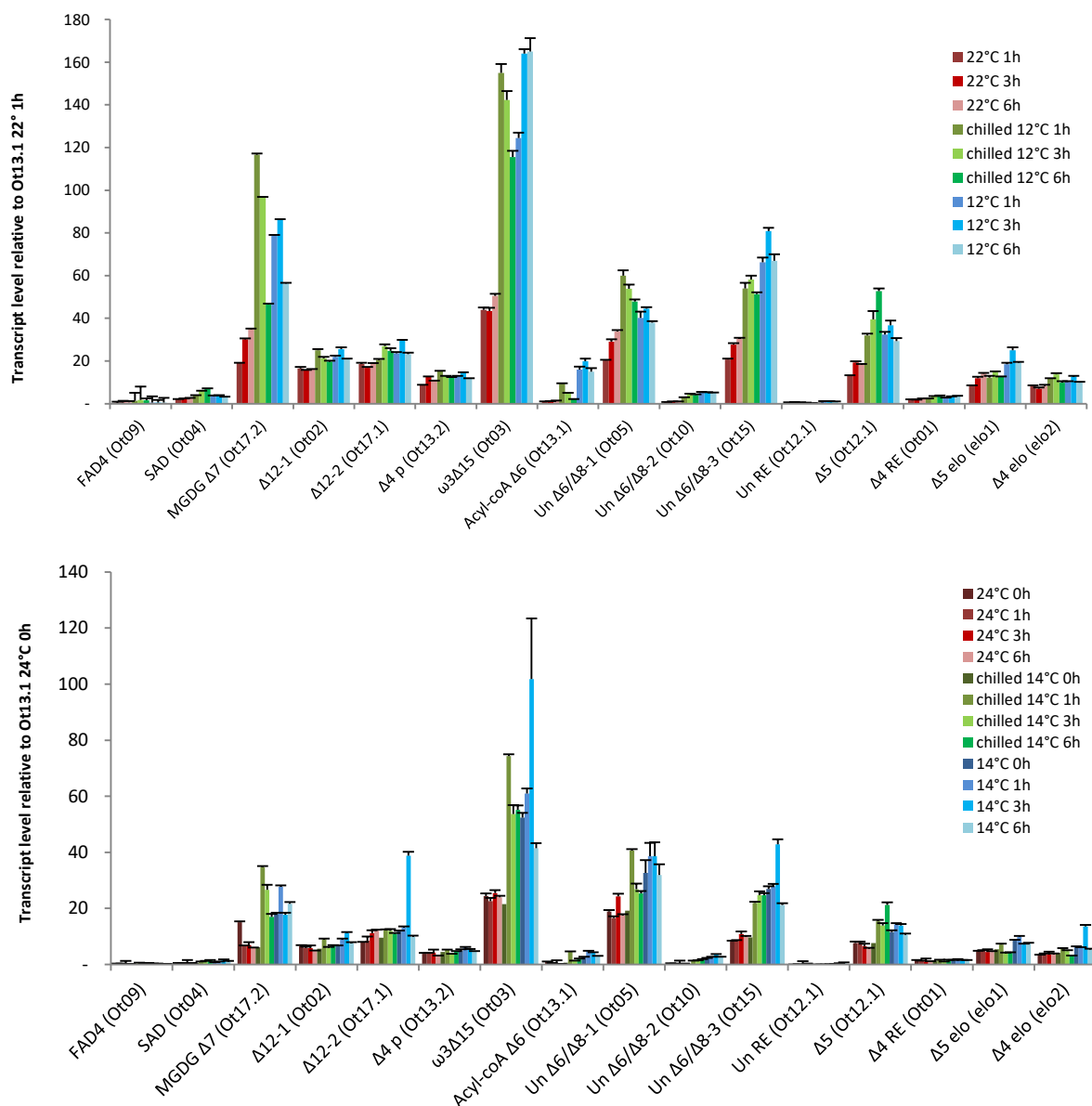
2.2 Réponse transcriptionnelle des gènes de biosynthèse des PUFA au cours du refroidissement

Afin d'identifier la désaturase responsable de la hausse du 18:5 en réponse au refroidissement, les cultures qui ont servi à réaliser la cinétique du profil en FA totaux présentée figure 46, ont également été suivies pour l'expression de leurs gènes responsables *in fine* de la synthèse des désaturases et des élongases.

En conditions LD (16h/8h), le refroidissement a eu lieu trois heures après le lever du jour, ce qui correspond au moment où les gènes des désaturases sont induits et nous espérons qu'ils puissent répondre transcriptionnellement à l'abaissement de température à ce moment du cycle. Sans tenir compte du point aberrant contrôle 14°C 3h dans l'expérience conduite en LD, les études réalisées en LL et LD sont cohérentes et présentent globalement des profils d'expression similaires.

Huit désaturases sont fortement exprimées chez le contrôle standard à 22/24°C : $\omega 3\Delta 15$, MGDG $\Delta 7$, $\Delta 6/\Delta 8-1$, $\Delta 6/\Delta 8-3$, $\Delta 5$, $\Delta 12-1$, $\Delta 12-2$, $\Delta 4$ plastidiale désaturases avec un niveau d'expression normalisée supérieur à 10 en LL (voir légende de la figure 48). Chez les contrôles froid 12/14°C par rapport au contrôle à température standard, ces désaturases restent exprimées majoritairement les $\omega 3\Delta 15$, MGDG $\Delta 7$, $\Delta 6/\Delta 8-1$, $\Delta 6/\Delta 8-3$, $\Delta 5$ désaturases cinq voient leur expression multiplié par deux (0h ou 1h du contrôle standard versus 0h ou 1h du contrôle basse température) (Fig. 48) Au froid, la $\omega 3\Delta 15$ est la désaturase majoritairement exprimée.

La normalisation des niveaux d'expression de chaque gène par rapport à sa propre expression en conditions contrôle (24°C) au point de départ (0h) comme présenté figure 49, permet d'estimer l'augmentation de l'expression des désaturases, notamment de celles faiblement exprimées et qui n'étaient donc pas forcément visibles sur la figure 48. Nous ne nous expliquons cependant pas la forte augmentation de l'expression des désaturases acyl-CoA $\Delta 6$ et Un RE dans les contrôles froid respectivement en condition LL et LD.



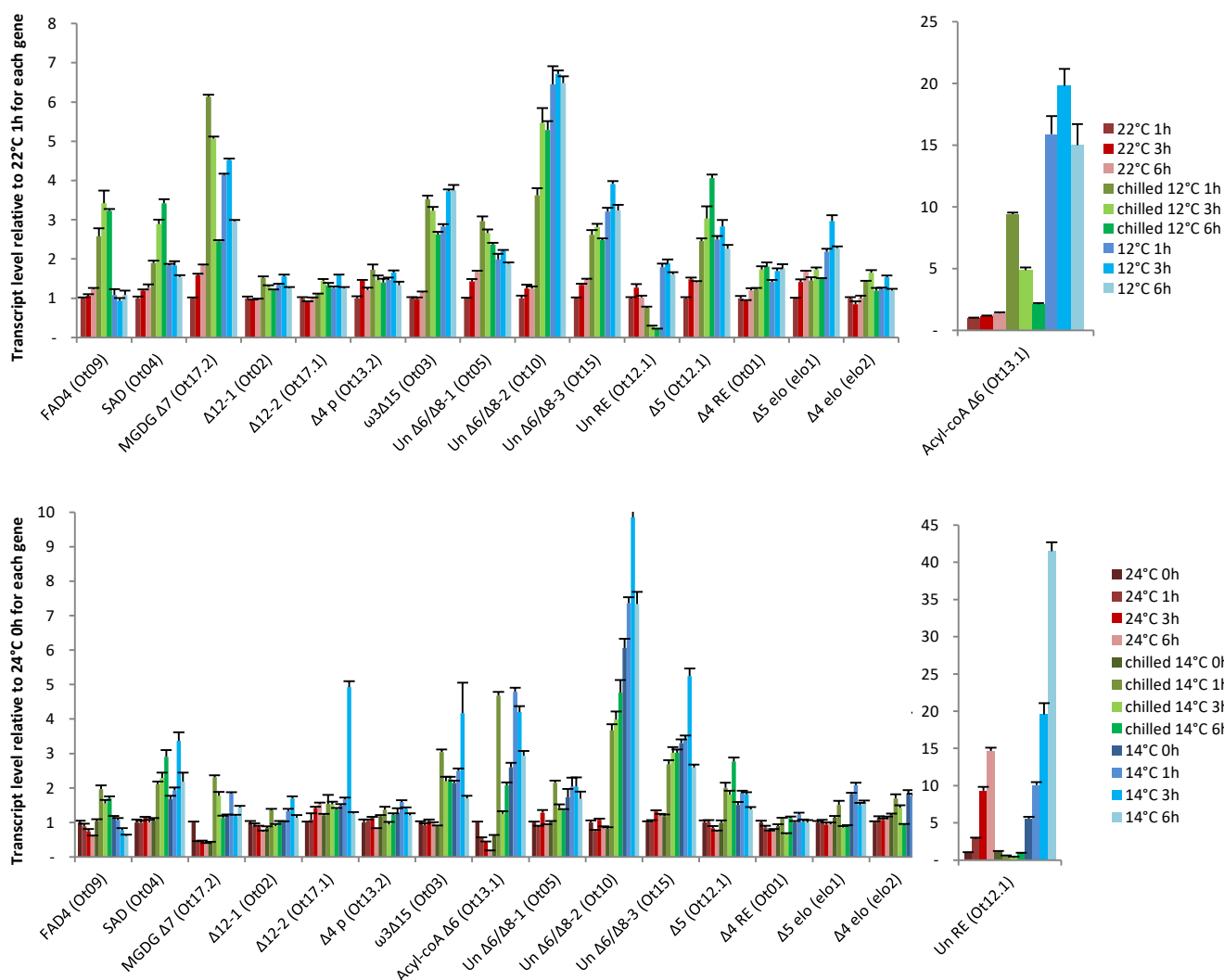


Figure 49 : Réponse transcriptionnelle des désaturases et des élongases au cours du refroidissement.

A. Cultures cultivées en lumière continue, refroidies à t0 de 22°C à 12°C comparée aux cultures acclimatées à 12 et 22°C. Les niveaux d'expression ont été normalisés par la moyenne de gènes de ménages choisis à l'aide de NormFinder (*EF1α* et *ARP2*) et sont exprimés de manière relative à l'expression de chaque gène en conditions contrôle (22°C) au point de départ (1h).

B. Cultures cultivées en jour nuit (16:8), refroidies à 3 heures après le début du jour (0h) de 24°C à 14°C comparée aux cultures acclimatées à 14 et 24°C. Les niveaux d'expression ont été normalisés par la moyenne de gènes de ménages choisis à l'aide de NormFinder (*EF1α*, *ARP2* et *COX2*) et sont exprimés de manière relative à l'expression de chaque gène en conditions contrôle (24°C) au point de départ (0h).

Parmi les désaturases majoritairement exprimées, cinq voient leur expression augmenter lors du refroidissement dès 1h et sont retrouvées fortement exprimées dans les cellules contrôle basse température : $\omega 3\Delta 15$, MGDG $\Delta 7$, $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-3$, $\Delta 5$ auxquelles s'ajoute la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et la SAD. La transcription de l' $\omega 3\Delta 15$ a déjà été observée comme répondant positivement à la baisse de la température chez *E. huxleyi* (Kotajima et al., 2014) et de manière plus générale l'expression des $\omega 3$ -désaturases est activée par le froid chez les microalgues comme *Chlamydomonas* sp. ICE-L (Valledor et al., 2013; Zhang et al., 2011) ou chez les végétaux supérieurs comme *A. thaliana* où la transcription du gène de FAD8, $\omega 3$ désaturase homologue de FAD7, a été montrée comme induite par le refroidissement (Gibson et al., 1994; McConn et al., 1994) mais également comme la tomate ou le coton

(Nosenko et al., 2016; Yurchenko et al., 2014). Chez *O. tauri*, les trois $\Delta 6/\Delta 8S$ désaturases sont surexprimées alors que chez *Chlamydomonas* sp. ICE-L, l'expression de la $\Delta 6$ désaturase est intensifiée avec l'augmentation de la température (An et al., 2013). Mais contrairement à *O. tauri*, *Chlamydomonas* sp. ICE-L ne possède pas de 18:4 n-3, sa $\Delta 6$ désaturase est uniquement responsable de la formation du 18:3 n-6 qui sert ensuite de substrat à la synthèse du 20:3 n-6. Chez *O. tauri* les acides gras en ω -6 sont peu présents et il est possible que la synthèse du 18:5 n-3 nécessite l'activation de la voie fournissant son substrat le 18:4 n-3. L'augmentation de la transcription de la SAD en réponse au froid, surtout en LD chez *O. tauri*, a déjà été observée chez *C. reinhardtii* (An et al., 2013) et chez *Chlamydomonas* sp. ICE-L (Valledor et al., 2013). Il est intéressant d'observer une augmentation de la transcription de la $\Delta 5$ désaturase impliquée dans la synthèse du 20:5 n-3 qui augmente au froid, mais pas de la $\Delta 5$ désaturase pouvant expliquer la potentielle non réponse du DHA à l'abaissement de température

Chez *O. tauri*, une non-activation des gènes codant les $\Delta 12$ désaturases en réponse au froid est observée comme chez *C. reinhardtii* (An et al., 2013), mais également une non-activation de la $\Delta 4$ plastidiale. La désaturase inconnue du RE (Un Ot12.1) est la seule dont l'expression du gène est réduite à basse température mais il a été montré que le froid peut également agir négativement sur la régulation transcriptionnelle des désaturases (Feng et al., 2017; Yurchenko et al., 2014).

Discussion

La modification des FA en réponse au froid passe préférentiellement par l'activation transcriptionnelle des gènes de désaturases, même si cette activation peut coexister avec des phénomènes d'augmentation de la stabilité des ARNm (Nakashima et al., 1996) et de régulations post-traductionnelles (Tiku et al., 1996). Dans le but d'identifier la $\Delta 3$ désaturase putative responsable de l'augmentation du 18:5 au froid, nous avons choisis de caractériser en priorité fonctionnellement les trois $\Delta 6/\Delta 8S$ inconnues car :

- (i) leur fonction est inconnue et ne présente pas de forte homologie avec des désaturases déjà caractérisées, contrairement à la $\omega 3\Delta 15$ désaturase qui n'a pas été caractérisée en tant que responsable de la synthèse du 18 :5 chez *E huxleyi* (Kotajima et al., 2014) ;
- (ii) elles sont prédites plastidiales et le 18:5 est uniquement localisé au niveau des galactolipides, du MGDG principalement ;
- (ii) la transcription de leur gènes est activée rapidement dès le premier point post-refroidissement de chaque expérience (1h en LL et 3h en LD 16h/8h) et nous avons vu que la hausse du 18 :5 lors du refroidissement est la modification en acides gras la précoce ;
- (ii) l'activation de leurs gènes fait partie des plus importantes lors de la réponse au froid (x3 à x7) avec l'activation des gènes de la MGDG $\Delta 7$ et $\omega 3\Delta 15$ désaturase
- (iii) l'activation de leur transcription est maintenu au cours du refroidissement à contrario de la MGDG $\Delta 7$ désaturase

- (ii) la transcription de leurs gènes est plus importante chez le contrôle basse température (qui possède une hausse de 18:5 par rapport au contrôle à température standard)

3 Caractérisation fonctionnelle des désaturases impliquées dans la gestion des PUFA en C18 : découverte de deux nouvelles $\Delta 6$ désaturases plastidiales

Les acides gras en C18 correspondent à l'entrée des voies responsables de la biosynthèse des LC-PUFA. La teneur des C18 n -3 chez *O. tauri* est finement régulée en réponse aux variations de l'environnement : augmentation du ratio ALA/SDA lors de la carence nutritive (Degraeve-Guilbault et al., 2017) et augmentation de la teneur en 18:5 lors du refroidissement (Résultats et Discussion, §2.2). L'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase et les $\Delta 6/\Delta 8$ S désaturases dont l'activation transcriptionnelle au cours du refroidissement est avérée, sont potentiellement responsables du contrôle de ce pool de FA. Comme mentionné précédemment, nous avons choisi d'étudier ces désaturases d'une part en précisant leur localisation subcellulaire en système hétérologue *N. benthamina* et d'autre part en caractérisant leur activité en systèmes homologue (*O. tauri*) et hétérologue (*N. benthamiana* et *S. cerevisiae*). Les résultats présentés ici sont préliminaires et nécessitent d'être précisés quantitativement par des répétitions supplémentaires et affinés par des expériences complémentaires, notamment sur leur spécificité de substrats. Ces expériences mettent en évidence deux $\Delta 6$ désaturases plastidiales chez *O. tauri* ce qui correspond à une découverte tout à fait originale dans le règne végétal.

3.1 Etude de la localisation subcellulaire

La localisation subcellulaire des désaturases été observée par expression transitoire de leur séquence codante directe (SCD) fusionnée en C-terminal à une protéine fluorescente YFP (pour 'yellow fluorescent protein') dans les feuilles de *N. benthamiana*. Cette approche d'expression transitoire dans le système hétérologue *Nicotiana* a été employée pour localiser des protéines de micro et macroalgues vertes dans différents compartiments cellulaires (Hoepflinger et al., 2015; Siegler et al., 2017) ainsi que des désaturases d'*A. thaliana* (Gao et al., 2009; Smith et al., 2013). Le système d'import dans le chloroplaste, qui repose sur un complexe de 11 à 12 éléments Tic/Toc, protéine de traversée de la membrane externe/interne du chloroplaste (pour 'translocons of the outer/inner membrane of chloroplaste'), est assez bien conservé dans la lignée verte (Kalanon and McFadden, 2008). *O. tauri* ne possède pas les protéines Tic22 et Tic62 présentes chez la plupart des plantes vasculaires, mais au contraire de *C. reinhardtii*, il possède un homologue de Toc64, une protéine qui lie les chaperonnes essentielles à la translocation des protéines dans le chloroplaste. Aussi, bien que les peptides de transit

soient divergents entre les plantes et les microalgues (Patron and Waller, 2007), les succès de localisation de protéines hétérologues issues d'algues (vertes) nous ont encouragé à tenter la localisation des désaturases d'*O. tauri* chez *N. benthamiana*. Les $\Delta 15$ désaturases d'*E. huxleyi* (Kotajima et al., 2014) et d'*O. tauri* (I. Suzuki, communication personnelle) ont été caractérisées fonctionnellement chez *Synechocystis* PCC6803. La $\Delta 15$ désaturase d'*O. tauri* (Ot 03) possède le score de localisation plastidiale le plus élevé de toutes ses désaturases : 4,53/5 (Tab. 12). La protéine de fusion SCD $\Delta 15$ -YFP est localisée à 100% (n=23) dans le chloroplaste de *N. benthamiana* alors que la partie N-terminale de 141 aa fusionnée à la YFP ne se localise que partiellement au chloroplaste et est aussi observée au RE et la membrane plasmique (Fig 50). Le peptide d'adressage au chloroplaste est de 56 aa selon la prédiction; il est donc envisageable que la construction YFP de près de trois fois plus longue puisse être à l'origine de localisation aberrante. Il est également possible que des séquences non localisées en N-terminale soient requises pour l'import de la protéine dans le compartiment cellulaire approprié.

L'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase (Ot 13.1)(Domergue et al., 2005) utilisée comme contrôle de localisation microsomale est quant à elle effectivement cantonnée au RE (100% n= 16) (Fig 50). La $\Delta 15$ désaturase et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase permettent donc de valider *N. benthamiana* comme système d'étude de localisation des désaturases de la microalgue *O. tauri*, bien que nous ne puissions exclure que les peptides de transit des autres désaturases soient moins bien reconnus par la machinerie d'import de *N. benthamiana*. Les désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ (Ot 05) et $\Delta 6/\Delta 8S-2$ (Ot 10) aux scores plastidiaux respectifs de 2,89/5 et 1,98/5, sont plastidiales lorsque leur séquence codante entière fusionnée à la YFP est exprimée chez *N. benthamiana*. Néanmoins, $\Delta 6/\Delta 8S-1$ -YFP a été également observée au niveau du RE pour environ 25% des cellules ce qui illustre peut être la divergence entre les systèmes d'import entre les deux organismes ; ces expériences de localisation seront réitérées. En ce qui concerne la $\Delta 6/\Delta 8S-3$ désaturase, nous avons utilisé la séquence annotée disponible dans les banques (Ot15, CS : 1,71) pour réaliser la construction de protéines de fusion YFP. Cette construction dont le peptide signal de transit (SP) prédit n'est que de 9 aa se localise exclusivement dans le RE, comme l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. La comparaison des séquences homologues de la protéine prédite chez les différentes espèces de Mamiellales révèle que pour *O. lucimarinus* le peptide de transit serait de 37 aa (CS de 2,07) alors que pour les autres espèces (*B. prasinos*, *M. commoda*, *M. pusilla*) il n'y a qu'une faible ou pas de localisation chloroplastique prédite. L'examen de la séquence 5' du gène d'*O. tauri* à partir des trois contignations disponibles, met en évidence un vide de séquençage à différents endroits. Nous avons pu combler ce vide par PCR sur ADNc et identifier une méthionine amont. La séquence complète Nt est de 33 aa plus longue et le score de prédiction chloroplastique de 3,11/5 avec un peptide signal prédit de 42 aa ce qui se rapproche des prédictions de SP des autres désaturases. La fusion d'Ot15 complète doit être réalisée pour déterminer si la $\Delta 6/\Delta 8S-3$ -YFP est plastidiale chez *N. benthamiana*.

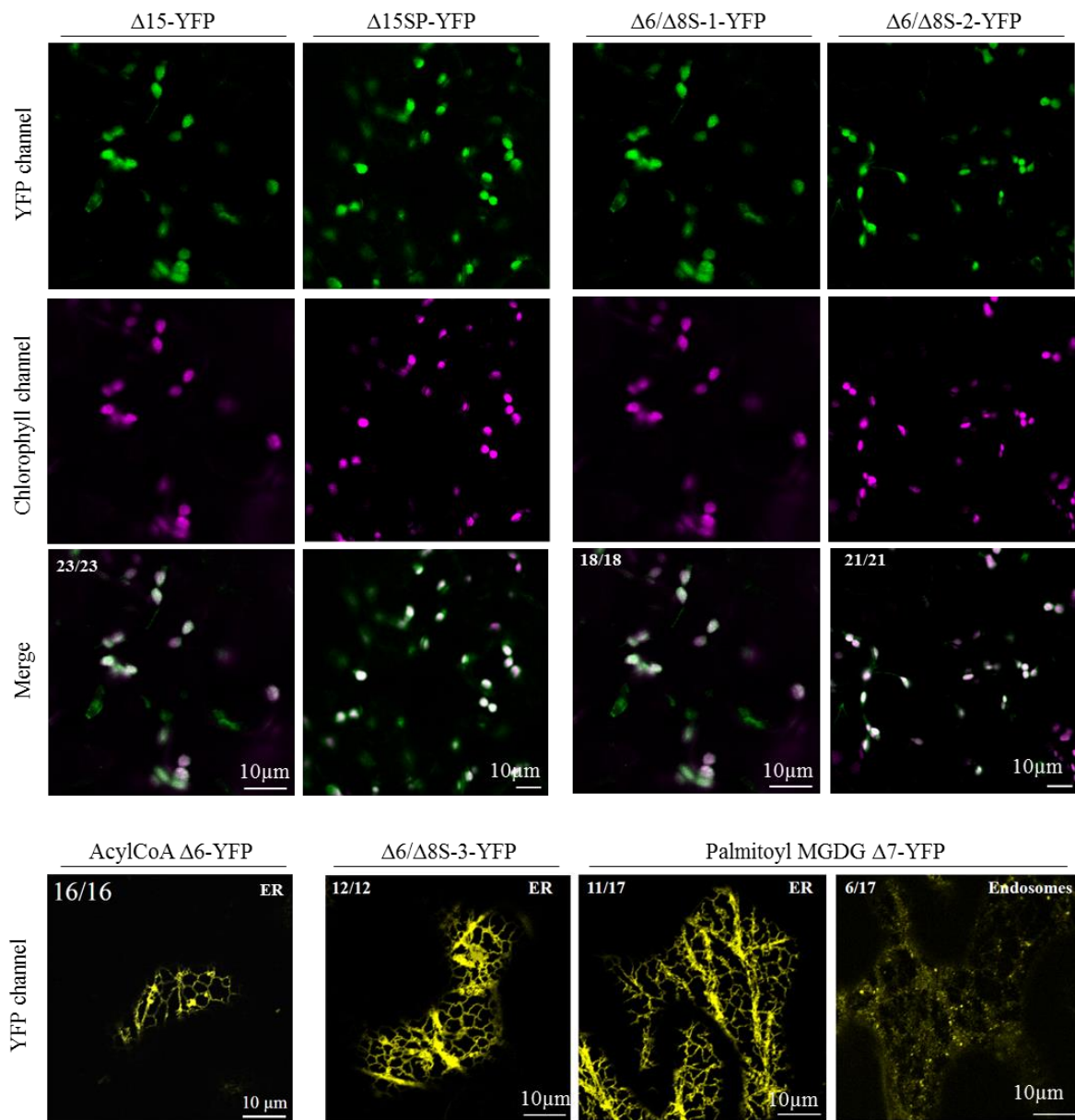


Figure 50 : Localisation des désaturases d'*O. tauri* fusionnées en C-terminal à la YFP par expression transitoire dans les feuilles de *N. benthamiana*.

Les scores de localisation sont indiqués en haut à gauche de chaque cliché lorsqu'ils ont été comptabilisés. Le peptide signal (SP) de la séquence Ot03 codant la $\Delta 15$ désaturase correspond aux 141 acides aminés en amont du domaine FAD.

3.2 Etude fonctionnelle préliminaire des désaturases candidates

3.2.1 Sélection des lignées surexpresses de désaturases candidates chez *O. tauri*

3.2.1.1 Approche expérimentale de criblage des lignées de surexpression des désaturases

Les SDC des désaturases d'intérêt ($\Delta 15$, acyl-CoA $\Delta 6$ et $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et -2) ont été clonées dans le vecteur pOtoxlucG418 sous la dépendance du promoteur transporteur de phosphate à haute affinité (HAPT) ; ce vecteur comporte un gène rapporteur luciférase sous promoteur CCA1 (Matériel et méthode, figure 33)

Les clones transformés sont sélectionnés par leur résistance au G418 puis criblés en luminescence. Les lignées rapportrices avec le plus fort signal de luminescence relative par cellule, sont celles où l'insertion de la construction dans le génome s'est faite dans les zones les plus favorables à l'expression de la construction. Les profils en FA totaux des lignées sélectionnées ont été ensuite analysés ; nous avons choisi trois clones dans chaque type de lignée et avons suivi leur croissance et vérifié le niveau d'expression du transgène par qPCR.

Implication de l'utilisation du promoteur HAPT dans le criblage des lignées surexpresses de désaturases

Il est important de noter que l'expression du gène d'intérêt est sous la dépendance du promoteur HAPT (pHAPT) qui est régulé par la disponibilité en phosphate (Djouani-Tahri et al., 2011). Le pHAPT est efficacement réprimé par le phosphate notamment par le phosphate inorganique pour des concentrations inférieures ou égales à $10\mu\text{M}$. Il a été rapporté que le niveau d'expression de la luciférase sous ce promoteur (mesuré par RT-qPCR) est 5 fois moindre dans des cellules cultivées à $50\mu\text{M}$ de phosphate inorganique (NaH_2PO_4 , milieu f/2) comparé à des cellules cultivées à $10\mu\text{M}$ de phosphate organique (β -glycérophosphate, milieu β). Inversement pHAPT est activé en carence phosphate mais cette activation est progressive et relativement lente (de 1 à 2 jours). Dans nos conditions de culture ($35\mu\text{M}$ de phosphate) nous avons voulu favoriser l'expression des transgènes sous pHAPT en remplaçant le phosphate inorganique par du phosphate organique dont nous savons qu'il ralentit la croissance et provoque un phénotype FA de cellules carencées. Il faut noter que l'utilisation du pHAPT va de pair avec une expression variable lors de la culture en batch où le phosphate est continuellement consommé au cours de la croissance. Ainsi pour des cellules cultivées entrant en phase stationnaire il est fort probable que l'expression du transgène soit plus importante que pour des cellules en phase exponentielle de croissance. Dans l'hypothèse où une $\Delta 6$ désaturase serait spécifiquement réprimée transcriptionnellement lors de carence nutritive, ce système constitue un avantage car il permet en théorie de contrer cette régulation et est censé établir un ratio ALA/SDA faible par rapport aux lignées contrôles chez lesquelles on attend une forte augmentation de ALA et donc un ratio ALA/SDA élevé. Ce système constitue néanmoins un inconvénient dans le cas où les $\Delta 6$ désaturases surexprimées ne seraient

pas la cible d'inhibition transcriptionnelle en carence et/ou que d'autres mécanismes seraient à l'origine de l'augmentation de ALA lors de carence phosphate ; l'augmentation du ratio ALA/SDA pourrait alors masquer l'effet de la surexpression de ces désaturases. Il nous a donc semblé opportun dans un premier temps de comparer des cellules cultivées en f/2 et en milieu β (limitation phosphate) plutôt que d'induire (lentement) le pHAPT par une carence phosphate.

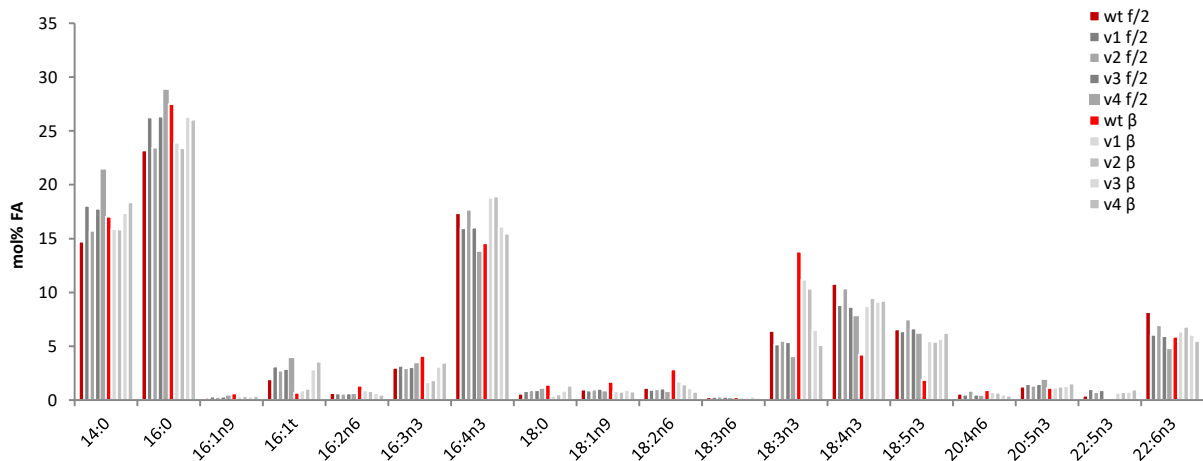


Figure 51 : Profils en acides gras des cellules contrôles non transformées et transformées avec le vecteur vide en milieu β et en milieu f/2.

Les analyses ont été obtenues en GC-FID après méthanolyse directe sur les cellules récoltées (n=1).

Les contrôles utilisés initialement dans nos expériences correspondent à des souches sauvages. Des lignées transformées par le vecteur vide ont été ultérieurement créées et sont présentées en comparaison des lignées contrôles cultivées simultanément en milieu f/2 et en milieu β -glycérophosphate, c'est-à-dire dans des conditions de disponibilité en phosphate plus ou moins limitantes (Fig. 51). On observe que le profil des lignées contrôles est similaire en condition non limitante (f/2) alors que les profils sont nettement plus variables en conditions limitantes (β). Nous interprétons cette variation comme reflétant des états plus ou moins carencés des contrôles. En effet, entre une culture qui entre en état stationnaire et une culture en état stationnaire avéré, le ratio ALA/SDA est plus ou moins altéré sans que la densité cellulaire ne soit significativement différente. Cette variabilité illustre que la culture en milieu β si elle favorise l'expression des transgènes entraîne une difficulté pour l'analyse des résultats. La progression du ratio ALA/SDA est dynamique en carence phosphate comme l'illustre la figure supplémentaire 10 de (Degraeve-Guilbault et al., 2017) et comme mentionné, peut masquer l'effet de l'expression d'un transgène dont l'activité induirait une tendance inverse.

Criblage des lignées surexpresser de candidat $\Delta 6$ désaturases : profil en FA et luminescence

Le criblage des lignées sélectionnés sur la base de leur luminescence (Ot15 n=12; Ot10 n=6 et Ot13 n=5) a été effectué en conditions limitante de phosphate (β -glycérophosphate) ce qui est illustré par un

phénotype de carence chez le contrôle en milieu β par rapport au contrôle en f/2, soit la modification du ratio 18:3/18:4 via l'inhibition supposée d'une activité $\Delta 6$ désaturase ainsi qu'en milieu f/2 (Fig. 52 et annexe 11).

Les lignées surexpresseurs de désaturases dont le signal luminescent est le plus fort présentent une diminution de leur teneur en 18:3 *n*-3 au profit d'une augmentation du 18:4 *n*-3 (Fig. 52 et annexe 11).

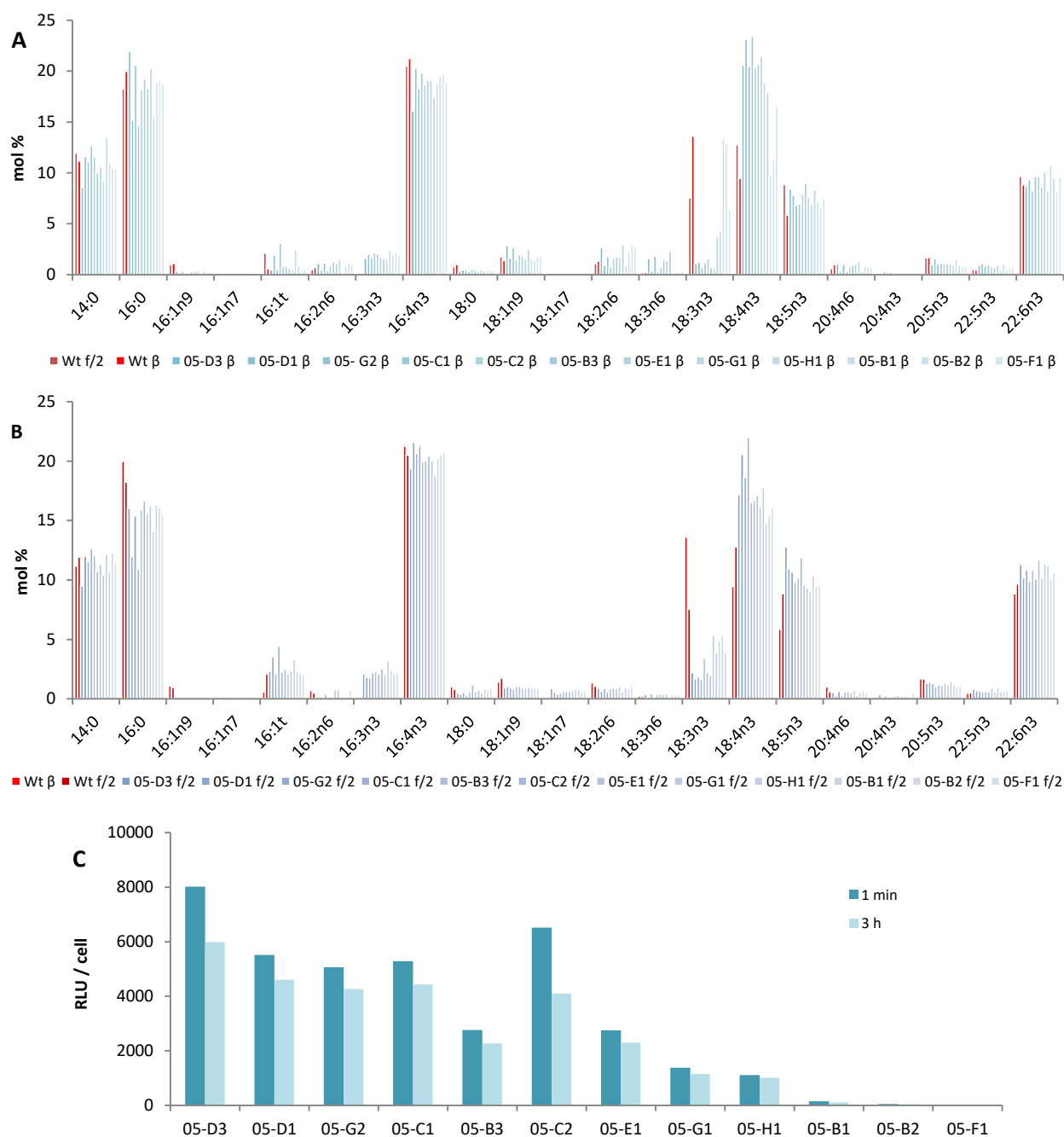


Figure 52 : Profils en FA totaux des lignées surexprimant soit la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturases (O05) cultivées en phosphate organique ou inorganique, classées par intensité de signal de luminescence.

A et B, profils totaux obtenus en GC-FID par 'FAMES directs'. Les milieux de culture contenaient soit **A**, du phosphate organique (milieu β), soit **B**, du phosphate inorganique (milieu f/2). **C**, Signaux de luminescence relative des cellules des lignées O05.

Les lignées Ot05 de plus faible luminescence (≤ 1000 RLU/cell) ont un profil d'acides gras totaux identique au contrôle Wt β ce qui suggère que l'utilisation de la luminescence comme rapporteur des lignées surexprimant le plus le transgène est valide (Fig 52). Le criblage des mêmes lignées à faible luminescence en milieu f/2 révèle que leurs profils sont semblables à celui du contrôle ce qui peut être interprété comme une plus faible induction du promoteur et/ou un masquage de l'activité augmenté de ces désaturases par la production importante de SDA en f/2. En revanche il est évident que les lignée Ot05 aux forts signaux de luminescence (>1000 RLU/cell) ont en f/2 un phénotype très proche à celui observé en milieu β (Fig. 52). Des répétitions en triplicats indépendant seront nécessaires pour préciser si le phénotype légèrement moins marqué en milieu β qu'en milieu f/2 est significatif. Alternativement il faudra travailler à des concentrations moindres de phosphate inorganique qui permette une meilleur expression du transgène sans provoquer un phénotype de carence marqué.

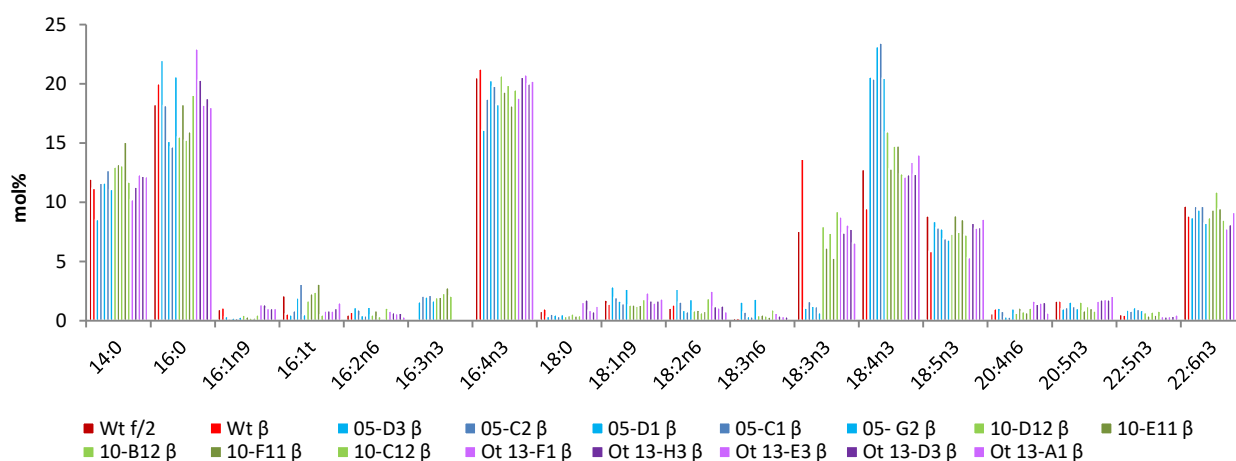


Figure 53 : Profils en FA totaux des lignées surexprimant les gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-2$ ou acyl-CoA $\Delta 6$.

Les profils de FA totaux ont été obtenus par méthanolyse directe des cellules cultivées en petites flasques sous lumière blanche en jour nuit (16h/8h). En rouge les lignées contrôles non transformées, cultivées en milieu β et en f/2. Les 5 cellules transformées au plus fort signal de luminescence de chaque lignée sont cultivées en milieu β . Les lignées Ot05 (en bleu), Ot10 (en vert) et Ot13 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase.

Les phénotypes des lignées transgéniques de la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ (lignées Ot05) à forte luminescence est particulièrement marqué : le 18:3 est divisé par 10 par rapport au contrôle β et devient minoritaire (1.5%) tandis que le 18:4 double et atteint 20% des FA totaux (Fig. 53). Ce phénotype suggère fortement une activité $\Delta 6$ désaturase. La surexpression des gènes $\Delta 6/\Delta 8S-2$ (lignées Ot10) et de *ACYL-CoA $\Delta 6$* (lignées Ot13) conduisent à un phénotype de même tendance mais nettement moins marqué que pour les lignées Ot05 : le 18:3 est seulement divisé par deux et le 18:4 est similaire au contrôle β . La plupart des lignées sélectionnées semblent également posséder une teneur en 18:5 plus élevée par rapport au control β (environ+3%). D'ailleurs dans ces conditions (petite flasques), la teneur en 18:5 augmente dans toutes les cultures et atteint environ 8% alors que dans nos conditions utilisées jusqu'ici (grandes flasques/Erlenmeyer) elle est d'environ 5%. Ces résultats suggèrent fortement que les lignées Ot05 et dans une moindre mesure, Ot10, Ot13 ont des activités $\Delta 6$ désaturase en système homologue.

Ces résultats indiquent d'ors et déjà que les lignées de surexpression du gène $\Delta 6/\Delta 8S-1$ sous le promoteur HAPT (supposé moins actif en f/2 dans nos conditions) est suffisante pour aboutir à une augmentation de l'activité $\Delta 6$ désaturase ; en milieu carencé en phosphate le phénotype de carence observé chez le contrôle est largement contrecarré. Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase qui est plastidiale est la cible d'une régulation transcriptionnelle en carence nutritive. Inversement la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturases pourraient avoir une moindre activité et/ou être régulées au niveau post-transcriptionnel.

3.2.1.2 Surexpression et croissance de lignées sélectionnées de $\Delta 6$ désaturases

Pour des raisons de logistique nous avons continué les expériences de caractérisation des désaturases avec trois clones de chaque lignée. Nous les avons choisis car ces clones présentent conjointement les phénotypes en FA les plus marqués et les plus forts signaux de luminescence. Nous avons vérifié leur niveau d'expression pour le gène d'intérêt en milieu β par RT-qPCR (Fig. 54). Les clones Ot05 (D3, C2 et D1), dont le phénotype est très marqué, ne surexpriment que 2 fois plus le gène $\Delta 6/\Delta 8S-1$, ce qui est peu par rapport aux clones Ot10 qui surexpriment jusqu'à 16 fois plus le gène $\Delta 6/\Delta 8S-2$ (clones Ot10-D12, -B12) et aux clones Ot13 qui surexpriment jusqu'à 70 fois plus le gène $\Delta 6$ ACYL-CoA (clones Ot13-F1, -H3).

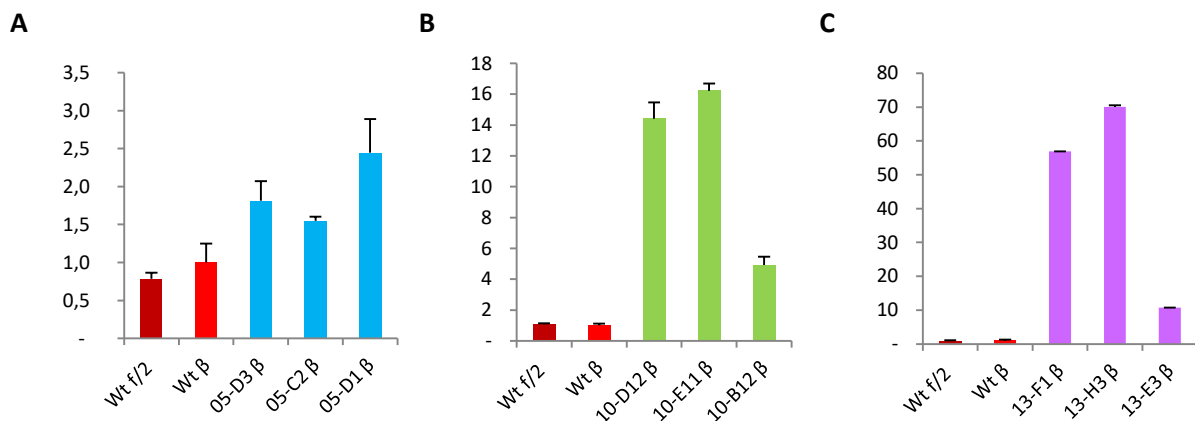


Figure 54 : Surexpression des gènes codant les désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-2$ ou acyl-CoA $\Delta 6$.

Les cellules ont été cultivées en moyenne flasques sous lumière blanche en jour nuit (16h/8h). L'expression des gènes surexprimés $\Delta 6/\Delta 8S-1$ (A), $\Delta 6/\Delta 8S-2$ (B) ou ACYL-CoA $\Delta 6$ (C) dans les lignées respectives 05, 10 et 13 est normalisée par l'expression de *E1Fa*. Les lignées récoltées ont été suivies en croissance figure suivante.

Le suivi de la croissance de ces différents clones a été réalisée en milieu β et en milieu β additionné de 10 fois la concentration de phosphate inorganique (350 μ M) afin d'avoir le niveau le plus faible de surexpression du transgène et en milieu β (35 μ M). En présence de P organique et inorganique, les lignées surexpresses croissent de manière similaire au contrôle, à l'exception des lignées Ot05-D1, Ot10-D12 et Ot10-B12 (Fig. 54). Pourtant les lignées Ot05-D1 et Ot10-D12 possèdent respectivement

un niveau d'expression et un profil en FA similaires aux les lignées Ot05-D3, Ot05-D1, et Ot10-E11 dont la croissance n'est pas affectée comme Ot05-D3 et Ot05-D1, et Ot10-E11 (Fig. 53,54 et 55).

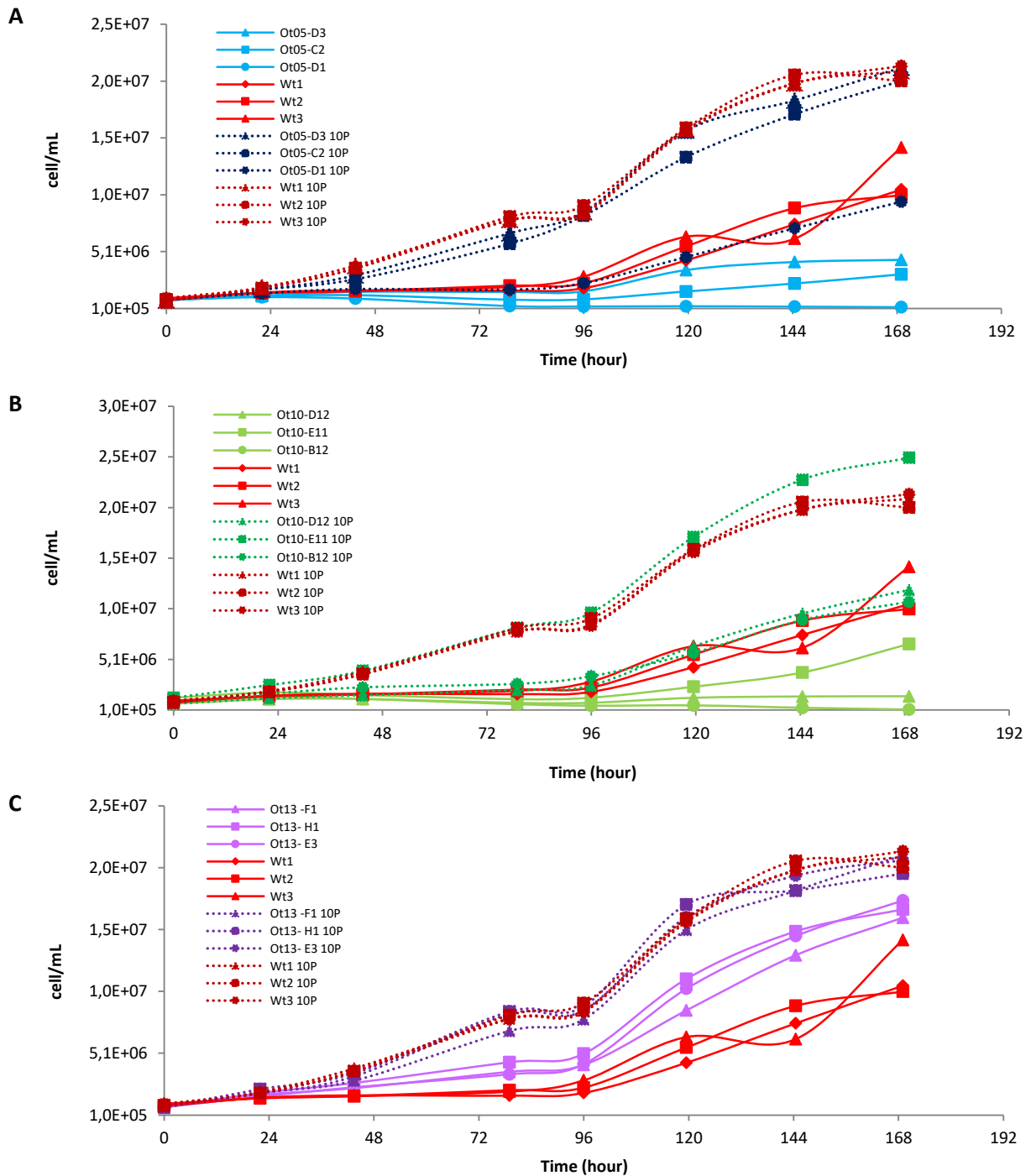


Figure 55 : Comparaison de la croissance des lignées surexprimant les gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-2$ ou acyl-CoA $\Delta 6$ en moyenne flasque sous lumière bleue jour/nuit (16h/8h).

Les cellules ont été cultivées en milieu β ou de milieu β additionnée de phosphate (10P). En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05 (en bleu), Ot10 (en vert) et Ot13 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase.

La présence de β glycérophosphate comme seule source de phosphate induit un ralentissement de la croissance chez le contrôle et chez tous les clones par rapport au milieu f/2 (Fig. 55). Ce ralentissement mentionné précédemment (et dont nous avons conscience) est attribuable au phénomène de carence phosphate dont nous avons montré qu'il ralentit la croissance (Degraeve-Guilbault et al., 2017). Ce phénomène ne concorde pas avec les observations de (Djouani-Tahri et al., 2011) et ne se produisait effectivement pas lorsque les souches étaient maintenues en flasques à Banyuls/mer, en milieu de Keller (NSW), milieu qui comportait comme seule source de phosphate le β glycérophosphate (communication F. Corellou). Il est évident que dans les conditions actuelles en milieu β les cellules montrent tous les symptômes d'une limitation importante en phosphate (voire une réelle carence). Dans ces conditions, la croissance des lignées surexprimeurs Ot05 et Ot10 est ralentie voire nulle (Fig. 55A et B). Les clones Ot13 quant à eux, ne sont pas affectés et présentent une croissance légèrement supérieure à celles des contrôles en milieu β (Fig. 55C).

Afin de réaliser l'analyse des lipides dans des conditions de culture proches de nos conditions standards utilisées au laboratoire, nous avons cultivé les lignées sélectionnées en Erlenmeyers de 200 mL sous lumière blanche continue et sous agitation (Fig. 56). On observe que ces conditions sont nettement plus favorables à la croissance avec une densité maximale atteinte pour les contrôles 6.10^7 cell/mL environ contre 2.10^7 cellules/mL précédemment. La croissance des clones Ot05-C2, Ot05-D1, Ot10-D12 et Ot10-B12 est toujours ralentie, mais n'affecte plus la viabilité des cultures.

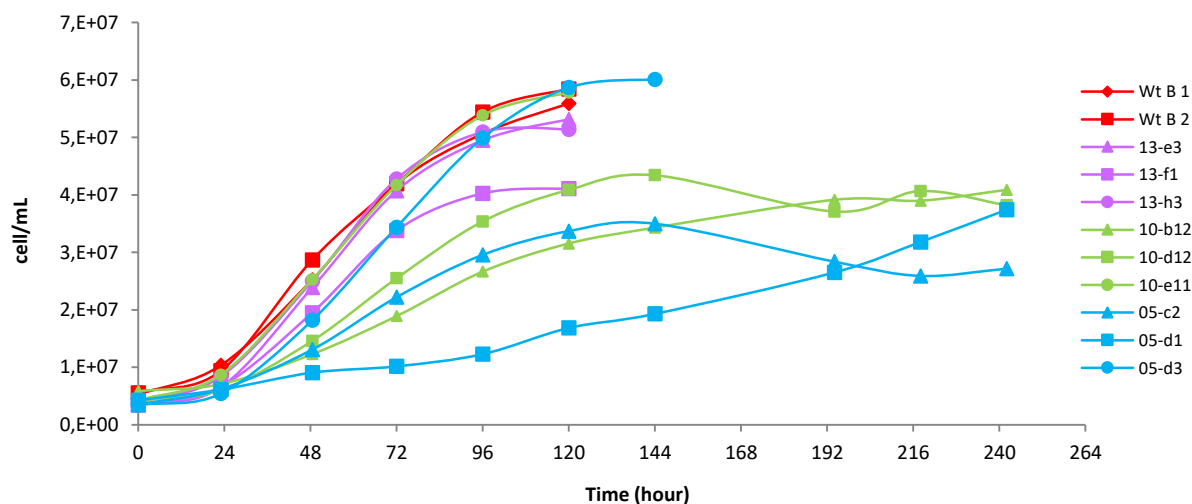


Figure 56 : Comparaison de la croissance des lignées qui surexpriment les gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-2$ ou acyl-CoA $\Delta 6$ en Erlenmeyer de 200mL sous lumière blanche continue.

Les cellules ont été cultivées en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05 (en bleu), Ot10 (en vert) et Ot13 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. Les lignées Ot10-D12, 10-B12, 05-D1, 05-C2 qui présentent une croissance plus lente ont été suivies pendant 10 jours.

Il est possible que les souches qui aient une croissance altérée aient subi une insertion de la construction dans une zone génomique qui soit à l'origine de ce phénomène. C'est une hypothèse raisonnable pour expliquer que des lignées qui surexpriment le même gène avec la même intensité et qui présentent des profils en FA totaux identiques ne poussent pas de manière similaire lorsqu'elles sont cultivées en conditions identiques. Les nombreuses lignées créées auparavant ne présentaient visiblement pas ce défaut de croissance mais le fragment linéaire introduit correspondait en règle générale à la construction débarrassée des parties non nécessaires du vecteur (Communication F. Corellou). Or nous avons utilisé ici le vecteur pOtoxLuc linéarisé par soucis de gain de temps et parce que les lignées générées auparavant avec des vecteurs pOtox et pOtluc linéarisés ne présentaient pas de différences avec des lignées générées par insertion de la construction de gène seule. Il est possible que la taille relativement importante du vecteur (8kb) favorise son insertion dans des zones préférentielles du génome, et impacte la croissance. Nous avons donc interprétés ces défauts de croissance comme étant indépendants de l'activité du transgène et choisi d'étudier au niveau lipidique les clones ne présentant pas d'altération de croissance soit Ot05-D3, Ot10-E11 et Ot13-H3.

3.2.2 Spécificité de substrat potentielle des $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et $\Delta 6/\Delta 8S-2$ désaturases

3.2.2.1 Analyse en système homologue (*O. tauri*)

Les profils en FA totaux des trois lignées choisies Ot05-D3, Ot10-E11 et Ot13-H3, ont été analysés à partir de l'extrait lipidique des cultures récoltées à 5 jours (expérience précédente, Fig. 56) soit pour des densités et des phases de croissance similaires. Ces extraits lipidiques ont ensuite été séparés en HPTLC. La comparaison des profils de FA des extraits méthanolysés directement après l'extraction (Fig. 57A) et de ceux obtenus après migration (Fig. 57B) révèle une diminution de 30% dans la quantités de PUFA $\omega-3$ majoritaires 16:4, 18:3, 18:4, 18:5 et 22:6 dans les lipides séparés par HPTLC. Ces différences avant et après migration n'avaient jamais été observées auparavant et suggèrent fortement qu'après le dosage de l'extrait lipidique, il y a eu ici un problème d'oxydation des PUFA. Dans les analyses GC-FID de ces résultats préliminaires, nous avons considéré que la dégradation a eu lieu de manière uniforme entre les différents échantillons qui ont été traités de manière identique et simultanément. Il faut également noter qu'entre les deux contrôles qui ont poussé à la même vitesse, exempts de contamination bactérienne et récoltés à la même densité, le Wt2 présente moins de 18:4 (Fig. 57A et B). Il faudra donc répéter ces expériences.

Néanmoins, la baisse significative du 18:3 dans les trois lignées de surexpressesurs décrites précédemment dans la figure 52 est retrouvée : elle est toujours très marquée dans la lignée Ot05-D3 par rapport à la lignée Ot10-E11, mais elle est cette fois quasiment inexistante dans la lignée Ot10-E11 par comparaison au Wt2 et aux lignées Ot05-D3 et Ot10-E11. La baisse du 18:3 se fait aussi au profit d'une augmentation inversement proportionnelle du 18:4, plus ou moins significative selon le contrôle

utilisé en référence (Fig. 57). Ici, le 18:5 augmente uniquement chez la lignée Ot05-D3 contrairement à ce que nous avons vu dans d'autres conditions de culture où il semblait augmenter dans toutes les lignées (Fig. 53). Le 16:0 augmente dans les trois lignées surexpresseurs (Fig. 57) ce qui n'avait pas été décrit auparavant (Fig. 53).

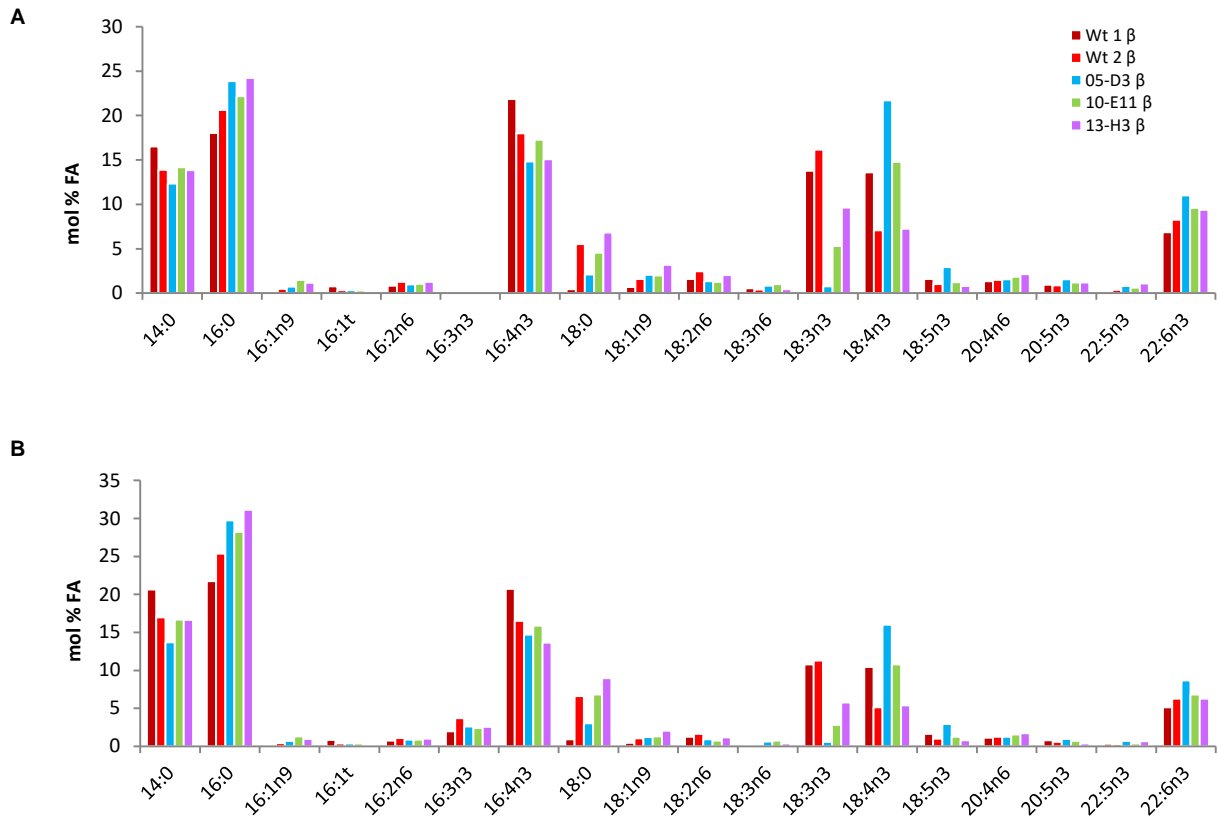


Figure 57 : Profils en FA totaux des lignées qui surexpriment les gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-2$ ou acyl-CoA $\Delta 6$ avant (A) et après migration (B).

Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). La croissance des cellules est illustrée figure 56.

Tous les clones possèdent les mêmes modifications de leur teneur en classes lipidiques (Fig. 58) : la quantité de TAG est multipliée par 10 tandis que la quantité de phospholipides diminue fortement ce qui rappelle le phénotype de la carence phosphate (Fig. 58A). Ici la proportion de PG diminue de 7% chez les trois surexpresseurs par rapport à la moyenne des contrôles, celle de PDPT diminue de 3% (Ot13) à 4.5% (Ot05/10) et celle du DGTA augmente de 7% (Fig. 58B). Ces différences ne peuvent pas être expliquées par une différence de phase de croissance : à 5 jours, toutes les cultures étaient en début de phase stationnaire (Fig. 56).

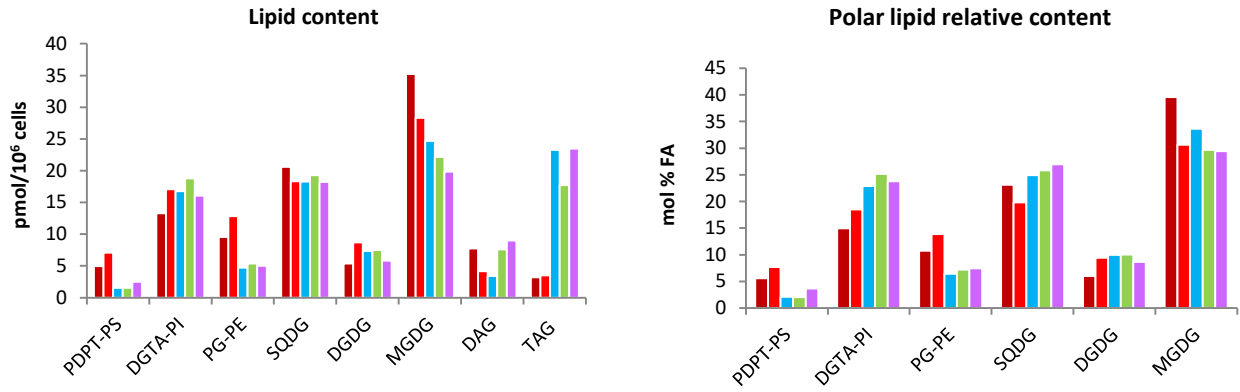


Figure 58 : Effet de la surexpression des gènes de désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$, $\Delta 6/\Delta 8S-2$ ou acyl-CoA $\Delta 6$ sur le contenu lipidique chez *O. tauri*.

(A) Variation quantitative du contenu lipidique. (B) Proportion des différentes classes de lipides structuraux. Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). La croissance des cellules est illustrée figure 56 et leur profil en FA totaux figure 57.

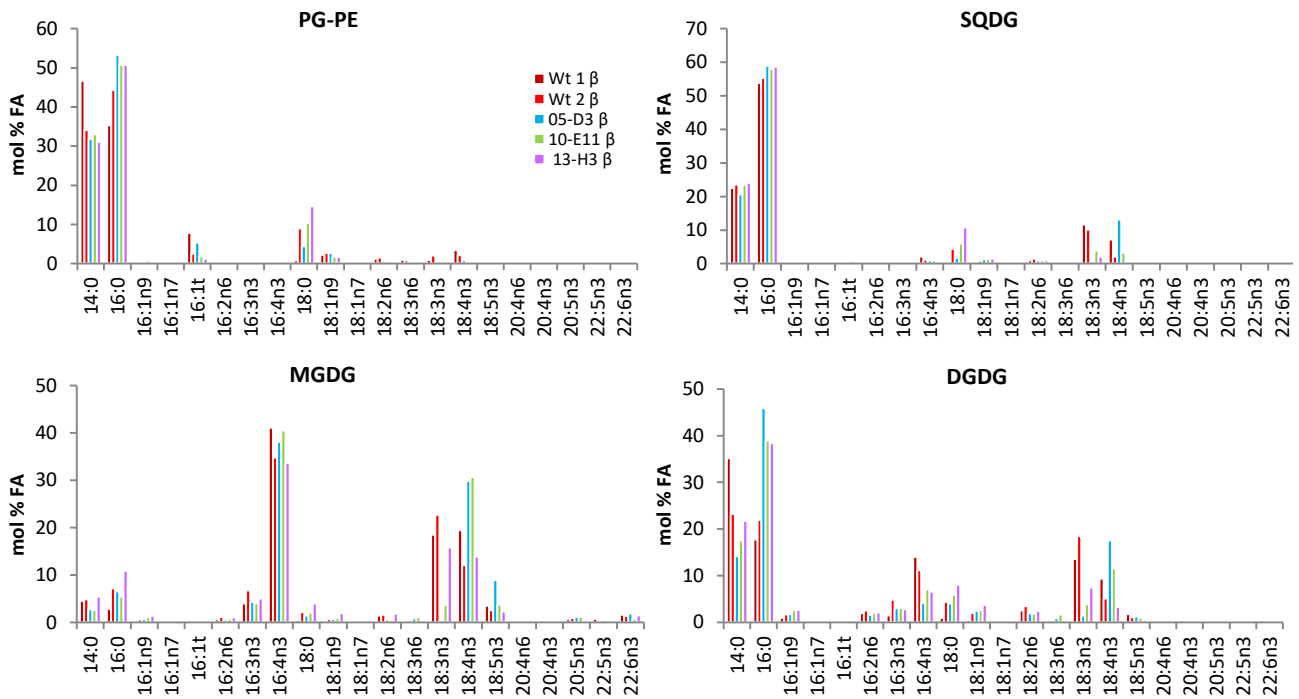


Figure 59. Effet de la surexpression des gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et -2 et $\Delta 6$ acyl-CoA sur les profils en FA des lipides plastidiaux.

Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). La croissance des cellules est illustrée figure 56, leur profil en FA totaux figure 57 et leur teneur en lipides figure 58.

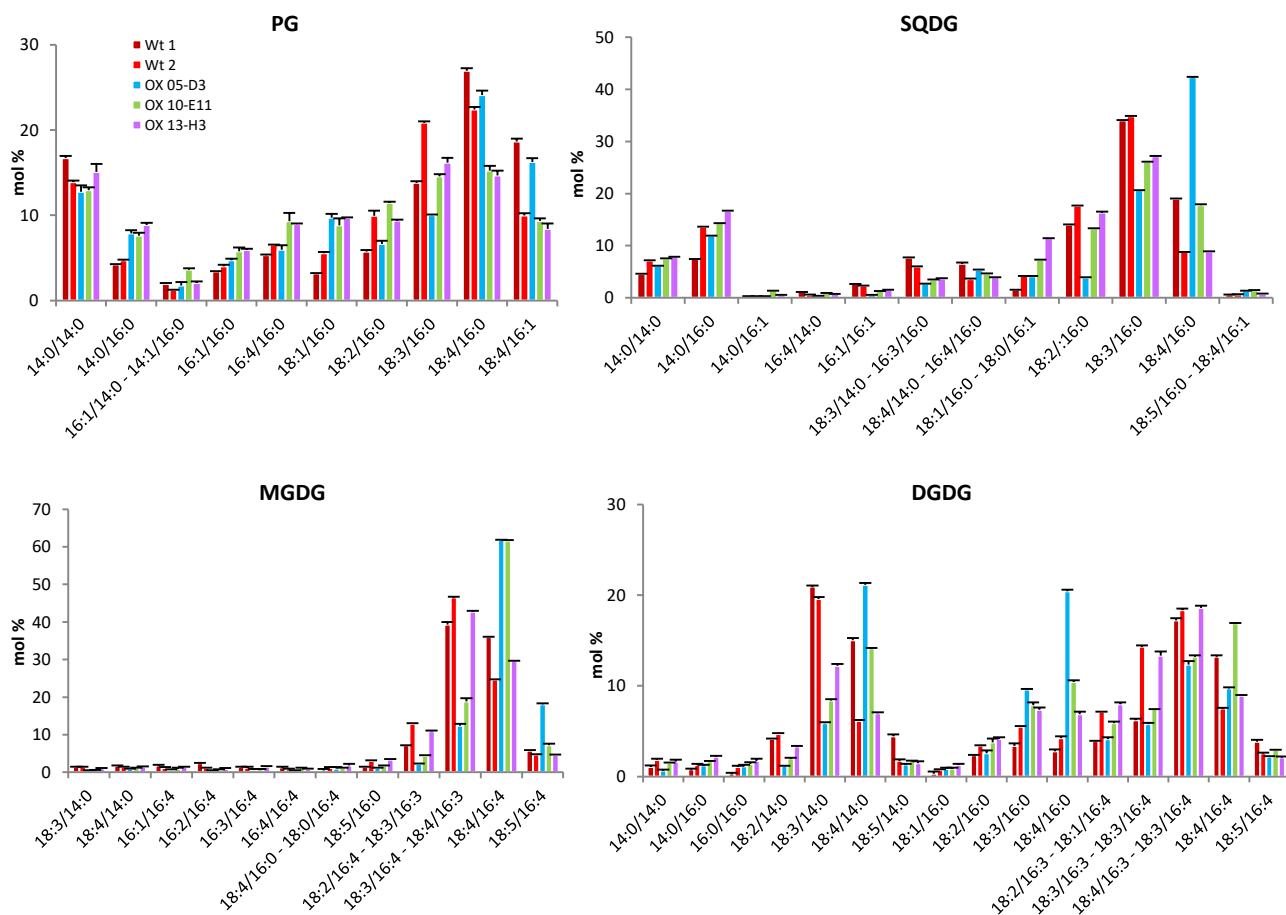


Figure 60. Effet de la surexpression des gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et -2 et $\Delta 6$ acyl-CoA sur les espèces moléculaires des lipides plastidiaux.

Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). La croissance des cellules est illustrée figure 55, leur profil en FA totaux figure 56, leur teneur en lipides figure 57 et les profils en acides gras de chaque lipide figure 58.

Afin d'aller plus loin chaque classe lipidique a été analysée en GC-FID et HPLC-MS. L'oxydation des PUFA précédant l'analyse des lipides en GC-FID rend délicate l'interprétation de ces résultats (Fig. 59 et annexe 12). Heureusement les résultats de HPLC-MS dont les échantillons n'ont pas subi de dégradation apportent un éclairage supplémentaire et nécessaire sur les potentialités de spécificité des désaturases (figure 60 et annexes 13 et 14). Les différences de contenu en 18:3 et 18:4 entre les deux contrôles ne rendent pas aisées l'interprétation des résultats pour les lignées surexpresses de l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturases et des $\Delta 6/\Delta 8S$ désaturases. Nous avons vu précédemment que la surexpression de l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase induit les plus faibles variations dans pool des PUFA C18 totaux (Fig. 57) et ne modifie que peu la croissance des surexpresses (Fig. 56). Les profils des lipides plastidiaux des lignées Ot13 sont également peu modifiés par rapport au contrôle Wt2 (Fig. 59) ; nous sommes donc servis de la lignée Ot13 comme d'une référence supplémentaire pour aider à la compréhension des résultats. Les lignées Ot05 sont caractérisées par une $\Delta 6$ désaturase évidente et donc une teneur très faible en 18:3 (Fig. 57) ; ce phénotype est retrouvé dans tous les lipides plastidiaux de la lignée Ot05-

D3 (Fig. 59). Sur la figure 60, les combinaisons majoritaires DGDG 18:3/14:0 et MGDG 18:3/16:4 diminuent drastiquement de 65% et le même scénario est observé pour le SQDG 18:2/16:0 (-75%), le SQDG 18:3/16:0 et le PG 18:3/16:0. Cela se fait au profit de l'augmentation des combinaisons contenant le 18:4 telles que DGDG 18:4/14:0, DGDG 18:4/16:0, MGDG 18:4/16:4, SQDG 18:4/16:0 et PG 18:4/16:1. Le MGDG 18:5/16:4 est la seule espèce contenant du 18:5 qui augmente significativement. Aucune modification du 18:5 n'est retrouvée dans les lignées Ot10-E11 et Ot13-H3.

La lignée Ot10-E11 possède un profil total en 18:3n-3 et 18:4n-3 intermédiaire entre ceux des lignées Ot05-D3 et Ot13-H3 (Fig. 57), reposant principalement sur des variations de composition des galactolipides (Fig. 59 et 60). De manière moins marquée que dans la lignée Ot05, les combinaisons contenant du 18:2 et 18:3 diminuent : DGDG 18:3/14:0, DGDG 18:3/16:3-18:2/16:4 et MGDG 18:6/16:4 au profit du MGDG 18:4/16:4, du DGDG 18:4/14:0, DGDG 18:4/16:0 mais également du DGDG 18:4/16:4 ce qui n'est pas observé chez Ot05-D3 (Fig. 60). Dans la lignée Ot13-H3 les seules diminutions du 18:3 sont légères et retrouvées uniquement dans le DGDG, plus particulièrement dans la combinaison DGDG 18:3/14:0 (de 19 à 12%) et dans le SQDG, combinaison 18:3/16:0 (de 34 à 27%) (Fig. 60). Par contre cette combinaison 18:3/16:0 augmente légèrement dans le DGDG comme le couple 18:4/16:0. En termes de FA la teneur en 18:4 reste cependant stable. Aucune modification des C18 PUFA n'est observée dans le MGDG.

Aucune modification de la composition des lipides extraplastidiaux PDPT et DGTA n'est observée chez les lignées étudiées (annexe 13).

3.2.2.2 Analyse en systèmes hétérologues

Afin d'avoir une vision plus claire de la spécificité des substrats des $\Delta 6$ désaturases d'*O. tauri*, nous les avons exprimé chez *N. benthamiana* (en expression transitoire) et chez *S. cerevisiae* (transformation stable non insertionnelle). Cette étude a été prise en charge par R. Gomez sous la direction de F. Domergue.

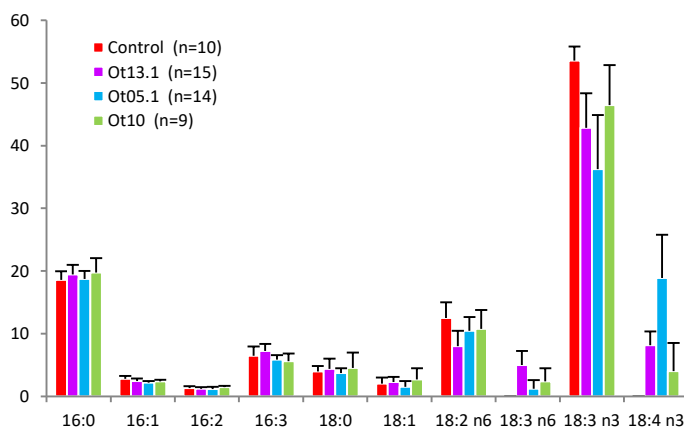


Figure 61 : Profils moyens totaux de FA de *N. benthamiana* après agro-infiltration et expression des gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et -2 et $\Delta 6$ acyl-CoA d'*O. tauri*.

L'expression des désaturases d'*O. tauri* chez *N. benthamiana* (Fig. 61) permet de tester leur fonctionnalité en système plante hétérologue et d'obtenir des informations quant à leur spécificité plus ou moins strictes sur des substrats lipidiques plastidiaux ou non.

N. benthamiana possède des chaînes acyles substrats potentiels des $\Delta 6$ désaturases : le 18:2 *n*-6 et 18:3 *n*-3 (Fig. 61). Ces FA sont de surcroît probablement présents dans une configuration favorable sur les lipides puisque en *sn*-1 sur les lipides plastidiaux (classes conservées) en couple avec le 16:3 (mais pas de 16:4) et en *sn*-2 sur la PC (soit la même position que sur les lipides extraplastidiaux chez *O. tauri*) et sont également présent sous forme d'acyl-CoA (Reynolds et al., 2015). L'expression indépendante des gènes codants les trois $\Delta 6$ désaturases engendre une hausse du 18:4 *n*-3 mais également du 18:3 *n*-6, tous deux absents chez *N. benthamiana*. Comme chez *O. tauri* la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase est la plus active (le 18:4 *n*-3 représente 20% des FA totaux) et celle-ci présente une nette préférence pour le substrat ω -3, le 18:4 représente en effet 93% des produits formés. Contrairement à sa surexpression chez *O. tauri*, la $\Delta 6$ Acyl-CoA désaturase chez *N. benthamiana* engendre d'avantage de 18:4 *n*-3 que la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ désaturase (13% versus 6%). La $\Delta 6$ Acyl-CoA désaturase produit la plus forte proportion 18:3 *n*-6 (5%). Par contre les deux désaturases $\Delta 6$ Acyl-CoA et $\Delta 6/\Delta 8S-2$ présentent la même préférence de substrat ω -3 (62%) moins marquée que celle de la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase.

Chez *N. benthamiana*, la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase intervient uniquement sur le 18:3 *n*-3 des lipides plastidiaux PG, et MGDG mais pas sur le DGDG (Fig. 62). Le MGDG est le seul substrat de sa faible activité sur le 18:2 *n*-6. La $\Delta 6/\Delta 8S-2$ désaturase et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase agissent préférentiellement sur le PG, mais également sur la PC pour l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase uniquement.

Chez la levure, l'expression des désaturases plastidiales $\Delta 6$ n'induit aucun changement de profil pour des cultures supplémentées en 18:3 *n*-3 ou avec FA testés (résultats non montrés) et suggère que ces enzymes ne trouvent pas leur substrat chez *S. cerevisiae*. Par contre, l'expression de la $\Delta 6$ acyl-CoA désaturases confirme les résultats de Domergue et al., (2005) par la synthèse de 18:4 *n*-3 et de 18:3 *n*-6. Ces travaux chez la levure ont également permis de confirmer les activités des désaturases $\Delta 4$ (Ot01, identifiée par Tavares et al., (2011)) et $\Delta 5$ (Ot12.2, homologue de la $\Delta 5$ de *Lucimarinus* identifiée par Ahmann et al., (2011)), donc probablement microsomaux malgré leur CS respectifs de 2.42 et 2.31 (Annexe 15).

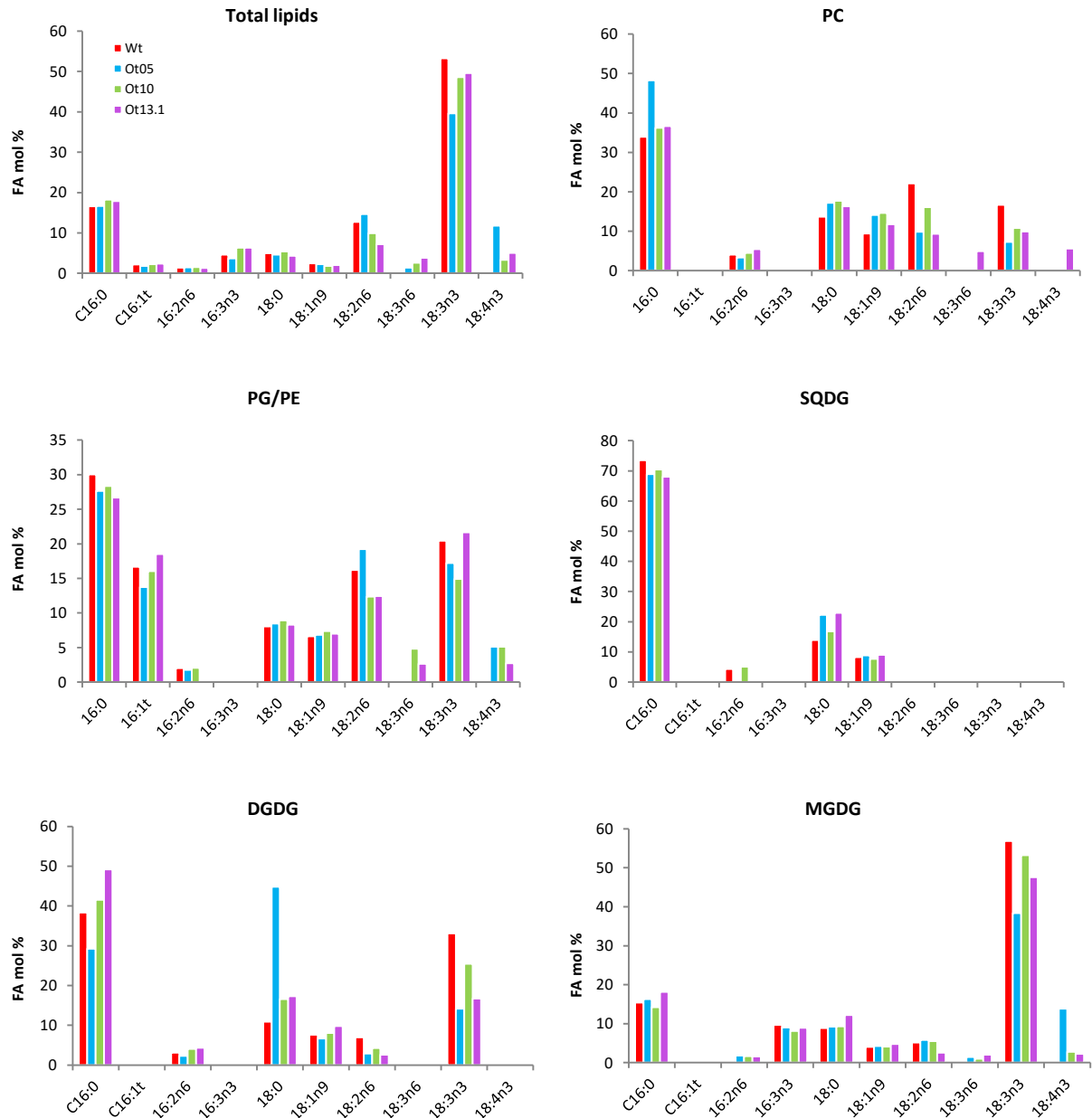


Figure 62 : Profil d'acides gras totaux et des différents lipides de *N. benthamina* 5 jours après agro-infiltration et expression des gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et-2 et $\Delta 6$ acyl-CoA d'*O. tauri*.

Discussion

Les différents systèmes d'expression

Travailler en système homologue chez *O. tauri* permet d'étudier les enzymes dans leur contexte natif avec leurs substrats naturels et localisés dans le compartiment cellulaire approprié. Ce n'est pas trivial lorsqu'on sait que les lipides extraplastidiaux DGTA et PDPT sont originaux par rapport aux lipides des autres organismes, qu'on sait que la position de ces chaînes *sn*-1 ou *sn*-2 a une importance pour l'efficacité des désaturases et qu'on peut supposer de surcroît que les combinaisons de chaînes acyles,

dont la nature est spécifique comme dans le cas du 16:4, peuvent avoir un rôle dans la reconnaissance de substrat ce qui aurait potentiellement empêché l'identification de la $\Delta 3$ désaturase en système hétérologue. L'inconvénient est évidemment la présence de produits abondants des désaturases endogènes (comme le SDA) et de régulations internes potentielles au niveau post-transcriptionnel qui peuvent respectivement brouiller l'interprétation des résultats et affaiblir une approche par surexpression. Exprimer les désaturases d'*O. tauri* dans des systèmes hétérologues dont la diversité de FA est plus faible et qui sont potentiellement dépourvus des régulations spécifique à la régulation des dites désaturases, permet d'avoir une vision plus claire quant à la fonctionnalité des désaturase hétérologues exprimées, même si les substrats mis à disposition ne sont pas identiques à ceux du système natif. Pour l'étude des désaturases microsomales la levure est un système adéquat où la supplémentation en acides gras dans le milieu permet de tester les activités des désaturases moyennant qu'elles possèdent un Cytb5 ou qu'elles puissent fonctionner avec le CytB5 de levure; dans le cas contraire le Cytb5 adéquat libre peut être coexprimé. En effet, *S. cerevisiae* possède les oxydases nécessaires à alimenter les Cytb5. Il faut néanmoins chez *S. cerevisiae* et que les désaturases hétérologues puissent accepter les substrats disponibles à savoir la PC ou les acyl-CoA. Ce système a permis de révéler l'existence d'une l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase chez *O. tauri* (Domergue et al., 2005).

En revanche pour étudier les désaturases plastidiales, des systèmes hétérologues différents doivent être utilisés. Il s'agit des cyanobactéries comme *Synechocystis* et des systèmes très pratiques où l'expression transitoire est rapide comme le tabac et *N. benthamiana*. Les systèmes d'importation au chloroplaste entre *O. tauri* et *N. benthamiana* semblent compatibles pour étudier la localisation des désaturases en système hétérologue. *N. benthamiana* permet également de tester la spécificité de désaturases plastidiale sur les espèces moléculaires de substrats lipidiques présents chez l cette espèce. L'absence du 16:4 n'apparaît pas comme rédhibitoire puisque chez *N. benthamiana* nos premiers résultats suggèrent que Ot05 peut convertir des espèces MGDG 16:3/18:3 en 16:3/18:4. Ce système permet également d'identifier une activité sur les substrats oméga 6 (très peu présent chez *O. tauri*). En dépit d'un bon niveau de surexpression, il est intéressant de noter que l'activité de l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase n'engendre que très peu de variations chez *O. tauri* alors qu'elle engendre des variations plus importantes chez *N. benthamiana*. Il est possible que chez *O. tauri* cette activité soit masquée par la consommation du substrat 18:3 *n*-6 par la voie oméga 6 qui mène à la production de l'ARA puis du DHA. Ces VLC-PUFA ne varient pas dans les souches de surexpression d'*O. tauri*, Cependant étant donné que le niveau de DHA est très robuste dans la plupart des conditions de culture, le refroidissement mis à part, il est possible que le contenu en DHA produit en conditions standard soit régulé par dégradation. Il est également possible que cette activité acyl-CoA n'existe pas chez *O. tauri*. L'expression en système hétérologue peut également être à l'origine d'activité différentes qui n'existent pas en système natif pour des raisons de régulations: l'absence de régulation post-traductionnelle en raison de l'absence d'UTR ou

de machinerie de régulations post-traductionnelle incompatible comme une régulation de l'activité par dégradation ou phosphorylation qui doit avoir lieu à un moment donné, une nécessité de se dimériser.

La $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase, première D6 désaturase plastidiale identifiée

Le gène de la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase est un des plus exprimé par rapport aux autres désaturases chez *O. tauri* ; sa faible surexpression engendre le phénotype le plus marqué en comparaison à la surexpression des autres désaturases chez *O. tauri*, mais également chez *N. benthamiana* lorsqu'il est exprimée transitoirement. Localisée au chloroplaste, la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase travaille spécifiquement sur les lipides plastidiaux d'*O. tauri* et de *N. benthamiana* et possède une spécificité quasiment exclusive pour les substrats $\omega-3$. Le fait qu'elle soit inactive chez la levure malgré l'apport d'acides gras substrats (18:2 *n-6*, 18:3 *n-3*) laisse supposer une spécificité particulière de la désaturase vis-à-vis du substrat lipidique, très vraisemblablement plastidiale dans les deux systèmes et/ou inadéquation de donneur d'électron mais qui nous semble beaucoup moins probable puisque cette enzyme porte le Cytb5 qui potentiellement peut être 'rechargé' en électron par les oxydases cytoplasmiques de la levure. Chez *O. tauri* les combinaisons faisant intervenir le 18:4 augmentent chez tous les lipides plastidiaux PG, SQDG, MGDG et DGDG tandis que chez *N. benthamiana* l'augmentation des espèces en 18:4 sont observées uniquement dans la classe du PG et du MGDG, alors que les espèces 18:3- DGDG restent inchangées et ne sont apparemment pas substrat. Donc en système hétérologue végétal il semblerait que ni le DGDG ne soit substrat de la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase, ni que les espèces du MGDG contenant du 18:4 ne soient précurseurs à la synthèse du DGDG. Chez *O. tauri*, les modifications sur le DGDG sont retrouvées au niveau des couples associant le 18:3/4 *n-3* à un acide gras saturé en *sn-2* 14:0 et 16:0. Or pour la classe MGDG, ces couples précurseurs du DGDG très minoritaires (présents à l'état de trace en GC-FID et en ESI-MS/MS). Chez *O. tauri*, plusieurs hypothèses non-exclusives sont possibles quant à la spécificité de substrat de la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase : (i) le DGDG est substrat ; (ii) il existe une canalisation rapide des espèces du MGDG saturées en *sn-2* et désaturées par la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturases en *sn-1* vers le DGDG soit une sélection de substrat de DGDS ; (iii) une édition des acides gras du MGDG a lieu en position *sn-1* comme proposé avoir lieu chez *C. reinhardtii* (Li et al., 2012) augmenterait le 18:4 dans le pool d'acyl-ACP qui serait ensuite distribué aux lipides plastidiaux. Ces hypothèses sont évidemment spéculatives. De plus si il y avait un phénomène d'édition du MGDG, alors chez les lignées Ot10-E11 qui présentent au niveau du MGDG le même phénotype des espèces 18:X/16:4 que la lignée Ot05-D3, le 18:4 augmenterait dans le SQDG et PG comme pour la lignée Ot05-D3, ce qui n'est clairement pas le cas dans la lignée Ot10-E11. La $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase est également la seule des désaturases à provoquer une augmentation du 18:5 qui provient vraisemblablement de l'augmentation de l'espèce MGDG 18:5/16:4. Il est possible que la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase ait une activité $\Delta 3$ désaturase sur le MGDG 18:4/16:4 qui augmente. En revanche le contenu en DGDG 18:4/16:4 et DGDG 18:5/16:4 ne varie pas indiquant que l'activité $\Delta 6$ et $\Delta 3$ sur le 18:X lorsqu'il est associé au 16:4 est hautement spécifique du

MGDG. On peut se demander pourquoi la DGDS ne prend pas d'avantage en charge le MGDG 18:4/16:4 et 18:5/16:4 puisque leur proportion augmente dans le pool de MGDG et qu'ils sont naturellement présents dans le DGDG et représentent respectivement 10% et 2% des FA totaux, et qu'ils peuvent donc être substrat de la DGDS.

Par rapport à la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase l'autre $\Delta 6$ désaturase plastidiale, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$, désaturase semble posséder une spécificité différente car elle ne semble accepter que le MGDG et le DGDG chez *O. tauri* même si chez le *N. benthamiana*, elle travaille également sur le PG. Elle possède une spécificité pour les substrats $\omega-3$ très peu marquée contrairement à la $\Delta 6/\Delta 8S-1$ désaturase. De plus, elle ne possède/n'active pas d'activité $\Delta 3$ car dans les lignées Ot10 où le MGDG 18:4/16:4 augmente de la même manière que dans les lignées Ot05, celui-ci ne donne pas de MGDG 18:5/16:4 mais est pris en charge par la DGDS pour fournir du DGDG 18:4/16:4.

Conclusion et Perspectives

1 Caractéristiques majeures du glycérolipidome d'*O. tauri*

La picoalgue verte marine *Ostreococcus tauri* est un eucaryote minimal développé en système modèle et que nous avons établi comme modèle d'étude du métabolisme en chaînes acyles du glycérolipidome pour la classe des Mamiellophyceae. *O. tauri* présente des caractéristiques de composition en lipides et en FA mixtes entre les algues vertes et les Chromalveolates. Le DHA est confiné dans les lipides extraplastidiaux : le PDPT et le DGTA, tous deux marqueurs lipidiques des Chromalveolates. Le 16:4 *n*-3, PUFA typique des galactolipides des microalgues vertes, est un composant majoritaire des lipides extraplastidiaux et des galactolipides chez *O. tauri*. Les lipides plastidiaux sont caractérisés par une prépondérance de PUFA en C18 *n*-3, le 18:5 *n*-3 étant restreint aux galactolipides. Les triacylglycérols présentent tout le panel d'acides gras d'*O. tauri*.

2 Génération de la spécificité acyle des lipides

Quelles spécificités pour les GPAT et LPAAT?

Les lipides plastidiaux d'*O. tauri* présentent une signature procaryotique selon le dogme établi à partir des plantes terrestres (FA<18C en *sn*-2). Les lipides extraplastidiaux présentent une signature en *sn*-2 de type procaryotique (16:0 ou 16:X) et eucaryotique ((V)LC-PUFA). Contrairement aux plantes terrestres, on observe des espèces di-saturées abondantes dans les lipides plastidiaux notamment le PG et le SQDG, ce qui rappelle le cas du SQDG de *P. tricornutum* (Abida et al., 2015). La présence de combinaisons *sn*-1/*sn*-2 FA saturé/16:3 et FA saturé/16:4 fortement représentées dans le PDPT et dans une moindre mesure dans le DGTA est intrigante et, à notre connaissance, spécifique d'*O. tauri* (Degraeve-Guilbault et al., 2017). L'absence de LPAAT de type 2 (endosomale) et la présence d'une LPAAT soluble plastidiale, à l'instar des autres microalgues, poussent à s'interroger sur la signature 'eucaryotique' ou 'extraplastidiale' en *sn*-2 des glycérolipides. Cette LPAAT soluble d'*O. tauri*, conservée chez toutes les microalgues et chez *A. thaliana*, a été seulement étudiée chez *A. thaliana* (At4g24160) (Ghosh et al., 2009). La AtLPAAT soluble est prédite mitochondriale et plastidiale, utilise préférentiellement les 18:1-CoA et 18:0-CoA par rapport aux 14:0, 16:0 et 24:0 pour son activité LPAAT et présente également des activités lipase plus faibles. A ce jour nous n'avons pas trouvé de caractérisation de LPAAT soluble chez les microalgues et étudier celle d'*O. tauri* pourrait être une perspective intéressante. La vérification de la localisation plastidiale de l'enzyme pourrait être réalisée

par expression transitoire chez *N. benthamiana* comme nous l'avons fait pour les désaturases $\Delta 15$, acyl-CoA $\Delta 6$, $\Delta 6$ -8S-1 et $\Delta 6$ -8S-2 d'*O. tauri*. L'exploration de sa spécificité pourrait être réalisée à partir de protéines recombinantes solubles produites en système bactérien testées pour leur préférence de chaîne acyle comme cela a été fait pour la LPAAT1 membranaire de *C. reinhardtii* (Yamaoka et al., 2016). Il serait également judicieux de vérifier sa spécificité de substrat quant à l'accepteur de chaîne acyle, le LPA, comme dans Frentzen, (1998). Par ailleurs, il serait intéressant de pouvoir appréhender l'origine des espèces di-C16 extraplastidiales par exemple en effectuant des expériences de pulse/chase avec des isotopes radioactifs de différents précurseurs du 16:4n-3.

DGTA substrat des désaturases et/ou édition de ses chaînes acyles?

Les VLC-PUFA des glycérolipides structuraux sont cantonnés au PDPT et DGTA, mais seul le DGTA, lipides structural à la plus haute diversité combinatoire, possède des espèces moléculaires di-homo VLC-PUFA. Il est prioritaire de valider l'absence ou la présence de VLC-PUFA en position *sn*-1 du PDPT. L'analyse positionnelle de ce dernier a été difficile à réaliser en ESI-MS/MS, mais il est possible de chercher en HPLC-MS les transitions correspondantes aux PDPT porteur des combinaisons retrouvée dans le DGTA. Cette méthode pourrait nous permettre de statuer sur la présence de VLC-PUFA en *sn*-1 d'espèces minoritaires du PDPT.

La présence de VLC-PUFA en *sn*-1 sur le DGTA pourrait s'expliquer par deux hypothèses : (i) L'activité des désaturases $\Delta 4$ et $\Delta 5$ ayant été plutôt caractérisée en position *sn*-2 du lipide extraplastidial PC (Meyer et al., 2003), les désaturases agiraient alors chez *O. tauri* en position *sn*-2 du DGTA et également sur le PDPT générant des VLC-PUFA. Comme ces acides gras sont présents dans le pool d'acyl-CoA et dans les TAG notamment en position extérieure dans le TAG dont l'espèce minoritaire (22:6/22:6/22:6), un phénomène d'édition des VLC-PUFA en positions *sn*-2 du DGTA (et potentiellement du PDPT) doit probablement avoir lieu pour d'alimenter le pool d'acyl-CoA en VLC-PUFA. Les mécanismes d'édition des chaînes acyles ont d'ailleurs été étudiés dans un contexte d'accumulation des TAG mais il n'y a pas d'étude de ce type avec pour objectif d'étudier la diversité des lipides structuraux. Les longues chaînes acyles insaturées du pool d'acyl-CoA pourraient ensuite être utilisées par la GPAT microsomale et estérifiées en position *sn*-1 de squelette glycérol ; (ii) les désaturases pourraient ne pas avoir de préférence positionnelle et agir autant en *sn*-1 qu'en *sn*-2. Cela pourrait notamment être le cas si la spécificité de la GPAT microsomale ne lui permet pas d'utiliser les VLC-PUFA. Si l'absence de VLC-PUFA en position *sn*-1 du PDPT est confirmée, alors il convient de savoir comment les VLC-PUFA *sn*-1 DAG donnent exclusivement du DGTA. Plusieurs hypothèses sont ensuite envisageables : (i) La GPAT microsomale aurait une large spécificité et serait à l'origine de DAG porteurs d'acide gras en C16, C18 ou VLC-PUFA en *sn*-1. Les *sn*-1 VLC-PUFA *sn*-1 DAG seraient pris en charge / canalisés par la BTA1 pour former du DGTA et/ou ne seraient pas pris en charge

par le mécanisme de synthèse du PDPT ; (ii) La GPAT ne prend pas en charge les VLC-PUFA : nous pourrions alors supposer un mécanisme d'échange de chaînes acyles entre la position *sn*-1 du DGTA et sa position *sn*-2 où elles seraient modifiées, donc sans passer par la GPAT ; (iii) un mécanisme de transacylation entre LDGTA conduisant à la formation d'un DGTA pourrait exister à l'instar de l'activité LPCT détecté *in vitro* chez *A. thaliana* qui mène à la formation de PC à partir de deux lyso-PC (Lager 2015). Des expériences de charge/chasse avec l'acide arachidonique radiomarqué pourraient peut-être aider à éclairer les mécanismes de génération des différentes espèces de lipides extraplastidiaux.

Chez les microalgues, seules la GPAT plastidiale de *P. tricornutum* (Niu et al., 2016) et la GPAT endosomale de *L. incisa* (Iskandarov et al., 2016) ont été caractérisées à l'heure actuelle. La GPAT microsomale d'*O. tauri* pourrait être également étudiée pour sa capacité à accepter les VLC-PUFA, soit en système homologue par surexpression, ce qui l'avantage de pouvoir présenter toutes les chaînes acyles nécessaires au fonctionnement natif de la LPAAT en tenant compte des flux métabolique qui les fournissent à certaines concentrations (Niu et al., 2016; Payá-Milans et al., 2015), ou en système *in-vitro* avec un concentration en FA définie, où l'on s'affranchit de régulation endogène mais qui peut pousser à conclure à une spécificité différente par rapport aux expériences *in vivo* (Payá-Milans et al., 2015).

Origine des TAG?

Des combinaisons de types 'eucaryotiques' et 'procaryotiques' sont retrouvées dans les TAG, avec lors de carence azotée, une origine procaryotique/plastidiale favorisée. Un lien étroit d'échange carboné semble s'opérer en carence azote entre lipides plastidiaux, notamment MGDG et PG, et les TAG. Ce lien fait sans doute intervenir un échange de chaînes acyles, mais un échange de moitiés glycérol ne peut être exclu. Des analyses supplémentaires de marquage à l'acétate sur un temps de marquage plus long pour vérifier que la totalité des lipides soit marquée, pourraient éclaircir ce point. De la même manière, la mise en place d'un suivi de glycérol radiomarqué lors d'une cinétique de carence N est un élément essentiel à mettre en place afin de pouvoir déterminer plus précisément l'origine des DAG assurant la synthèse des TAG en carence. En carence azotée certains gènes de DGAT sont les plus activés transcriptionnellement *DGT2C*, *DGAT2D*, potentiellement *DGAT2A* et aucun de leur produit n'est prédit plastidial. Ces résultats doivent être confirmés avec des répliques biologiques mais il est essentiel d'aller plus loin dans la caractérisation de ces enzymes et de comprendre quels mécanismes sous-tendent l'accumulation de TAG particuliers en carence. Cela implique d'étudier notamment la localisation comme réalisée pour les désaturases et d'étudier la spécificité de substrats de ces DGAT. Cette spécificité fait intervenir à la fois la chaîne acyle ajoutée en *sn*-3, mais également le receveur de chaîne acyle, le DAG, et a bien été étudiée chez les DGAT de *C. reinhardtii* (Liu et al., 2016). Ces informations seraient également essentielles d'un point de vue biotechnologique pouvant permettre *in fine* la production d'huile de composition choisies : riches en oméga 3 (industrie des compléments

alimentaires) ou à courte chaîne saturées (industrie des bio carburant) par exemple. De plus, une étude protéomique des gouttelettes lipidiques (LD) est déjà en cours au sein du laboratoire afin de préciser quelles enzymes, potentiellement DGAT, sont directement associées à la formation de ces structures de stockage des TAG.

3 Rôle des C18 PUFA

Photosynthèse et fluidité : un challenge commun lors du refroidissement et de la carence en azotée ?

Les variations de températures (refroidissement) et de disponibilités en nutriment (azote et phosphate) sont fréquemment rencontrées dans la nature et chez *O. tauri*, elles impactent spécifiquement certains lipides et acides gras C18 PUFA. La carence azotée et la réponse à un abaissement de la température partagent des modifications similaires de leurs proportions en lipides plastidiaux qui concernent le PG, SQDG et DGDG, ainsi qu'une augmentation de la quantité de TAG (mais nettement plus marquée en carence azotée). Chez les microalgues certaines réponses métaboliques sont communes à des changements de l'environnement différents. Chez *O. tauri*, les cellules carencées et les cellules refroidies se distinguent de celles cultivées en conditions standard par une diminution de leur fluorescence chlorophyllienne. La carence azote est connue pour s'accompagner d'une création de ROS qui augmentent les dommages au photosystème II (PSII) générant un phénomène de photo-inhibition (Berges et al., 1996; Zhang et al., 2013). Ce phénomène de photo-inhibition qui survient également en cas de luminosité trop intense, est lié à un déséquilibre entre la vitesse de photo-dommage du PSII et sa vitesse de réparation (Allakhverdiev et al., 2009). Les dommages correspondent à l'inactivation du PSII par la lumière et la réparation consiste en une série d'étapes : dégradation de la protéine D1 dans le cœur réactionnel du PSII endommagé, synthèse du précurseur de la protéine D1 *de novo*, incorporation du précurseur dans le complexe du PSII, et transformation du précurseur en la protéine D1 mature. Les ROS inhibent notamment la réparation du PSII en supprimant la synthèse de protéine *de novo*, et notamment celle de la protéine D1 (Gururani et al., 2015). L'hypothèse classique est que la synthèse de TAG *de novo* sert absorber le NADPH via la synthèse de FA et dissiper ainsi les électrons en excès de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons et contrecarrer autant que possible la sur-réduction qui peut conduire à la formation de dangereux dérivés réactifs d'oxygène (ROS pour 'reactive oxygen species') préjudiciables à la photosynthèse. De plus, la carence azotée chez *O. tauri* se caractérise, comme la carence en phosphate, par une inhibition probable d'une activité $\Delta 6$ désaturase engendrant une diminution du 18:4 *n-3* et une augmentation de la teneur en 18:3. Il a été montré chez la cyanobactérie *Anacystis nidulens* que la carence en azote, de par la diminution du ratio protéine/lipide, affecte la fluidité des membranes (Gombos et al., 1987). On peut raisonnablement spéculer que les

ajustements en 18:3 et 18:4 chez *O. tauri* interviendraient (entre autre) pour maintenir la fluidité dans un état optimal (rigidification lors d'une baisse des protéines). Les basses températures quant à elles, entravent la maturation post-traductionnelle du précurseur de la protéine D1 qui est également dépendant du degré d'insaturation des membranes thylakoïdales (Allakhverdiev et al., 2009). En effet, l'augmentation de l'insaturation des acides gras est connue comme permettant d'atténuer la photo-inhibition en contrecarrant les effets de basse température sur la maturation du précurseur de D1 ; il n'est donc pas surprenant de voir chez *O. tauri* en réponse au froid, une augmentation de l'insaturation ses lipides plastidiaux. Le 18 le plus insaturé de chaque lipide plastidial augmente soit le 18:4 *n*-3 dans le SQDG et PG et le 18:5 dans le DGDG et MGDG, (phénomène le plus marqué pour les galactolipides qui sont majoritaires) ceci au détriment du 18:3 *n*-3 dans le PG, DGDG et MGDG qui indique l'activation probable d'une $\Delta 6$ et d'une $\Delta 3$ désaturase au froid. De plus, il est universellement reconnu que l'abaissement de température entraîne une rigidification des membranes. Le maintien de la fluidité des membranes plastidiales en réponse au froid par l'activation des désaturases est primordiale pour permettre un fonctionnement optimal de la photosynthèse par (i) le transport des électrons entre les transporteurs mobiles de la chaîne de transport des électrons plastidiaux tels que la plastoquinone ; (ii) la diffusion des gaz ; (iii) le turn-over de la protéine D1 qui ne doit pas être limité à basse température et (iv) la réduction des phénomènes de photo-inhibition liés à l'abaissement de la température (Allakhverdiev et al., 2009; Morgan-Kiss et al., 2006).

Acides en C18 : quels rôles physiologiques ?

Afin d'en savoir davantage sur l'importance des PUFA en C18 dans la fluidité et la photosynthèse et concernant un éventuel rôle particulier, le premier objectif concernant la suite de ces travaux est de continuer à éclairer les liens entre les voies métaboliques impliquées dans la régulation du contenu en FA chez *O. tauri*. Cela passe notamment par la caractérisation globale des désaturases d'*O. tauri* en système hétérologues (Projet PICO-FADO coordonné par F. Corellou et qui associe F. Domergue et J. Joubès au sein du LBM, en collaboration P. Durrens (LABRI, Bordeaux) I. Suzuki, (Tsukuba, Japon)). Les différents systèmes hétérologues envisagés sont : (i) le système levure (*s. Cerevisiae*, FA le plus insaturé 18:1) qui permet l'expression conjuguée de plusieurs désaturases et l'ajout de FA précurseurs choisis dans le milieu (feeding) ; (ii) *Nicotiana benthamiana* (FA les plus insaturés 16:3 *n*-3, 18:3 *n*-3) système photosynthétique, qui contient donc potentiellement les substrats lipidiques des désaturases chloroplastiques ou au moins proches (18:3/16:3 versus potentiellement 18:3/16:4) et permet une expression transitoire rapide à mettre en œuvre ainsi qu'une localisation subcellulaire aisée de protéine de fusion fluorescente ; (iii) *Synechocystis* PCC68003 qui est une cyanobactérie d'eau douce et un modèle historique pour l'étude des PUFAs et de leur rôle dans la fluidité membranaires et pour lequel tous les mutants de désaturases sont disponibles. Les combinaisons de galactolipides de *Synechocystis* sauvage se composent de 18:X/16:0. Ce modèle doit nous permettre en priorité d'étudier les désaturases

plastidiales d'*O. tauri*. (in col Pr. I. Suzuki, Tsukuba Japon) et notamment de tester la fonctionnalité des Cytb5 désaturases plastidiales en système procaryote, qui ne possède pas les systèmes de "recharge d'électron" des Cytb5 mais qui pourrait nous éclairer sur la potentialité des ferrédoxines à assumer ce rôle. Nous prévoyons d'exprimer certains candidats en système alternatif et complémentaire *C. reinhardtii* notamment pour étudier l'impact de l'expression de FA non endogène dans les membranes photosynthétique d'une microalgue verte (collaboration T. Li-Beisson). Les expériences des désaturases $\Delta 4$ et $\Delta 5$ en levure ayant fonctionné faiblement, il est possible que l'utilisation de séquences en codons optimisés pour la levure soit nécessaire. Pour la cyanobactérie et *C. reinhardtii* l'utilisation des codons a été optimisée. Au-delà du projet de caractérisation fonctionnelle des désaturases, ce sont les répercussions physiologiques du changement du profil en FA de lipides donnés (notamment en ce qui concerne la photosynthèse et/ou la fluidité membranaire) qui doivent être éclairées : quels sont les impacts des modifications en C18 lors de la carence et du froid ? Est-ce que ces acides gras peuvent avoir également un rôle physiologique particulier ? Pour répondre à ces questions, nous aimerions cibler notre approche sur le phénomène de refroidissement qui engendre une hausse du 18:5 faisant probablement intervenir une $\Delta 3$ désaturase inconnue, même si à l'heure actuelle, la surexpression de la $\Delta 6/\Delta 8-1$ (Ot05) d'*O. tauri* en système homologue montre une augmentations de la production du 18:5. Nos premiers résultats quant à la surexpression de l' $\omega 3\Delta 15$ n'indiquent pas de changement du profil de FA. Ot15 qui est la dernière $\Delta 6/\Delta 8-3$ désaturases à étudier représente un espoir. Il se peut également que les $\Delta 4$ désaturases d'*O. tauri* aient un rôle dans cette activité. La localisation de la $\Delta 4$ désaturase du ER est prédite plastidiale par l'analyse amont de sa séquence. Il est possible qu'une localisation potentiellement différentielle, lui permettent d'avoir plusieurs activités. Même si aucune des $\Delta 4$ désaturases n'est activée transcriptionnellement, il reste possible que ce mécanisme de régulation ne soit pas essentiel pour la désaturase responsable de la conversion du 18:4 en 18:5. D'autre part, étant donné que le 18:5 est uniquement retrouvé chez le MGDG et DGDG et que les espèces majoritaires sont 18:5/16:4, nous nous demandons si l'activité $\Delta 3$ désaturase a une spécificité de substrat liée uniquement à la tête du MGDG ou encore plus stricte c'est à dire liée à la présence de 16:4 en *sn*-2. La caractérisation de cette désaturase en système hétérologue nécessiterait donc d'exprimer plusieurs désaturase conjointement : la $\Delta 3$ désaturases et d'autres selon l'organisme, permettant d'obtenir du MGDG 18:4/16:4. Si ces approches portent leurs fruits et nous permettent d'identifier cette désaturase, il serait très intéressant de pouvoir obtenir un KO d'*O. tauri* afin d'analyser : (i) le profil en acides gras (ii) l'efficacité photosynthétique Fv/Fm notamment (une analyse rapide sera faite sur place et les analyses plus approfondies seront faite en collaboration avec le laboratoire de Cadarache) (iii) leur fluidité membranaire par l'utilisation du sonde TMA-DPH et d'un fluorimètre (déjà présent au laboratoire). La purification de membranes thylacoïdales est rapporté chez *Ostreococcus* ce qui nous permettrait d'effectuer ces mesure sur membrane thylacoïdales et d'évaluer plus précisément l'impact du changement en contenu en C18-PUFA

Bibliographie

A

Abida, H., Dolch, L.-J., Meï, C., Villanova, V., Conte, M., Block, M.A., Finazzi, G., Bastien, O., Tirichine, L., Bowler, C., et al. (2015). Membrane Glycerolipid Remodeling Triggered by Nitrogen and Phosphorus Starvation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* *167*, 118–136.

Ahmann, K., Heilmann, M., and Feussner, I. (2011). Identification of a Δ^4 -desaturase from the microalga *Ostreococcus lucimarinus*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *113*, 832–840.

Allakhverdiev, S.I., Los, D.A., and Murata, N. (2009). Regulatory Roles in Photosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids. In *Lipids in Photosynthesis*, H. Wada, and N. Murata, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 373–388.

An, M., Mou, S., Zhang, X., Ye, N., Zheng, Z., Cao, S., Xu, D., Fan, X., Wang, Y., and Miao, J. (2013). Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Bioresour. Technol.* *134*, 151–157.

Andrews, J., and Mudd, J.B. (1985). Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts: pathway and localization. *Plant Physiol.* *79*, 259–265.

Archibald, J. (2005). Jumping Genes and Shrinking Genomes – Probing the Evolution of Eukaryotic Photosynthesis with Genomics. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* *57*, 539–547.

Armada, I., Hachero-Cruzado, I., Mazuelos, N., Ríos, J.L., Manchado, M., and Cañavate, J.P. (2013). Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* *95*, 224–233.

Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and Joyard, J. (2001). 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. U. S. A.* *98*, 10960–10965.

B

Bafor, M., Smith, M.A., Jonsson, L., Stobart, K., and Stymne, S. (1991). Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem. J.* *280* (Pt 2), 507–514.

Bai, Y., McCoy, J.G., Levin, E.J., Sobrado, P., Rajashankar, K.R., Fox, B.G., and Zhou, M. (2015). X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase. *Nature* *524*, 252–256.

Baldauf, S.L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J Syst Evol* *46*, 263–273.

Banaś, W., Sanchez Garcia, A., Banaś, A., and Stymne, S. (2013). Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds. *Planta* *237*, 1627–1636.

- Barrero-Sicilia, C., Silvestre, S., Haslam, R.P., and Michaelson, L.V. (2017). Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Sci.* *263*, 194–200.
- Bates, P.D., and 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 J.* *68*, 387–399.
- Bates, P.D., and Browse, J. (2012). The Significance of Different Diacylglycerol Synthesis Pathways on Plant Oil Composition and Bioengineering. *Front. Plant Sci.* *3*.
- Bazan, N.G., Molina, M.F., and Gordon, W.C. (2011). Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Nutr.* *31*, 321–351.
- BeGora, M.D., Macleod, M.J.R., McCarry, B.E., Summers, P.S., and Weretilnyk, E.A. (2010). Identification of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Arabidopsis* and its role in choline and phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem.* *285*, 29147–29155.
- Behrenfeld, M.J., O'Malley, R.T., Siegel, D.A., McClain, C.R., Sarmiento, J.L., Feldman, G.C., Milligan, A.J., Falkowski, P.G., Letelier, R.M., and Boss, E.S. (2006). Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* *444*, 752–755.
- Behrenfeld, M.J., Westberry, T.K., Boss, E.S., O'Malley, R.T., Siegel, D.A., Wiggert, J.D., Franz, B.A., McClain, C.R., Feldman, G.C., Doney, S.C., et al. (2009). Satellite-detected fluorescence reveals global physiology of ocean phytoplankton. *Biogeosciences* *6*.
- Beisson, F., Koo, A.J.K., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J.J., Paddock, T., Salas, J.J., Savage, L., Milcamps, A., et al. (2003). *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiol.* *132*, 681–697.
- Benning, C. (2008). A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog. Lipid Res.* *47*, 381–389.
- Berges, J.A., Charlebois, D.O., Mauzerall, D.C., and Falkowski, P.G. (1996). Differential Effects of Nitrogen Limitation on Photosynthetic Efficiency of Photosystems I and II in Microalgae. *Plant Physiol.* *110*, 689–696.
- Bieniawska, Z., Espinoza, C., Schlereth, A., Sulpice, R., Hinch, D.K., and Hannah, M.A. (2008). Disruption of the *Arabidopsis* Circadian Clock Is Responsible for Extensive Variation in the Cold-Responsive Transcriptome. *Plant Physiol.* *147*, 263–279.
- Blanc-Mathieu, R., Verhelst, B., Derelle, E., Rombauts, S., Bouget, F.-Y., Carré, I., Château, A., Eyre-Walker, A., Grimsley, N., Moreau, H., et al. (2014). An improved genome of the model marine alga *Ostreococcus tauri* unfolds by assessing Illumina de novo assemblies. *BMC Genomics* *15*, 1103.
- Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., and Douce, R. (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* *258*, 13281–13286.
- Bopp, L., Aumont, O., Cadule, P., Alvain, S., and Gehlen, M. (2005). Response of diatoms distribution to global warming and potential implications: A global model study: DIATOMS AND CLIMATE CHANGE. *Geophys. Res. Lett.* *32*, n/a-n/a.

Botebol, H., Lelandais, G., Six, C., Lesuisse, E., Meng, A., Bittner, L., Lecrom, S., Sutak, R., Lozano, J.-C., Schatt, P., et al. (2017). Acclimation of a low iron adapted *Ostreococcus* strain to iron limitation through cell biomass lowering. *Sci. Rep.* 7.

Boudière, L., Botté, C.Y., 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, 2014.

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 BBA - Bioenerg.* 1837, 470–480.

Bourdon, J.A., Bazinet, T.M., Arnason, T.T., Kimpe, L.E., Blais, J.M., and White, P.A. (2010). Polychlorinated biphenyls (PCBs) contamination and aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist activity of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements: implications for daily intake of dioxins and PCBs. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 3093–3097.

Boyle, N.R., Page, M.D., Liu, B., Blaby, I.K., Casero, D., Kropat, J., Cokus, S.J., Hong-Hermesdorf, A., Shaw, J., Karpowicz, S.J., et al. (2012). Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 287, 15811–15825.

Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., and Vítová, M. (2011). Microalgae--novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 766–776.

Burdge, G.C., and Calder, P.C. (2005). Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 581–597.

Burki, F. (2014). The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016147.

Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D.V., Zlatogursky, V., Minh, B.Q., Radaykina, L.V., Smirnov, A., Mylnikov, A.P., and Keeling, P.J. (2016). Untangling the early diversification of eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proc. Biol. Sci.* 283.

C

Cañavate, J.P., Armada, I., Ríos, J.L., and Hachero-Cruzado, I. (2016). Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry* 124, 68–78.

Cardol, P., Bailleul, B., Rappaport, F., Derelle, E., Béal, D., Breyton, C., Bailey, S., Wollman, F.A., Grossman, A., Moreau, H., et al. (2008). An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7881–7886.

Chen, G., Snyder, C.L., Greer, M.S., and Weselake, R.J. (2011). Biology and Biochemistry of Plant Phospholipases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 30, 239–258.

Chen, G.-Q., Jiang, Y., and Chen, F. (2008). Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. *Food Chem.* 109, 88–94.

- Chen, J., Burke, J.J., Xin, Z., Xu, C., and Velten, J. (2006). Characterization of the Arabidopsis thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant Cell Environ.* *29*, 1437–1448.
- Chi, X., Zhang, X., Guan, X., Ding, L., Li, Y., Wang, M., Lin, H., and Qin, S. (2008). Fatty acid biosynthesis in eukaryotic photosynthetic microalgae: identification of a microsomal delta 12 desaturase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Microbiol. Seoul Korea* *46*, 189–201.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* *25*, 294–306.
- Chrétiennot-Dinet, M.-J., Courties, C., Vaquer, A., Neveux, J., Claustre, H., Lautier, J., and Machado, M.C. (1995). A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* *34*, 285–292.
- Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., and Bigogno, C. (2000). The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae (Portland Press Limited).
- Corellou, F. (2005). Atypical Regulation of a Green Lineage-Specific B-Type Cyclin-Dependent Kinase. *PLANT Physiol.* *138*, 1627–1636.
- Corellou, F., and Bouget, F.-Y. (2008). Expression of polypeptides from the nuclear genome of *ostreococcus* sp.
- Corellou, F., Schwartz, C., Motta, J.-P., Djouani-Tahri, E.B., Sanchez, F., and Bouget, F.-Y. (2009a). Clocks in the Green Lineage: Comparative Functional Analysis of the Circadian Architecture of the Picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell* *21*, 3436–3449.
- Corellou, F., Schwartz, C., Motta, J.-P., Djouani-Tahri, E.B., Sanchez, F., and Bouget, F.-Y. (2009b). Clocks in the Green Lineage: Comparative Functional Analysis of the Circadian Architecture of the Picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell* *21*, 3436–3449.
- Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.J., Neveux, J., Machado, C., and Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature* *370*, 255–255.
- Cronan, J.E., and Waldrop, G.L. (2002). Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog. Lipid Res.* *41*, 407–435.

D

- Dahlqvist, A., Ståhl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., and Stymne, S. (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6487–6492.
- Damude, H.G., Zhang, H., Farrall, L., Ripp, K.G., Tomb, J.-F., Hollerbach, D., and Yadav, N.S. (2006). Identification of bifunctional $\Delta 12/\omega 3$ fatty acid desaturases for improving the ratio of $\omega 3$ to $\omega 6$ fatty acids in microbes and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9446–9451.
- Das, U. (2006). Essential Fatty Acids - A Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *7*, 467–482.
- Degenkolbe, T., Giavalisco, P., Zuther, E., Seiwert, B., Hinch, D.K., and Willmitzer, L. (2012). Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *72*, 972–982.

- Degraeve-Guilbault, C., Bréhélin, C., Haslam, R., Sayanova, O., Marie-Luce, G., Jouhet, J., and Corellou, F. (2017). Glycerolipid Characterization and Nutrient Deprivation-Associated Changes in the Green Picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* *173*, 2060–2080.
- Delwiche, C.F., and Palmer, J.D. (1996). Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. *Mol. Biol. Evol.* *13*, 873–882.
- Dembitsky, V.M. (1996). Betaine ether-linked glycerolipids: Chemistry and biology. *Prog. Lipid Res.* *35*, 1–51.
- Demir-Hilton, E., Sudek, S., Cuvelier, M.L., Gentemann, C.L., Zehr, J.P., and Worden, A.Z. (2011). Global distribution patterns of distinct clades of the photosynthetic picoeukaryote *Ostreococcus*. *ISME J.* *5*, 1095.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynié, S., and Cooke, R. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 11647–11652.
- Djouani-Tahri, E.B., Sanchez, F., Lozano, J.-C., and Bouget, F.-Y. (2011). A phosphate-regulated promoter for fine-tuned and reversible overexpression in *Ostreococcus*: application to circadian clock functional analysis. *PLoS One* *6*, e28471.
- Doan, T.-T.Y., and Obbard, J.P. (2011). Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *J. Appl. Phycol.* *23*, 895–901.
- Dohmen, R.J., Madura, K., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1991). The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 7351–7355.
- Dolch, L.-J., and Maréchal, E. (2015). Inventory of Fatty Acid Desaturases in the Pennate Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* *13*, 1317–1339.
- Domergue, F. (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.
- Domergue, F., Lerchl, J., Zähringer, U., and Heinz, E. (2002). Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* *269*, 4105–4113.
- Domergue, F., Abbadi, A., Ott, C., Zank, T.K., Zähringer, U., and Heinz, E. (2003). Acyl Carriers Used as Substrates by the Desaturases and Elongases Involved in Very Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids Biosynthesis Reconstituted in Yeast. *J. Biol. Chem.* *278*, 35115–35126.
- Domergue, F., Abbadi, A., Zähringer, U., Moreau, H., and Heinz, E. (2005). In vivo characterization of the first acyl-CoA Δ 6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochem. J.* *389*, 483–490.
- Domínguez, H. (2013). Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals (Woodhead Publishing Limited).
- Dörmann, P. (2005). Membrane lipids. In *Plant Lipids. Biology, Utilization and Manipulation*, (Murphy D), p.

Dorne, A.J., Joyard, J., and Douce, R. (1990). Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 71–74.

Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., and Teixeira, J.A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy* *88*, 3331–3335.

Du, Z.-Y., and Benning, C. (2016). Triacylglycerol Accumulation in Photosynthetic Cells in Plants and Algae. In *Lipids in Plant and Algae Development*, (Springer, Cham), pp. 179–205.

Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., Dais, S.S., and Roessler, P.G. (1996). Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *57–58*, 223.

Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., and Barrett, S.M. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *161*, 115–134.

Dunstan, G.A., Brown, M.R., and Volkman, J.K. (2005). Cryptophyceae and rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. *Phytochemistry* *66*, 2557–2570.

Dyer, J.M., Chapital, D.C., Cary, J.W., and Pepperman, A.B. (2001). Chilling-Sensitive, Post-Transcriptional Regulation of a Plant Fatty Acid Desaturase Expressed in Yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *282*, 1019–1025.

Dyer, J.M., Chapital, D.C., Kuan, J.-C.W., Mullen, R.T., Turner, C., McKeon, T.A., and Pepperman, A.B. (2002). Molecular Analysis of a Bifunctional Fatty Acid Conjugase/Desaturase from *Tung*. Implications for the Evolution of Plant Fatty Acid Diversity. *Plant Physiol.* *130*, 2027–2038.

Dykes, C.W., Kay, J., and Harwood, J.L. (1976). Incorporation of choline and ethanolamine into phospholipids in germinating soya bean. *Biochem. J.* *158*, 575–581.

E

Eastmond, P.J., Quettier, A.-L., Kroon, J.T.M., Craddock, C., Adams, N., and Slabas, A.R. (2010). PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHOHYDROLASE1 and 2 Regulate Phospholipid Synthesis at the Endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis*[W]. *Plant Cell* *22*, 2796–2811.

Eichenberger, W., and Gribo, C. (1997). Lipids of *Pavlova lutheri*: cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry*.

Espinoza, C., Bieniawska, Z., Hinch, D.K., and Hannah, M.A. (2008). Interactions between the circadian clock and cold-response in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* *3*, 593–594.

Essigmann, B., Güler, S., Narang, R.A., Linke, D., and Benning, C. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 1950–1955.

F

Falcone, D.L., Gibson, S., Lemieux, B., and Somerville, C. (1994). Identification of a gene that complements an Arabidopsis mutant deficient in chloroplast omega 6 desaturase activity. *Plant Physiol.* *106*, 1453–1459.

Falkowski, P. (2012). Ocean Science: The power of plankton. *Nature* *483*, S17-20.

Fan, J., Andre, C., and Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* *585*, 1985–1991.

Feng, J., Dong, Y., Liu, W., He, Q., Daud, M.K., Chen, J., and Zhu, S. (2017). Genome-wide identification of membrane-bound fatty acid desaturase genes in *Gossypium hirsutum* and their expressions during abiotic stress. *Sci. Rep.* *7*, 45711.

Flaim, G., Obertegger, U., and Guella, G. (2012). Changes in galactolipid composition of the cold freshwater dinoflagellate *Borghiella dodgei* in response to temperature. *Hydrobiologia* *698*, 285–293.

Flügge, U.-I., Häusler, R.E., Ludewig, F., and Fischer, K. (2003). Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. *Physiol. Plant.* *118*, 475–482.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* *226*, 497–509.

Fourrier, N., Bédard, J., Lopez-Juez, E., Barbrook, A., Bowyer, J., Jarvis, P., Warren, G., and Thorlby, G. (2008a). A role for SENSITIVE TO FREEZING2 in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *55*, 734–745.

Fourrier, N., Bédard, J., Lopez-Juez, E., Barbrook, A., Bowyer, J., Jarvis, P., Warren, G., and Thorlby, G. (2008b). A role for SENSITIVE TO FREEZING2 in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in Arabidopsis. *Plant J.* *55*, 734–745.

Frentzen, M. (1998). Acyltransferases from basic science to modified seed oils. *Lipid Fett* *100*, 161–166.

Frentzen, M., Heinz, E., McKeon, T.A., and Stumpf, P.K. (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.

Fritz, M., Lokstein, H., Hackenberg, D., Welti, R., Roth, M., Zähringer, U., Fulda, M., Hellmeyer, W., Ott, C., Wolter, F.P., et al. (2007). Channeling of Eukaryotic Diacylglycerol into the Biosynthesis of Plastidial Phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* *282*, 4613–4625.

G

Gao, J., Ajjawi, I., Manoli, A., Sawin, A., Xu, C., Froehlich, J.E., Last, R.L., and Benning, C. (2009). FATTY ACID DESATURASE4 of Arabidopsis encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases: FATTY ACID DESATURASE4 of Arabidopsis encodes a distinct protein. *Plant J.* *60*, 832–839.

- Gargouri, M., Bates, P.D., Park, J.-J., Kirchhoff, H., and Gang, D.R. (2017). Functional photosystem I maintains proper energy balance during nitrogen depletion in *Chlamydomonas reinhardtii*, promoting triacylglycerol accumulation. *Biotechnol. Biofuels* 10.
- Ghosh, A.K., Chauhan, N., Rajakumari, S., Daum, G., and Rajasekharan, R. (2009). At4g24160, a Soluble Acyl-Coenzyme A-Dependent Lysophosphatidic Acid Acyltransferase. *PLANT Physiol.* 151, 869–881.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., and Somerville, C. (1994). Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106, 1615–1621.
- Gigon, A., Matos, A.-R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., and Pham-Thi, A.-T. (2004). Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann. Bot.* 94, 345–351.
- Giroud, C., Gerber, A., and Eichenberger, W. (1988). Lipids of *Chlamydomonas-Reinhardtii* – Analysis of Molecular-Species and Intracellular Site(S) of Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 29, 587–595.
- Gombos, Z., Kis, M., Páli, T., and Vigh, L. (1987). Nitrate starvation induces homeoviscous regulation of lipids in the cell envelope of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Eur. J. Biochem.* 165, 461–465.
- Goncalves, E.C., Wilkie, A.C., Kirst, M., and Rathinasabapathi, B. (2016). Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1649–1660.
- Gostincar, C., Turk, M., and Gunde-Cimerman, N. (2010). The evolution of fatty acid desaturases and cytochrome b5 in eukaryotes. *J. Membr. Biol.* 233, 63–72.
- Gostinčar, C., Turk, M., and Gunde-Cimerman, N. (2010). The Evolution of Fatty Acid Desaturases and Cytochrome b5 in Eukaryotes. *J. Membr. Biol.* 233, 63–72.
- Gould, S.B., Waller, R.F., and McFadden, G.I. (2008). Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 491–517.
- Gross, M. (2012). The mysteries of the diatoms. *Curr. Biol.* 22, R581–R585.
- Guihéneuf, F., Leu, S., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Khalilov, I., and Boussiba, S. (2011). Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: P. tricornutum DGAT1 cloning and characterization. *FEBS J.* 278, 3651–3666.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*, (Springer, Boston, MA), pp. 29–60.
- Guillard, R.R., and Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.
- Guillou, L., Eikrem, W., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedrós-Alió, C., and Vaulot, D. (2004). Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* 155, 193–214.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., and Tran, L.S.P. (2015). Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Mol. Plant* 8, 1304–1320.

H

- Hamilton, M.L., Haslam, R.P., Napier, J.A., and Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metab. Eng.* 22, 3–9.
- Harris, E.H. (2001). *CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363–406.
- Härtel, H., Dörmann, P., and Benning, C. (2000). DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10649–10654.
- Harwood, J.L. (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1301, 7–56.
- Harwood, J.L. (2005). Fatty acid biosynthesis. In *Plant Lipids : Biology, Utilisation and Manipulation*, (Oxford: D.J. Murphy (ed)), pp. 27–66.
- Harwood, J.L., and Guschina, I.A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91, 679–684.
- Hashimoto, K., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S., and Kanehisa, M. (2008). The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *J. Lipid Res.* 49, 183–191.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R., and Teale, A.J. (2001). A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14304–14309.
- Hayward, S.A.L., Manso, B., and Cossins, A.R. (2014). Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. *J. Exp. Biol.* 217, 6–15.
- Heilmann, I. (2004). Identification of the *Arabidopsis* Palmitoyl-Monogalactosyldiacylglycerol 7-Desaturase Gene FAD5, and Effects of Plastidial Retargeting of *Arabidopsis* Desaturases on the fad5 Mutant Phenotype. *PLANT Physiol.* 136, 4237–4245.
- Heilmann, I., Pidkowich, M.S., Girke, T., and Shanklin, J. (2004). Switching desaturase enzyme specificity by alternate subcellular targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10266–10271.
- Hema, R., Senthil-Kumar, M., Shivakumar, S., Chandrasekhara Reddy, P., and Udayakumar, M. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. *Planta* 226, 655–670.
- Henderson, G.P., Gan, L., and Jensen, G.J. (2007). 3-D Ultrastructure of *O. tauri*: Electron Cryotomography of an Entire Eukaryotic Cell. *PLOS ONE* 2, e749.
- Hocquellet, A., Joubès, J., Perret, A.-M., Lessire, R., and Moreau, P. (2005). Evidence for a different metabolism of PC and PE in shoots and roots. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 938–946.
- Hoepflinger, M.C., Geretschlaeger, A., Sommer, A., Hoeflberger, M., Hametner, C., Ueda, T., and Foissner, I. (2015). Molecular Analysis and Localization of CaARA7 a Conventional RAB5 GTPase from Characean Algae. *Traffic Cph. Den.* 16, 534–554.

Hoffmann, M., Hornung, E., Busch, S., Kassner, N., Ternes, P., Braus, G.H., and Feussner, I. (2007). A Small Membrane-peripheral Region Close to the Active Center Determines Regioselectivity of Membrane-bound Fatty Acid Desaturases from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 282, 26666–26674.

Hoffmann, M., Wagner, M., Abbadi, A., Fulda, M., and Feussner, I. (2008). Metabolic Engineering of ω 3-Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Production by an Exclusively Acyl-CoA-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 283, 22352–22362.

Hofmann, M., and Eichenberger, W. (1996). Biosynthesis of diacylglyceryl-N, N, N-trimethylhomoserine in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence for lipid-linked N methylation. *J. Bacteriol.* 178, 6140–6144.

Holzinger, A., and Karsten, U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.* 4, 327.

Hou, Q., Ufer, G., and Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress: Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 39, 1029–1048.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639.

Hwangbo, K., Ahn, J.-W., Lim, J.-M., Park, Y.-I., Liu, J., and Jeong, W.-J. (2013). Overexpression of stearoyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol. Rep.* 8.

Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Fuse, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., and Somerville, C. (1993). A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 268, 24099–24105.

I

Irigoien, X., Huisman, J., and Harris, R.P. (2004). Global biodiversity patterns of marine phytoplankton and zooplankton. *Nature* 429, 863–867.

Iskandarov, U., Sitnik, S., Shtaida, N., Didi-Cohen, S., Leu, S., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., and Boussiba, S. (2016). Cloning and characterization of a GPAT-like gene from the microalga *Lobosphaera incisa* (Trebouxiophyceae): overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* enhances TAG production. *J. Appl. Phycol.* 28, 907–919.

J

Jackson, F.M., Fraser, T.C.M., Smith, M.A., Lazarus, C., Stobart, A.K., and Griffiths, G. (1998). Biosynthesis of C18 polyunsaturated fatty acids in microsomal membrane preparations from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* 252, 513–519.

John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* 102, 186–193.

Jones, C.S., and Mayfield, S.P. (2012). Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 346–351.

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., and Block, M.A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* 167, 863–874.

Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Maréchal, E., and Rébeillé, F. (2017). LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLOS ONE* 12, e0182423.

Juergens, M.T., Deshpande, R.R., Lucker, B.F., Park, J.-J., Wang, H., Gargouri, M., Holguin, F.O., Disbrow, B., Schaub, T., Skepper, J.N., et al. (2015). The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 167, 558–573.

K

Kalanon, M., and McFadden, G.I. (2008). The chloroplast protein translocation complexes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a bioinformatic comparison of Toc and Tic components in plants, green algae and red algae. *Genetics* 179, 95–112.

Kato, M., Sakai, M., Adachi, K., Ikemoto, H., and Sano, H. (1996). Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry* 42, 1341–1345.

Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin. Drug Discov.* 2, 571–589.

Keeling, P.J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 729–748.

Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W., and Guillard, R.R.L. (1987). Media for the Culture of Oceanic Ultraphytoplankton. *J. Phycol. U. S.* 23:4.

Keogh, M.R., Courtney, P.D., Kinney, A.J., and Dewey, R.E. (2009). Functional characterization of phospholipid N-methyltransferases from *Arabidopsis* and soybean. *J. Biol. Chem.* 284, 15439–15447.

Khozin, I., Adlerstein, D., Bigongo, C., Heimer, Y.M., and 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. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. In *The Physiology of Microalgae*, M.A. Borowitzka, J. Beardall, and J.A. Raven, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 413–484.

Khozin-Goldberg, I., and Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67, 696–701.

Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Shayakhmetova, I., and Cohen, Z. (2002). Biosynthesis of Eicosapentaenoic Acid (epa) in the Freshwater Eustigmatophyte *Monodus Subterraneus* (eustigmatophyceae) I. *J. Phycol.* 38, 745–756.

Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., and Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 905–915.

- Khozin-Goldberg, I., Leu, S., and Boussiba, S. (2016). Microalgae as a Source for VLC-PUFA Production. In *Lipids in Plant and Algae Development*, Y. Nakamura, and Y. Li-Beisson, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 471–510.
- Kilian, O., Benemann, C.S.E., Niyogi, K.K., and Vick, B. (2011). High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 21265–21269.
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., and Lee, Y. (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 773–778.
- Kim, S.-H., Min Ahn, H., Rang Lim, S., Hong, S.-J., Cho, B.K., Lee, H., Lee, C., and Choi, H.-K. (2014). Comparative Lipidomic Profiling of Two *Dunaliella tertiolecta* Strains with Different Growth Temperatures under Nitrate-Deficient Conditions. *J. Agric. Food Chem.* *63*.
- Klaitong, P., Fa-aaroonsawat, S., and Chungjatupornchai, W. (2017). Accelerated triacylglycerol production and altered fatty acid composition in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *Microb. Cell Factories* *16*.
- Klug, R.M., and Benning, C. (2001). Two enzymes of diacylglycerol-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine biosynthesis are encoded by btaA and btaB in the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5910–5915.
- Kotajima, T., Shiraiwa, Y., and Suzuki, I. (2014). Functional screening of a novel $\Delta 15$ fatty acid desaturase from the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 1451–1458.
- Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C., and Jha, B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, pp. 87–134.
- Kunst, L., Browse, J., and Somerville, C. (1988). Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 4143–4147.
- Künzler, K., and Eichenberger, W. (1997). Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry* *46*, 883–892.
- Kutschera, U., and Niklas, K.J. (2005). Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci.* *124*, 1–24.
- Kutschera, U., and Niklas, K.J. (2008). Macroevolution via secondary endosymbiosis: a Neo-Goldschmidian view of unicellular hopeful monsters and Darwin's primordial intermediate form. *Theory Biosci. Theor. Den Biowissenschaften* *127*, 277–289.
- Lager, I., Yilmaz, J.L., Zhou, X.-R., Jasieniecka, K., Kazachkov, M., Wang, P., Zou, J., Weselake, R., Smith, M.A., Bayon, S., et al. (2013). Plant Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholine Acyltransferases (LPCATs) Have Different Specificities in Their Forward and Reverse Reactions. *J. Biol. Chem.* *288*, 36902–36914.

L

- Lager, I., Glab, B., Eriksson, L., Chen, G., Banas, A., and Stymne, S. (2015). 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* 241, 347–358.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., and Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol.* 11, 124.
- Larson, T.R., and Graham, I.A. (2001). Technical Advance: a novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 25, 115–125.
- Leblond, J.D., Dahmen, J.L., and Evens, T.J. (2010a). Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. IV. Temperature-induced modulation of fatty acid regiochemistry as observed by electrospray ionization/mass spectrometry. *Eur. J. Phycol.* 45, 13–18.
- Leblond, J.D., Timofte, H.I., Roche, S.A., and Porter, N.M. (2010b). Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of glaucocystophytes (Glaucophyta): A modern interpretation using positive-ion electrospray ionization/mass spectrometry/mass spectrometry. *Phycol. Res.* 58, 222–229.
- Lee, A.G. (2000). Membrane lipids: it's only a phase. *Curr. Biol. CB* 10, R377-380.
- Légeret, B., Schulz-Raffelt, M., Nguyen, H.M., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G., Blanc, G., and Li-Beisson, Y. (2016). Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids: Lipid remodelling under heat stress in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* 39, 834–847.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., and De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 1–46.
- Lenihan-Geels, G., Bishop, K., and Ferguson, L. (2013). Alternative Sources of Omega-3 Fats: Can We Find a Sustainable Substitute for Fish? *Nutrients* 5, 1301–1315.
- Levitan, O., Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D.S., Guerra, L.T., Kim, M.K., Kim, J., Van Mooy, B.A.S., Bhattacharya, D., and Falkowski, P.G. (2015). Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 412–417.
- Li, D., Moorman, R., Vanhercke, T., Petrie, J., Singh, S., and Jackson, C.J. (2016a). Classification and substrate head-group specificity of membrane fatty acid desaturases. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 14, 341–349.
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., Jing, X., Huang, S., Chen, J., Li, Y., et al. (2014a). Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *Plant Cell* 26, 1645–1665.
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., Jing, X., Huang, S., Chen, J., Li, Y., et al. (2014b). Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *Plant Cell* 26, 1645–1665.

- Li, N., Gügel, I.L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J., and Philippar, K. (2015). FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLoS Biol.* *13*, e1002053.
- Li, N., Xu, C., Li-Beisson, Y., and Philippar, K. (2016b). Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. *Trends Plant Sci.* *21*, 145–158.
- Li, R., Yu, K., and Hildebrand, D.F. (2010). DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids* *45*, 145–157.
- Li, X., Moellering, E.R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B.B., Kuo, M.-H., and 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-Beisson, Y., Shorosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T.P., et al. (2010). Acyl-Lipid Metabolism. *Arab. Book* *8*, e0133.
- Li-Beisson, Y., Beisson, F., and Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* *82*, 504–522.
- Li-Beisson, Y., Nakamura, Y., and Harwood, J. (2016). Lipids: From Chemical Structures, Biosynthesis, and Analyses to Industrial Applications. *Subcell. Biochem.* *86*, 1–18.
- Libisch, B., Michaelson, L.V., Lewis, M.J., Shewry, P.R., and Napier, J.A. (2000). Chimeras of Delta6-fatty acid and Delta8-sphingolipid desaturases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 779–785.
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G., and Shanklin, J. (1996). Crystal structure of delta9 stearyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J.* *15*, 4081–4092.
- Liu, J., Han, D., Yoon, K., Hu, Q., and Li, Y. (2016). Characterization of type 2 diacylglycerol acyltransferases in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals their distinct substrate specificities and functions in triacylglycerol biosynthesis. *Plant J.* *86*, 3–19.
- López García de Lomana, A., Schäuble, S., Valenzuela, J., Imam, S., Carter, W., Bilgin, D.D., Yohn, C.B., Turkarslan, S., Reiss, D.J., Orellana, M.V., et al. (2015). Transcriptional program for nitrogen starvation-induced lipid accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* *8*, 207.
- Los, D., and Mironov, K. (2015). Modes of Fatty Acid Desaturation in Cyanobacteria: An Update. *Life* *5*, 554–567.
- Los, D.A., and Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta* *1394*, 3–15.
- Los, D.A., Mironov, K.S., and Allakhverdiev, S.I. (2013). Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth. Res.* *116*, 489–509.
- Lu, C., Xin, Z., Ren, Z., Miquel, M., and Browse, J. (2009). An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18837–18842.

M

- Mahaffey, K.R., Clickner, R.P., and Jeffries, R.A. (2008). Methylmercury and omega-3 fatty acids: Co-occurrence of dietary sources with emphasis on fish and shellfish. *Environ. Res.* *107*, 20–29.
- Marin, B., and Melkonian, M. (2010). Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operons. *Protist* *161*, 304–336.
- Martin, G.J.O., Hill, D.R.A., Olmstead, I.L.D., Bergamin, A., Shears, M.J., Dias, D.A., Kentish, S.E., Scales, P.J., Botté, C.Y., and Callahan, D.L. (2014). Lipid Profile Remodeling in Response to Nitrogen Deprivation in the Microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLOS ONE* *9*, e103389.
- Martins, D., Custódio, L., Barreira, L., Pereira, H., Ben-Hamadou, R., Varela, J., and Abu-Salah, K. (2013). Alternative Sources of n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Microalgae. *Mar. Drugs* *11*, 2259–2281.
- Mashek, D.G., Li, L.O., and Coleman, R.A. (2007). Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. *Future Lipidol.* *2*, 465–476.
- Mason, R.P., Jacob, R.F., Shrivastava, S., Sherratt, S.C.R., and Chattopadhyay, A. (2016). Eicosapentaenoic acid reduces membrane fluidity, inhibits cholesterol domain formation, and normalizes bilayer width in atherosclerotic-like model membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1858*, 3131–3140.
- Massana, R. (2011). Eukaryotic Picoplankton in Surface Oceans. *Annu. Rev. Microbiol.* *65*, 91–110.
- Mattox, K., and Stewart, K. (1984). Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. *Irvine DEG John DM Systematics Association Special Volume*, 29–72.
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J., and Somerville, C. (1994). A Mutation at the *fad8* Locus of *Arabidopsis* Identifies a Second Chloroplast [omega]-3 Desaturase. *Plant Physiol.* *106*, 1609–1614.
- McCourt, P., Browse, J., Watson, J., Arntzen, C.J., and Somerville, C.R. (1985). Analysis of Photosynthetic Antenna Function in a Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Lacking trans-Hexadecenoic Acid. *Plant Physiol.* *78*, 853–858.
- McFadden, G.I., and van Dooren, G.G. (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr. Biol. CB* *14*, R514–516.
- Meesapyodsuk, D., and Qiu, X. (2012). The Front-end Desaturase: Structure, Function, Evolution and Biotechnological Use. *Lipids* *47*, 227–237.
- Mehrshahi, P., Johnny, C., and DellaPenna, D. (2014). Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER. *Trends Plant Sci.* *19*, 501–507.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* *318*, 245–250.

- Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., et al. (2001). Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* *293*, 290–293.
- Meyer, A., Cirpus, P., Ott, C., Schlecker, R., Zähringer, U., and Heinz, E. (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a Delta4-fatty acyl group desaturase. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 9779–9788.
- Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadi, A., Sperling, P., Bauer, J., Cirpus, P., Zank, T.K., Moreau, H., Roscoe, T.J., et al. (2004). Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* *45*, 1899–1909.
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R.R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Moellering, E.R., Zäuner, S., Cornish, A.J., Liu, B., et al. (2010). Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. *Plant Physiol.* *154*, 1737–1752.
- Misra, N., Panda, P.K., Parida, B.K., and Mishra, B.K. (2012). Phylogenomic study of lipid genes involved in microalgal biofuel production-candidate gene mining and metabolic pathway analyses. *Evol. Bioinforma. Online* *8*, 545–564.
- Misra, N., Panda, P.K., and Parida, B.K. (2014). Genome-wide identification and evolutionary analysis of algal LPAT genes involved in TAG biosynthesis using bioinformatic approaches. *Mol. Biol. Rep.* *41*, 8319–8332.
- Mock, T., and Kroon, B.M.A. (2002). Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry* *61*, 41–51.
- Moellering, E.R., and Benning, C. (2011). Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends Plant Sci.* *16*, 98–107.
- Moellering, E.R., Muthan, B., and Benning, C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* *330*, 226–228.
- Monnier, A., Liverani, S., Bouvet, R., Jesson, B., Smith, J.Q., Mosser, J., Corellou, F., and Bouget, F.-Y. (2010). Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. *BMC Genomics* *11*, 192.
- Moreau, H., Verhelst, B., Couloux, A., Derelle, E., Rombauts, S., Grimsley, N., Van Bel, M., Poulain, J., Katinka, M., Hohmann-Marriott, M.F., et al. (2012). Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinus* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biol.* *13*, R74.
- Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N.P.A. (2006). Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 222–252.
- Moulager, M., Corellou, F., Vergé, V., Escande, M.-L., and Bouget, F.-Y. (2010). Integration of Light Signals by the Retinoblastoma Pathway in the Control of S Phase Entry in the Picophytoplanktonic Cell *Ostreococcus*. *PLoS Genet.* *6*, e1000957.
- Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U.G., Bowler, C., Valentin, K., and Bhattacharya, D. (2009). Genomic Footprints of a Cryptic Plastid Endosymbiosis in Diatoms. *Science* *324*, 1724–1726.

Mühlroth, A., Li, K., Røkke, G., Winge, P., Olsen, Y., Hohmann-Marriott, M., Vadstein, O., and Bones, A. (2013). Pathways of Lipid Metabolism in Marine Algae, Co-Expression Network, Bottlenecks and Candidate Genes for Enhanced Production of EPA and DHA in Species of Chromista. *Mar. Drugs* *11*, 4662–4697.

Murata, N., and Wada, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* *308*, 1.

Muto, M., Tanaka, M., Liang, Y., Yoshino, T., Matsumoto, M., and Tanaka, T. (2015). Enhancement of glycerol metabolism in the oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris* JPC DA0580 to improve triacylglycerol productivity. *Biotechnol. Biofuels* *8*, 4.

N

Nakashima, S., Zhao, Y., and Nozawa, Y. (1996). Molecular cloning of delta 9 fatty acid desaturase from the protozoan *Tetrahymena thermophila* and its mRNA expression during thermal membrane adaptation. *Biochem. J.* *317* (Pt 1), 29–34.

Nakayama, T., and Archibald, J.M. (2012). Evolving a photosynthetic organelle. *BMC Biol.* *10*, 35.

Napier, J.A., Michaelson, L.V., and Sayanova, O. (2003). The role of cytochrome b 5 fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *68*, 135–143.

Napoléon, C., Raimbault, V., and Claquin, P. (2013). Influence of Nutrient Stress on the Relationships between PAM Measurements and Carbon Incorporation in Four Phytoplankton Species. *PloS One* *8*, e66423.

Na-Ranong, S., Laoteng, K., Kittakoop, P., Tanticharoen, M., and Cheevadhanarak, S. (2006). Targeted mutagenesis of a fatty acid Delta6-desaturase from *Mucor rouxii*: role of amino acid residues adjacent to histidine-rich motif II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *339*, 1029–1034.

Nguyen, H.M., Cuine, S., Beyly-Adriano, A., Legeret, B., Billon, E., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G., and Li-Beisson, Y. (2013). The Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Has a Single -3 Fatty Acid Desaturase That Localizes to the Chloroplast and Impacts Both Plastidic and Extrplastidic Membrane Lipids. *PLANT Physiol.* *163*, 914–928.

Niu, Y.-F., Wang, X., Hu, D.-X., Balamurugan, S., Li, D.-W., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2016). Molecular characterization of a glycerol-3-phosphate acyltransferase reveals key features essential for triacylglycerol production in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol. Biofuels* *9*.

Nosenko, T., Böndel, K.B., Kumpfmüller, G., and Stephan, W. (2016). Adaptation to low temperatures in the wild tomato species *Solanum chilense*. *Mol. Ecol.* *25*, 2853–2869.

Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Simon, N., Vaultot, D., and Probert, I. (2012). Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton. In *Advances in Botanical Research*, (Elsevier), pp. 1–53.

O

Ohlrogge, J., and Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* *7*, 957–970.

Ohlrogge, J.B., Kuhn, D.N., and Stumpf, P.K. (1979). Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 1194–1198.

Okayasu, T., Nagao, M., Ishibashi, T., and Imai, Y. (1981). Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* *206*, 21–28.

Ouyang, L.-L., Li, H., Yan, X.-J., Xu, J.-L., and Zhou, Z.-G. (2016). Site-Directed Mutagenesis from Arg195 to His of a Microalgal Putatively Chloroplastidial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Causes an Increase in Phospholipid Levels in Yeast. *Front. Plant Sci.* *7*.

P

Paini, J. (2013). TARGETING TRIACYLGLYCEROL PATHWAYS FOR METABOLIC ENGINEERING IN OIL-RICH MICRO-ALGAE.

Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., et al. (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 7705–7710.

Pan, X., Peng, F.Y., and Weselake, R.J. (2015). Genome-wide analysis of PHOSPHOLIPID:DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE (PDAT) genes in plants reveals the eudicot-wide PDAT gene expansion and altered selective pressures acting on the core eudicot PDAT paralogs. *Plant Physiol.* *167*, 887–904.

Parrish, C.C. (2013). Lipids in Marine Ecosystems. *ISRN Oceanogr.* *2013*, 1–16.

Patron, N.J., and Waller, R.F. (2007). Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *29*, 1048–1058.

Payá-Milans, M., Venegas-Calderón, M., Salas, J.J., Garcés, R., and Martínez-Force, E. (2015). Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of plastidial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* *111*, 27–36.

Peng, K.-T., Zheng, C.-N., Xue, J., Chen, X.-Y., Yang, W.-D., Liu, J.-S., Bai, W., and Li, H.-Y. (2014). Delta 5 Fatty Acid Desaturase Upregulates the Synthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 8773–8776.

Pereira, S.L., Huang, Y.-S., Bobik, E.G., Kinney, A.J., Stecca, K.L., Packer, J.C.L., and Mukerji, P. (2004). A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.* *378*, 665–671.

Petrie, J.R., Shrestha, P., Mansour, M.P., Nichols, P.D., Liu, Q., and Singh, S.P. (2010). Metabolic engineering of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in plants using an acyl-CoA $\Delta 6$ -desaturase with $\omega 3$ -preference from the marine microalga *Micromonas pusilla*. *Metab. Eng.* *12*, 233–240.

Petrie, J.R., Vanhercke, T., Shrestha, P., Tahchy, A.E., White, A., Zhou, X.-R., Liu, Q., Mansour, M.P., Nichols, P.D., and Singh, S.P. (2012). Recruiting a New Substrate for Triacylglycerol Synthesis in Plants: The Monoacylglycerol Acyltransferase Pathway. *PLOS ONE* *7*, e35214.

Petroutsos, D., Amiar, S., Abida, H., Dolch, L.-J., Bastien, O., Rébeillé, F., Jouhet, J., Falconet, D., Block, M.A., McFadden, G.I., 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.

Pflaster, E.L., Schwabe, M.J., Becker, J., Wilkinson, M.S., Parmer, A., Clemente, T.E., Cahoon, E.B., and Riekhof, W.R. (2014). A High-Throughput Fatty Acid Profiling Screen Reveals Novel Variations in Fatty Acid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and Related Algae. *Eukaryot. Cell* *13*, 1431–1438.

Pidkowich, M.S., Nguyen, H.T., Heilmann, I., Ischebeck, T., and Shanklin, J. (2007). Modulating seed beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II level converts the composition of a temperate seed oil to that of a palm-like tropical oil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4742–4747.

Popko, J., Herrfurth, C., Feussner, K., Ischebeck, T., Iven, T., Haslam, R., Hamilton, M., Sayanova, O., Napier, J., and Khozin-Goldberg, I. (2016). Metabolome analysis reveals betaine lipids as major source for triglyceride formation, and the accumulation of sedoheptulose during nitrogen-starvation of *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS One* *11*, e0164673.

Q

Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart, A.K., Napier, J.A., and Lazarus, C.M. (2002). Identification of a cDNA encoding a novel C18-Delta(9) polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. *FEBS Lett.* *510*, 159–165.

R

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlage, R.E., Boore, J.L., and Posewitz, M.C. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat. Commun.* *3*, 686.

Reddy, A.S., and Thomas, T.L. (1996). Expression of a cyanobacterial delta 6-desaturase gene results in gamma-linolenic acid production in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* *14*, 639–642.

Reddy, A.S., Nuccio, M.L., Gross, L.M., and Thomas, T.L. (1993). Isolation of a delta 6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Mol. Biol.* *22*, 293–300.

Reddy, V.S., Rao, D.K.V., and Rajasekharan, R. (2010). Functional characterization of lysophosphatidic acid phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 455–461.

Reed, D.W., Schäfer, U.A., and Covello, P.S. (2000). Characterization of the *Brassica napus* Extraplastidial Linoleate Desaturase by Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* *122*, 715–720.

Reverdatto, S., Beilinson, V., and Nielsen, N.C. (1999). A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean. *Plant Physiol.* *119*, 961–978.

Reynolds, K.B., Taylor, M.C., Zhou, X.-R., Vanhercke, T., Wood, C.C., Blanchard, C.L., Singh, S.P., and Petrie, J.R. (2015). Metabolic engineering of medium-chain fatty acid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* plant leaf lipids. *Front. Plant Sci.* *6*.

Riekhof, W.R., Ruckle, M.E., Lydic, T.A., Sears, B.B., and 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, W.R., Sears, B.B., and 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.

Riekhof, W.R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C., and Voelker, D.R. (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.

Rismani-Yazdi, H., Haznedaroglu, B.Z., Hsin, C., and Peccia, J. (2012). Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnol. Biofuels* *5*, 74.

Robbens, S., Derelle, E., Ferraz, C., Wuyts, J., Moreau, H., and Van de Peer, Y. (2007). The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 956–968.

Rodríguez, F., Derelle, E., Guillou, L., Le Gall, F., Vaultot, D., and Moreau, H. (2005). Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae): Ecotype diversity in the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Environ. Microbiol.* *7*, 853–859.

Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H., and Lang, B.F. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol. CB* *15*, 1325–1330.

Roleda, M.Y., Slocombe, S.P., Leahey, R.J.G., Day, J.G., Bell, E.M., and Stanley, M.S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour. Technol.* *129*, 439–449.

Rontein, D., Nishida, I., Tashiro, G., Yoshioka, K., Wu, W.I., Voelker, D.R., Basset, G., and Hanson, A.D. (2001). Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. *J. Biol. Chem.* *276*, 35523–35529.

S

Sakaki, T., Kondo, N., and Yamada, M. (1990a). Free Fatty acids regulate two galactosyltransferases in chloroplast envelope membranes isolated from spinach leaves. *Plant Physiol.* *94*, 781–787.

Sakaki, T., Kondo, N., and Yamada, M. (1990b). Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. *Plant Physiol.* *94*, 773–780.

Sakamoto, A., Sulpice, R., X. Hou, C., Kinoshita, M., I. Higashi, S., Kanaseki, T., Nonaka, H., Y. Moon, B., and Murata, N. (2004). Genetic modification of the fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol in chloroplasts alters the sensitivity of tobacco plants to cold stress. *Plant Cell Environ.* *27*, 99–105.

Sakurai, K., Moriyama, T., and Sato, N. (2014). Detailed identification of fatty acid isomers sheds light on the probable precursors of triacylglycerol accumulation in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* *13*, 256–266.

- Sato, N., and Moriyama, T. (2007). Genomic and Biochemical Analysis of Lipid Biosynthesis in the Unicellular Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*: Lack of a Plastidic Desaturation Pathway Results in the Coupled Pathway of Galactolipid Synthesis. *Eukaryot. Cell* 6, 1006–1017.
- Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M., and Sato, N. (2014). Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Plant Sci.* 5.
- Sato, N., Murata, N., Miura, Y., and Ueta, N. (1979). Effect of growth temperature on lipid and fatty acid compositions in the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 572, 19–28.
- Sato, N., Tsuzuki, M., Matsuda, Y., Ehara, T., Osafune, T., and Kawaguchi, A. (1995). Isolation and Characterization of Mutants Affected in Lipid Metabolism of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 230, 987–993.
- Sato, N., Fujiwara, S., Kawaguchi, A., and Tsuzuki, M. (1997). Cloning of a gene for chloroplast Δ^6 desaturase of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 1224–1232.
- Sato, N., Mori, N., Hirashima, T., and Moriyama, T. (2016). Diverse pathways of phosphatidylcholine biosynthesis in algae as estimated by labeling studies and genomic sequence analysis. *Plant J.* 87, 281–292.
- Sayanova, O., Beaudoin, F., Libisch, B., Shewry, P., and Napier, J. (2000). Mutagenesis of the borage Δ^6 fatty acid desaturase. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 636–638.
- Sayanova, O., Haslam, R.P., Calerón, M.V., López, N.R., Worthy, C., Rooks, P., Allen, M.J., and Napier, J.A. (2011). Identification and functional characterisation of genes encoding the omega-3 polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Phytochemistry* 72, 594–600.
- Sayanova, O., Ruiz-Lopez, N., Haslam, R.P., and Napier, J.A. (2012). The role of Δ^6 -desaturase acyl-carrier specificity in the efficient synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants: Acyl-CoA-dependent desaturases. *Plant Biotechnol. J.* 10, 195–206.
- Sayanova, O.V., Beaudoin, F., Michaelson, L.V., Shewry, P.R., and Napier, J.A. (2003). Identification of *Primula* fatty acid Δ^6 -desaturases with *n*-3 substrate preferences¹. *FEBS Lett.* 542, 100–104.
- Schaum, C.E., and Collins, S. (2014). Plasticity predicts evolution in a marine alga. *Proc R Soc B* 281, 20141486.
- Schaum, E., Rost, B., Millar, A.J., and Collins, S. (2013). Variation in plastic responses of a globally distributed picoplankton species to ocean acidification. *Nat. Clim. Change* 3, 298–302.
- Schneider, J.C., and Roessler, P. (1994). Radiolabeling Studies of Lipids and Fatty Acids in *Nannochloropsis* (eustigmatophyceae), an Oleaginous Marine Alga¹. *J. Phycol.* 30, 594–598.
- Schneider, G., Lindqvist, Y., Shanklin, J., and Somerville, C. (1992). Preliminary crystallographic data for stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed. *J. Mol. Biol.* 225, 561–564.
- Shaikh, S.R., Kinnun, J.J., Leng, X., Williams, J.A., and Wassall, S.R. (2015). How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: Insight from NMR studies of model systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848, 211–219.

- Shanklin, J., and Cahoon, E. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 611–641.
- Shanklin, J., and Somerville, C. (1991). Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2510–2514.
- Shanklin, J., Whittle, E., and Fox, B.G. (1994). Eight Histidine Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase. *Biochemistry (Mosc.)* 33, 12787–12794.
- Shanklin, J., Guy, J.E., Mishra, G., and Lindqvist, Y. (2009). Desaturases: Emerging Models for Understanding Functional Diversification of Diiron-containing Enzymes. *J. Biol. Chem.* 284, 18559–18563.
- Sharma, K.K., Schuhmann, H., and Schenk, P.M. (2012). High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* 5, 1532–1553.
- Shi (史海粟), H., Chen (陈海琴), H., Gu (顾震南), Z., Song (宋元达), Y., Zhang (张灏), H., Chen (陈卫), W., and Chen (陈永泉), Y.Q. (2015). Molecular mechanism of substrate specificity for delta 6 desaturase from *Mortierella alpina* and *Micromonas pusilla*. *J. Lipid Res.* 56, 2309–2321.
- Shockey, J.M., Gidda, S.K., Chapital, D.C., Kuan, J.-C., Dhanoa, P.K., Bland, J.M., Rothstein, S.J., Mullen, R.T., and Dyer, J.M. (2006). Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 18, 2294–2313.
- Siegenthaler, P.-A., and Trémolières, A. (1998). Role of Acyl Lipids in the Function of Photosynthetic Membranes in Higher Plants. In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, (Springer, Dordrecht), pp. 145–173.
- Siegler, H., Valerius, O., Ischebeck, T., Popko, J., Tourasse, N.J., Vallon, O., Khozin-Goldberg, I., Braus, G.H., and Feussner, I. (2017). Analysis of the lipid body proteome of the oleaginous alga *Lobosphaera incisa*. *BMC Plant Biol.* 17.
- Simionato, D., Block, M.A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., and 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.
- Simon, N., Cras, A.-L., Foulon, E., and Lemée, R. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C. R. Biol.* 332, 159–170.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56, 365–379.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233, 674–688.
- Simpson, J.P., and Ohlrogge, J.B. (2016). A Novel Pathway for Triacylglycerol Biosynthesis Is Responsible for the Accumulation of Massive Quantities of Glycerolipids in the Surface Wax of Bayberry (*Myrica pensylvanica*) Fruit. *Plant Cell* 28, 248–264.

- Singer, S., Chen, G., Mietkiewska, E., Tomasi, P., Jayawardhane, K., M Dyer, J., and J Weselake, R. (2016). Arabidopsis GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids. *J. Exp. Bot.* *67*.
- Six, C., Sherrard, R., Lionard, M., Roy, S., and Campbell, D.A. (2009). Photosystem II and Pigment Dynamics among Ecotypes of the Green Alga *Ostreococcus*. *PLANT Physiol.* *151*, 379–390.
- Smith, M.A., Dauk, M., Ramadan, H., Yang, H., Seamons, L.E., Haslam, R.P., Beaudoin, F., Ramirez-Erosa, I., and Forseille, L. (2013). Involvement of Arabidopsis ACYL-COENZYME A DESATURASE-LIKE2 (At2g31360) in the Biosynthesis of the Very-Long-Chain Monounsaturated Fatty Acid Components of Membrane Lipids. *PLANT Physiol.* *161*, 81–96.
- Somerville, C., and Browse, J. (1991). Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science* *252*, 80–87.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J., and Ohlrogge, J. (2000). Lipids. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones eds (Rockville, MD : American Society of Plant Physiologists), pp. 456–526.
- Song, L.-Y., Lu, W.-X., Hu, J., Yin, W.-B., Chen, Y.-H., Wang, B.-L., Wang, R.R.-C., and Hu, Z.-M. (2013). The role of C-terminal amino acid residues of a $\Delta 6$ -fatty acid desaturase from blackcurrant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *431*, 675–679.
- Song, L.-Y., Zhang, Y., Li, S.-F., Hu, J., Yin, W.-B., Chen, Y.-H., Hao, S.-T., Wang, B.-L., Wang, R.R.-C., and Hu, Z.-M. (2014). Identification of the substrate recognition region in the $\Delta 6$ -fatty acid and $\Delta 8$ -sphingolipid desaturase by fusion mutagenesis. *Planta* *239*, 753–763.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K., and Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *68*, 73–95.
- Sprecher, H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* *1486*, 219–231.
- Starikov, A.Y., Userbaeva, A.A., Lapina, S.S., Mironov, K.S., Maslova, I.P., Pchelkin, V.P., Zayadan, B.K., Sinetova, M.A., and Los, D.A. (2017). Substrate specificity of acyl-lipid $\Delta 9$ -desaturase from *Prochlorothrix hollandica* cyanobacterium producing myristoleic acid. *Russ. J. Plant Physiol.* *64*, 560–565.
- Stephens, E., Wolf, J., Oey, M., Zhang, E., Hankamer, B., and Ross, I.L. (2015). Genetic Engineering for Microalgae Strain Improvement in Relation to Biocrude Production Systems. In *Biomass and Biofuels from Microalgae*, N.R. Moheimani, M.P. McHenry, K. de Boer, and P.A. Bahri, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 191–249.
- Strobel, C., Jahreis, G., and Kuhnt, K. (2012). Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. *Lipids Health Dis.* *11*, 144.
- Stymne, S., and Stobart, A.K. (1984). Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* *223*, 305–314.
- Stymne, S., and Stobart, A.K. (1986). Biosynthesis of γ -linolenic acid in cotyledons and microsomal preparations of the developing seeds of common borage (*Borago officinalis*). *Biochem. J.* *240*, 385–393.

Subirana, L., Péquin, B., Michely, S., Escande, M.-L., Meilland, J., Derelle, E., Marin, B., Piganeau, G., Desdevises, Y., Moreau, H., et al. (2013). Morphology, Genome Plasticity, and Phylogeny in the Genus *Ostreococcus* Reveal a Cryptic Species, *O. mediterraneus* sp. nov. (Mamiellales, Mamiellophyceae). *Protist* 164, 643–659.

T

Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., et al. (2012). PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3625–3639.

Tasseva, G., Richard, L., and Zachowski, A. (2004). Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 566, 115–120.

Tatsuzawa, H., and Takizawa, E. (1995). Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry* 40, 397–400.

Tavares, S., Grotkjaer, T., Obsen, T., Haslam, R.P., Napier, J.A., and Gunnarsson, N. (2011). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Eicosapentaenoic Acid, Using a Novel 5-Desaturase from *Paramecium tetraurelia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1854–1861.

Teoh, M.-L., Chu, W.-L., Marchant, H., and Phang, S.-M. (2004). Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J. Appl. Phycol.* 16, 421–430.

Thompson, G.A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 17–45.

Thorlby, G., Fourier, N., and Warren, G. (2004). The SENSITIVE TO FREEZING2 Gene, Required for Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Encodes a β -Glucosidase. *Plant Cell* 16, 2192–2203.

Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., and Cossins, A.R. (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815–818.

Tirichine, L., and Bowler, C. (2011). Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth: Decoding algal genomes. *Plant J.* 66, 45–57.

To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lécureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., and Baud, S. (2012). WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in *Arabidopsis*[W]. *Plant Cell* 24, 5007–5023.

Tocher, D.R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* 41, 717–732.

Tonon, T., Sayanova, O., Michaelson, L.V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T.R., Li, Y., Napier, J.A., and Graham, I.A. (2005). Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*: Microalgal front-end desaturases. *FEBS J.* 272, 3401–3412.

Torres-Franklin, M.-L., Gigon, A., de Melo, D.F., Zuily-Fodil, Y., and Pham-Thi, A.-T. (2007). Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol. Plant.* 0, 070607052959001–???

Trentacoste, E.M., Martinez, A.M., and Zenk, T. (2015). The place of algae in agriculture: policies for algal biomass production. *Photosynth. Res.* 123, 305–315.

Turchetto-Zolet, A.C., Maraschin, F.S., de Morais, G.L., Cagliari, A., Andrade, C.M.B., Margis-Pinheiro, M., and Margis, R. (2011). Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 11, 263.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B., and Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed. Pap.* 155, 117–130.

U

Unitt, M.D., and Harwood, J.L. (1985). Sidedness studies of thylakoid phosphatidylglycerol in higher plants. *Biochem. J.* 228, 707–711.

Usher, S., Han, L., Haslam, R.P., Michaelson, L.V., Sturtevant, D., Aziz, M., Chapman, K.D., Sayanova, O., and Napier, J.A. (2017). Tailoring seed oil composition in the real world: optimising omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid accumulation in transgenic *Camelina sativa*. *Sci. Rep.* 7.

V

Vaezi, R., Napier, J., and Sayanova, O. (2013). Identification and Functional Characterization of Genes Encoding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthetic Activities from Unicellular Microalgae. *Mar. Drugs* 11, 5116–5129.

Valledor, L., Furuhashi, T., Hanak, A.-M., and Weckwerth, W. (2013). Systemic Cold Stress Adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 2032–2047.

Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblížek, M., Lomas, M.W., Mincer, T.J., Moore, L.R., Moutin, T., et al. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458, 69–72.

Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M., and Moreau, H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 795–820.

Vieler, A., Wu, G., Tsai, C.-H., Bullard, B., Cornish, A.J., Harvey, C., Reza, I.-B., Thornburg, C., Achawanantakun, R., Buehl, C.J., et al. (2012). Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genet.* 8, e1003064.

Voelker, D.R. (1997). Phosphatidylserine decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 236–244.

Voelker, T., and Kinney, A.J. (2001). VARIATIONS IN THE BIOSYNTHESIS OF SEED-STORAGE LIPIDS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 335–361.

Vogel, G., and 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.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 33, 949–956.

W

Wada, H., and Murata, N. (2006). *Membrane Lipids in Cyanobacteria*. pp. 65–81.

Wada, H., and Murata, N. (2007). The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 92, 205–215.

Wagner, M., Hoppe, K., Czabany, T., Heilmann, M., Daum, G., Feussner, I., and Fulda, M. (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 407–416.

Wallis, J.G., and Browse, J. (1999). The Delta8-desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 307–316.

Wallis, J.G., Watts, J.L., and Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27, 467.

Wang, D., Ning, K., Li, J., Hu, J., Han, D., Wang, H., Zeng, X., Jing, X., Zhou, Q., Su, X., et al. (2014). *Nannochloropsis* Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits. *PLoS Genet.* 10.

Wang, H., Klein, M.G., Zou, H., Lane, W., Snell, G., Levin, I., Li, K., and Sang, B.-C. (2015). Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 581–585.

Ward, O.P., and Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627–3652.

White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., and Rock, null (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 791–831.

Wilhelm, C., Eisenbeis, G., Wild, A., and Zahn, R. (2014). *Nannochlorum eucaryotum*: a Very Reduced Coccoid Species of Marine Chlorophyceae. *Z. Für Naturforschung C* 37, 107–114.

X

Xu, C., Härtel, H., Wada, H., Hagio, M., Yu, B., Eakin, C., and Benning, C. (2002). The *pgp1* Mutant Locus of *Arabidopsis* Encodes a Phosphatidylglycerolphosphate Synthase with Impaired Activity. *Plant Physiol.* 129, 594–604.

Xu, J., Carlsson, A.S., Francis, T., Zhang, M., Hoffman, T., Giblin, M.E., and Taylor, D.C. (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol.* 12, 4.

Xue, J., Niu, Y.-F., Huang, T., Yang, W.-D., Liu, J.-S., and Li, H.-Y. (2015). Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. *Metab. Eng.* 27, 1–9.

Y

Yamaoka, Y., Achard, D., Jang, S., Legéret, B., Kamisuki, S., Ko, D., Schulz-Raffelt, M., Kim, Y., Song, W.-Y., Nishida, I., et al. (2016). Identification of a *Chlamydomonas* plastidial 2-lysophosphatidic acid acyltransferase and its use to engineer microalgae with increased oil content. *Plant Biotechnol. J.* *14*, 2158–2167.

Yang, W., Mason, C.B., Pollock, S.V., Lavezzi, T., Moroney, J.V., and Moore, T.S. (2004). Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: expression and characterization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase. *Biochem. J.* *382*, 51–57.

Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., and Ohlrogge, J. (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12040–12045.

Yang, W., Simpson, J.P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B. (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in Arabidopsis: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. *PLANT Physiol.* *160*, 638–652.

Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., and Hu, Q. (2012). Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Is a Multifunctional Enzyme Involved in Membrane Lipid Turnover and Degradation While Synthesizing Triacylglycerol in the Unicellular Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* *24*, 3708–3724.

Yu, B., and Benning, C. (2003). Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *36*, 762–770.

Yu, B., Xu, C., and Benning, C. (2002). Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5732–5737.

Yurchenko, O.P., Park, S., Ilut, D.C., Inmon, J.J., Millhollon, J.C., Liechty, Z., Page, J.T., Jenks, M.A., Chapman, K.D., Udall, J.A., et al. (2014). Genome-wide analysis of the omega-3 fatty acid desaturase gene family in *Gossypium*. *BMC Plant Biol.* *14*, 312.

Z

Zauner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., and Benning, C. (2012). A Cytochrome b5-Containing Plastid-Located Fatty Acid Desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* *11*, 856–863.

Zhang, M., Fan, J., Taylor, D.C., and Ohlrogge, J.B. (2009a). DGAT1 and PDAT1 Acyltransferases Have Overlapping Functions in Arabidopsis Triacylglycerol Biosynthesis and Are Essential for Normal Pollen and Seed Development. *Plant Cell* *21*, 3885–3901.

Zhang, P., Liu, S., Cong, B., Wu, G., Liu, C., Lin, X., Shen, J., and Huang, X. (2011). A novel omega-3 fatty acid desaturase involved in acclimation processes of polar condition from Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Mar. Biotechnol. N. Y. N* *13*, 393–401.

Zhang, X., Wei, D., Li, M., Qi, Y., and Xing, L. (2009b). Evolution-related amino acids play important role in determining regioselectivity of fatty acid desaturase from *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep.* *36*, 567–573.

Zhang, Y.-M., Chen, H., He, C.-L., and Wang, Q. (2013). Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PLoS ONE* 8.

Zhou, X.-R., Robert, S.S., Petrie, J.R., Frampton, D.M.F., Mansour, M.P., Blackburn, S.I., Nichols, P.D., Green, A.G., and Singh, S.P. (2007). Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 68, 785–796.

Zienkiewicz, K., Du, Z.-Y., Ma, W., Vollheyde, K., and Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 1269–1281.

Zienkiewicz, K., Zienkiewicz, A., Poliner, E., Du, Z.-Y., Vollheyde, K., Herrfurth, C., Marmon, S., Farré, E.M., Feussner, I., and Benning, C. (2017). Nannochloropsis, a rich source of diacylglycerol acyltransferases for engineering of triacylglycerol content in different hosts. *Biotechnol. Biofuels* 10, 8.

Annexes

Annexe 1 : Microalgues transformables et systèmes utilisés (Stephens et al., 2015)

Abréviations : A, *Agrobacterium* ; B, biolistique ; E, électroporation ; G, billes en verre ; S, fibres de carbures de silicium ; PT, transformation de protoplaste ; PEG, avec du polyéthylène glycol.

Compartment	Phylum	Class	Species	Method	References			
Nuclear	Chlorophyta	Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	A, B, E, G, S	Debauchy et al. (1989) Danahay (1993) and Kindl et al. (1989) Kindl (1990), Kumar et al. (2004) and Mayfield and Kindl (1990) Rochaix and Vandillewijn (1982), Shimogawara et al. (1998) and Fernandez et al. (1989) Molnar et al. (2009) and Stevens et al. (1996) Berthold et al. (2002) and Sizova et al. (2001) Cerutti et al. (1997a) Goldschmidt-Clermont (1991) Schroda et al. (2000)			
				B, E, G	Feng et al. (2009) and Geng et al. (2004) Sun et al. (2005) and Wang et al. (2007) Tan et al. (2005) and Li et al. (2007)			
				B	Lerche and Hallmann (2013)			
				B	Lerche and Hallmann (2009)			
				A, B	Teng et al. (2002) Kathiresan et al. (2009) and Steinbrener and Sandmann (2006)			
					Hallmann and Rappel (1999) and Hallmann and Sumper (1994) Hallmann and Sumper (1996) and Jakobiak et al. (2004) (Schiellmeier et al. 1994)			
				PT-E	Jarvis and Brown (1991) and Kim et al. (2002) Bai et al. (2013) and Liu et al. (2013)			
				PT-E	Maruyama et al. (1994)			
				B	Dawson et al. (1997) and Hawkins and Nakamura (1999)			
				B	Hawkins and Nakamura (1999)			
			Dinoflagellate	Dinophyceae	<i>Amphidinium</i> spp.	S	ten Lobnis and Miller (1998)	
					<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	S	ten Lobnis and Miller (1998)	
			Heterokontophyta	Bacillariophyceae (diatoms)	<i>Chaetoceros salinus</i>	B	Miyagawa-Yamaguchi et al. (2011)	
			Chloroplast	Chlorophyta	Chlorophyceae	<i>Chaetoceros debilis</i>	B	Miyagawa-Yamaguchi et al. (2011)
							B	Miyagawa-Yamaguchi et al. (2011)
							B	Miyagawa-Yamaguchi et al. (2011)
							B	Danahay et al. (1995)
							B	Fischer et al. (1999) and Poulsen and Krøger (2005)
							B	Danahay et al. (1995)
							B	Apt et al. (1996), De Riso et al. (2009), Falcione et al. (1999) and Zaslavskaja et al. (2000) Miyagawa et al. (2009), Sakaguchi et al. (2011) and Zaslavskaja et al. (2001)
B	Falcione et al. (1999)							
B	Poulsen et al. (2006)							
E, A, E	Cha et al. (2011) and Kilian et al. (2011)							
E	Li et al. (2014) and Radakovits et al. (2012)							
E	Li et al. (2014)							
PT-E	Chen et al. (2008), Li et al. (2014) and Li and Tsai (2009)							
E	Vicler et al. (2012) and Li et al. (2014)							
E	Li et al. (2014)							
Rhodophyta	Cyanidiphyceae	<i>Cyanidioschyzon merckii</i>				E, PEG	Fujiwara et al. (2013), Minoda et al. (2004) and Ohnuma et al. (2008), (2009)	
Mitochondria	Chlorophyta	Chlorophyceae				<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	B, G	Boynton et al. (1988) and O'Neill et al. (2012)
							B	Gutierrez et al. (2012)
							B	Purton et al. (2013)
							B	Purton et al. (2013)
			B	Cui et al. (2014)				
			B	Doetsch et al. (2001)				
			B	Lapidot et al. (2002)				
			B	Randolph-Anderson et al. (1993), Remacle et al. (2006) and Yamasaki et al. (2005)				

Annexe 2 : Tableau des amorces utilisées pour le clonage.

Les sites de restrictions Apal et AvrII sont utilisés en vue de l'expression en système homologue. Les amorces attB sont utilisées en vue de l'expression en système hétérologue.

Famille	Fonction	Locus	Nom	Code	Séquence (5' -> 3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)
désaturases	ω3-Δ15	Ot103g03040	Apal-fw	P5305	GGGCCCATGCGCCGCGACGTC	67	1488
			AvrII-rv	P5242	CCTAGGCTAGTCGCCCGCTCCAGAC	66	
			attB1-FR	P5317	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAATGCGCGCCGCGACG	64	1537
			attB2-FR	P5318	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTCCGCCGCTCCAG	62	
			attB2-stop	P5319	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTAGTCGCCCGCTCCAG	64	1540
			attB2-NtermSP-FR	P5320	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCCGGCATCGCGCC	64	
	Acyl-CoA Δ6	Ot113g01070	Apal-fw	P5303	GGGCCCATGTCGTGGAGACGGAAAAATAACGATG	66	1383
			AvrII-rv	P5393	CCTAGGTTACGCCGCTTTCCGGAGTGTG	65	
			attB1-FR	P5312	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAATGTCGTGGAGACGGAAAAATAAC	62	1432
			attB2-FR	P5313	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCGTCTTTCCGGAGTGT	63	
			Apal-fw	P5390	GGGCCCATGCGTCGTGGTGGCGG	67	1452
			AvrII-rv	P5391	CCTAGGTCACGCCGCTTCGCCACTC	67	
	Un Δ6/Δ8S-1	Ot105g00190	attB1-FR	P3437	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAATGCGCTCGTGGTGGG	62	1447
			attB2-FR	P5310	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCGCCTTCGCCACTC	64	
			attB2-stop	P5438	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCACGCCCGCTTCGCC	63	1450
			AvrII-fw	P5307	CCTAGGATGCGCGCGCTCGACCTC	66	
	Un Δ6/Δ8S-2	Ot110g02610	AvrII-rv	P5269	CCTAGGTCACACAGCGAGATTGCTCCAGC	65	1515
			attB1-FR	P5439	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAATGCGCGCGCTCGACC	64	
			attB2-FR	P5440	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACAGCGGAGATTGCTCCAGC	63	1495
			attB2-stop	P5441	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCACAGCGGAGATTGCTCCAG	63	

Annexe 3 : Tableau des amorces utilisées pour les qPCR.

Les séquences des amorces sens (S) et anti-sens (AS) sont données pour chaque gène.

Famille	Gene	Locus	Position de l'amorce	Code	Séquence (5' -> 3')	Amplificon (pb)
gènes de ménage	Protéine ribosomale L23 (Rpl 23)	OstapCp32	S AS	P5104 p5105	CCTAGTGC GGCAAATCGACA TCCGGTTCTCTCGCTACTT	100
	Portéine ribosomale L17 (Rpl 17)	Ot06g00010	S AS	P5106 P5107	GCGTTACACGTTTCGATGTGG GTGCGTATTTACCGCAACCA	99
	Ubiquitine protéine ligase RSP5/NEDD4	Ot15g01790	S AS	P5108 P5109	CCGGATCTGCGACAAGATGT GATCACGAACGGGGGATTGA	93
	E3 ubiquitine proteine ligase UPL1	Ot13g03080	S AS	P5110 P5111	GTAGACTCGTGGGTAAGGCG CTTGATAGTCGGCCGTGTGA	71
	Calmoduline (Cal)	Ot18g00850	S AS	P5112 P5113	CGGGATGTTTTGCGGTGTT CGTCAATTTCTCCCCACGA	96
	Facteur d'initiation eucaryotique 4 (eIF4)	Ot01g01600	S AS	P5114 P5115	CCGAGCAAGCGGATCAAAAAG GGAGACGCACAACAGAGCTT	86
	Cytochrome C oxidase sous-unité 2 (Cox)	OstapMp32	S AS	P5116 P5117	ATTGTGTGGACGATCACCCC CGAAGGGTCAACGATTTTCATC C	96
	Actine (Act_Colsc actin)	Ot16g00370	S AS	P5118 P5119	TTGGCGCGAAAAAGTATGT AGCTGATCGAACTCACGGAA	98
	Protéine liée à l'actine 2 (Arp2)	Ot14g03380	S AS	P5120 P5121	ATCGTTTCGGCGGATATGGAG CGTCTCTCGCGCCAATTGTA	98
	Chaîne bêta de la tubuline (TBB1_VOLCA) (partielle)	Ot01g04230	S AS	P5122 P5123	CGCACGTTGACTCGTGAATTT TCGAGATCCATTAGCACGGC	86
	Facteur d'élongation 1 α (EF1 α)	Ot04g05560	S AS	P4406 P4407	GTGCCGTGATAAAGCCGAAC GCCGACTGCCATCGTTTTAC	158
désaturases	Acyl-CoA Δ 6 (Ot13.1)	Ot13g01070	S AS	P4537 P4538	TCGACATCGATCCGAGTCAAG CGGAAAGAGGTGGTGGATGA	80
	Δ 4 RE (Ot01)	Ot01g00780	S AS	P4539 P4540	AATCGAGCACCACTCTTCC TTTCGCACACTCGTCCTTGA	82
	Δ 12-2 (Ot17.1)	Ot17g02110	S AS	P4541 P4542	GAGGCGTATCCCGACCTCTA CGTCTCCCTTCTTCACGACG	100
	Un Δ 6/ Δ 8S-1 (Ot05)	Ot05g00190	S AS	P4543 P4544	CTGTGGGGTGGTATGGACAC AGACTTTAAGAGCGGCCGAA	93
	Un Δ 6/ Δ 8S-3 (Ot15)	Ot15g01140	S AS	P4545 P4546	CCCTTCGCGAAAAGAATGG GCTTGAGCGTTCGAAACACC	82
	Un Δ 6/ Δ 8S-2 (Ot10)	Ot10g02610	S	P4547	TTACCGTCATCTCGAAGGCA	99
			AS	P4548	CGACGCGAGAAACCAACTTT	
			S	P5905	CGATGGTTCTGGGGTGGAAAT	183
			AS	P5906	GATGCCTTCGAGATGACGGT	
	ω 3 Δ 15 (Ot03)	Ot03g03040	S AS	P4549 P4550	CCGCGTGTCAAGGCTGTCTG TTGCCAACCATGACGTCCGC	98
	SAD Δ 9 (Ot04)	Ot04g03720	S	P4551	TTCGCTTTCTCCCGACCTC	80
AS			P4552	CTGAACATTCGCGAGTTGGC		
Un RE (Ot12.1)	Ot12g01900	S	P4553	TACCAGAGCAGTTCTTGGCG	84	
		AS	P4554	CGACGTCGAAGAACCCAACA		

	MGDG Δ7 (17.2)	Ot17g02260	S AS	P4555 P4556	GAGTAAGGCTGAGGGTCCCCG CACCTGTCGTGTTGCCAGA	81
	Δ5 (Ot12.2)	Ot12g02780	S AS	P4557 P4558	GTCGTCCACCATCTCTTCCC TTCTCAGCTGCCGCCTTAAT	80
	Δ12-1 (Ot02)	Ot02g07730	S AS	P4559 P4560	GTACGATCCCACGCCGATTT GAACGTCCACATCGCATCCT	100
	Δ4 p (Ot13.2)	Ot13g01600	S AS	P4565 P4566	TTTAGCGTCCCGTTGTTGC AGCTTAGCGCCTTCGGTATC	84
	FAD4 (Ot05)	Ot09g03210	S AS	P4567 P4568	TGATTTTCAAGGCAACCGGC CTTCCGGTGCGTCTTCTTGA	81
élongases	élongase Δ5 (1)	Ot02g00290	S AS	P5084 P5085	CGTGTGCCGACAGTTTTCAG TAGTCACCAAGTGGGGTAGGG	83
	élongase Δ4 (2)	Ot09g02550	S AS	P5086 P5087	ACCTGTTGTTCTGCTGGTC GATACGCATTGTACGCCAGC	83
métabolisme des TAG	DAGAT2A	Ot08g02550	S AS	P5678 P5679	GTTTGTGTTCCGTTTCGCT CTCAATCATCGCCAGCAGTG	181
	DAGAT2B	Ot16g00890	S AS	P5683 P5684	ACCACGCAAAACGACAATCC GTGCAGATTTGTGTCGGTCCG	100
	DAGAT2C	Ot13g01100	S AS	P5685 P5686	TGGCGAGACGTAAAGGGTTC GCGGTGAGATTCCGATGAGT	168
	DAGAT2D	Ot12g01420	S AS	P5687 P5688	CGGATTTAGCGCCGTTTT AATCTCTGCTCACCGCAC	125
	DAGAT2E	OT_ostta08g043 10	S AS	P5689 P5690	GTGGCGGGAGACCTATTCTG ATAGCAGCAAACCACCTC	151
	LPCAT	Ot18g00950	S AS	P5693 P5694	ACAGCCGCAAACATTACC AGTGACGAAGCCATTGACCC	100
	PDAT	Ot09g03200	S AS	P5695 P5696	TCGTGTGCTGGATACTC AGTGCGCGGTGATGATACTC	100
	GPAT1	OT_ostta02g003 40	S AS	P5697 P5698	TTGACTACGACCGTCCGTG TCGCCACTGTCTATCTGGGA	73
	GPAT2	OT_ostta17g011 50 (Ot17g01250)	S AS	P5699 P5700	ACATGGAACCTCAGCGACAG ACTTCAACATCCCGTCCAC	120
	SFR2	Ot11g02270	S AS	P5701 P5702	CACCCAAAGTCTCGTGCGAT CGTTTGACGCCTTAGGACC	100
	LPAT1	OT_ostta07g033 40 (Ot07g03180)	S AS	P5718 P5719	GGTCGCTCGTGGTGAAGAA GACCAGACCCGCTTTCC	125
	LPAT2	OT_ostta09g017 40 (Ot09g01710)	S AS	P5721 P5722	TGGTGTGGGTGGAGAATTGC TCACCCGCTCAGTTTCTTG	108
	PGD1	OT_ostta14g000 50	S AS	P5725 P5726	AAAGCGCACGTTACCAAAC ATCAGGAGCATCAACGCCAA	102
	TRSP	OT_ossta05g018 00 (Ot05g01810)	S AS	P5780 P5758	CCGCAATCGGCGTCTTTTT CCGCGCAAAGTACAGAAAC	198
	WRI	OT_ostta03g022 20	S AS	P5905 P5906	AACTCGAAAGCAAGTGGGA GTTGCGGCGTTTTTGATGT	195

Annexe 4 : Liste exhaustive des espèces moléculaires de TAG et des combinaisons en FA associés identifiées en ESI-MS/MS.

Les espèces en gras ont été identifiées lors de la première analyse publiée (Degraeve et al 2017). Elles sont en noir quand elles n'ont pas été retrouvées dans les analyses complémentaires.

Lors de l'analyse complémentaire, les espèces retrouvées uniquement dans le contrôle sont écrites en bleu, celles retrouvées uniquement en carence azote sont écrites en vert tandis que celles communes aux deux échantillons sont écrites en violet.

Les espèces soulignées sont celles dont les positions sont exactes.

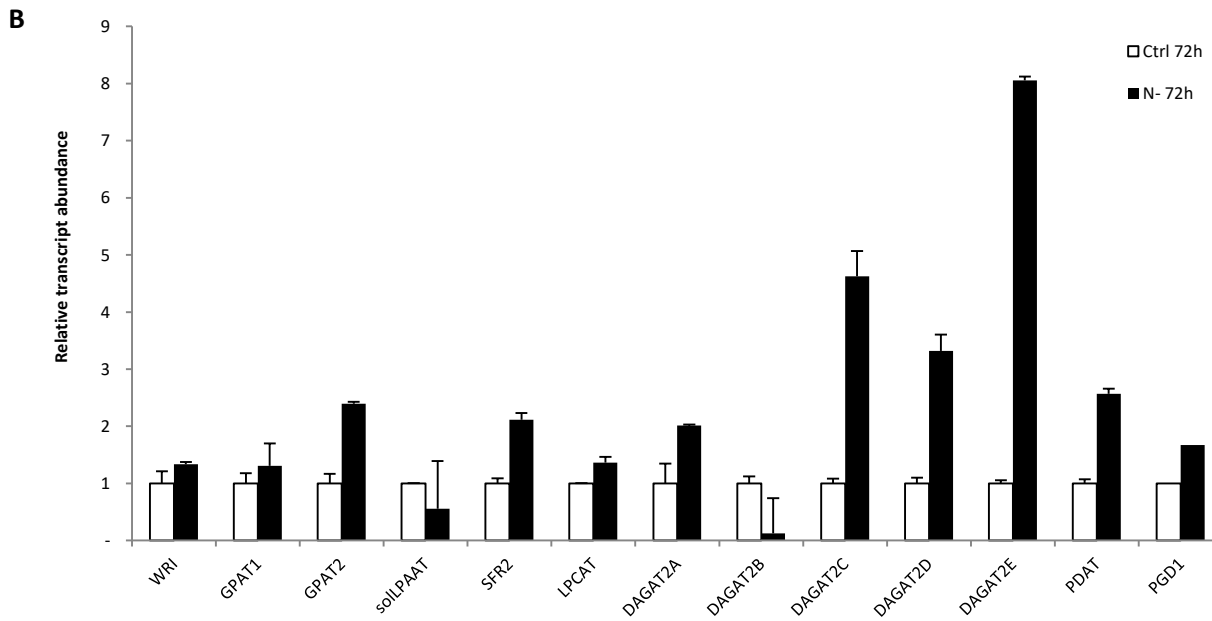
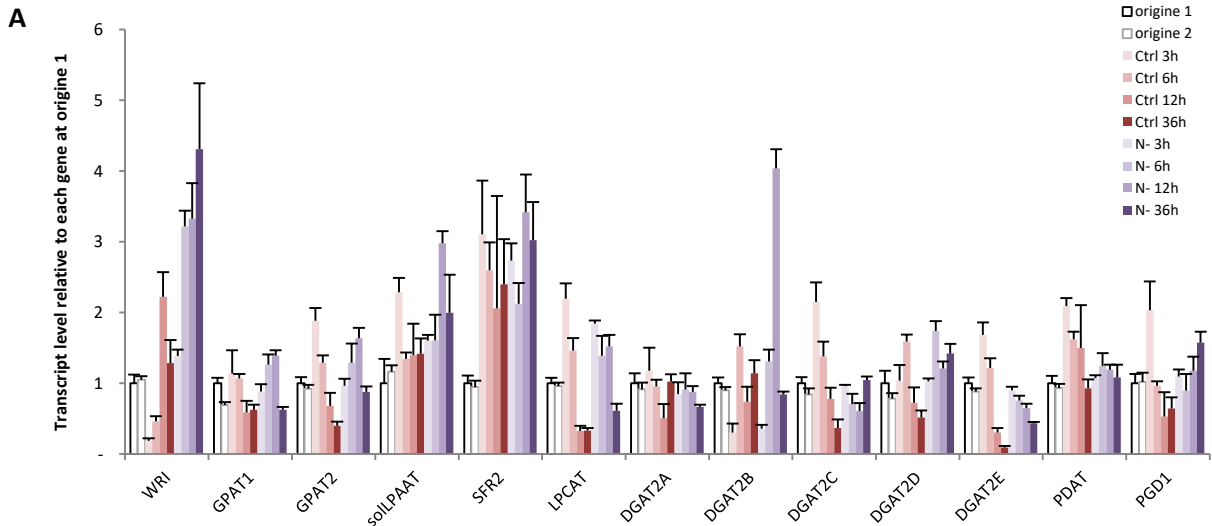
Les espèces en orange représentent moins de 1 % de la composition totale des TAG dans l'analyse complémentaire ont été exclu de l'analyse en HPLC-MS pour répondre un nombre d'analyse limité par la machine. De mêmes, les combinaisons minoritaires écrites en italique entre crochet sur fond gris ont été exclues.

mol sp	Details
44:0	<u>14:0/14:0/16:0</u>
44:4	<u>14:0/14:0/16:4</u>
46:0	<u>14:0/16:0/16:0</u> et <u>14:0/14:0/18:0</u>
46:1	<u>14:0/16:0/16:1</u>
46:4	14:0/14:0/18:4
46:8	16:4/14:0/16:4
48:2	<u>18:2/14:0/16:0</u>
48:3	<u>18:3/14:0/16:0</u>
48:4	<u>16:0/16:0/16:4</u> et <u>14:0/16:0/18:4</u> et [<u>14:1/16:0/18:3(m)</u> et <u>14:0/16:1/18:3(m)</u>]
48:5	<u>14:0/16:4/18:1</u> et <u>14:0/16:0/18:5</u> et [<u>14:0/16:1/18:4(m)</u> et <u>14:0/16:2/18:3(m)</u>]
48:6	<u>16:4/14:0/18:2</u> et [<u>14:0/16:3/18:3(m)</u>]
48:7	16:3/14:0/18:4 et 16:4/14:0/18:3
48:8	16:4/14:0/18:4
50:0	<u>16:0/16:0/18:0</u>
50:1	<u>16:0/16:0/18:1</u>
50:2	<u>16:0/16:0/18:2</u>
50:3	<u>16:0/16:0/18:3</u>
50:4	<u>16:0/16:0/18:4</u> et <u>16:0/16:1/18:3 (m)</u> et <u>14:0/18:1/18:3 (m)</u> et <u>14:0/14:0/20:4 (m)</u>
50:5	<u>16:4/16:0/18:1</u> et <u>18:2/14:0/18/3 (m)</u> et [<u>16:3/16:0/18:2(m)</u> et <u>16:2/16:0/18:3(m)</u> et <u>16:1/16:0/18:4(m)</u> et <u>16:0/16:0/18:5(m)</u>]
50:6	<u>16:4/16:0/18:2</u> et <u>16:3/16:0/18:3</u>
50:7	16:4/16:0/18:3 et 18:3/14:0/18:4 et 16:3/16:0/18:4
50:8	<u>16:4/16:0/18:4</u> et [<u>16:3/16:0/18:5 (m)</u>]
50:9	<u>16:4/16:0/18:5</u>
50:10	<u>16:4/16:3/18:3</u>
50:11	<u>16:4/16:4/18:3</u>
52:1	<u>18:0/16:0/18:1</u>
52:2	<u>18:0/16:0/18:2</u> et <u>18:1/16:0/18:1</u>
52:3	<u>18:1/16:0/18:2</u> et [<u>18:0/16:0/18:3(m)</u>]
52:4	<u>18:1/16:0/18:3</u> et <u>18:2/16:0/18:2</u> et [<u>18:0/16:0/18:4(m)</u> et <u>16:0/16:0/20:4 (m)</u>]
52:5	<u>18:2/16:0/18:3</u> et <u>18:1/16:0/18:4 (m)</u> et [<u>14:0/14:0/22:5(m)</u>]
52:6	<u>18:3/16:0/18:3</u> et [<u>18:2/16:0/18:4 (m)</u> et <u>14:0/14:0/22:6(m)</u>]
52:7	<u>18:3/16:0/18:4</u> et [<u>18:2/16:0/18:5 (m)</u>]
52:8	<u>18:4/16:0/18:4</u> et <u>18:1/16:4/18:3</u> et <u>18:2/16:4/18:2</u> et <u>18:3/16:0/18:5</u>
52:9	16:3/14:0/22:6 et 16:4/14:0/22:5 et 18:4/14:0/20:5 et 16:4/16:0/20:5 et <u>18:3/16:4/18:2</u> et <u>18:3/16:3/18:3</u> et <u>18:4/16:3/18:2</u>
52:10	<u>16:4/14:0/22:6</u> et <u>16:4/18:3/18:3</u>
52:11	18:3/16:4/18:4 et 18:4/16:3/18:4 et 18:2/16:4/18:5
52:12	<u>18:4/16:4/18:4</u> et <u>16:4/18:3/18:5</u>
52:13	18:4/16:4/18:5 et 16:4/16:4/20:5
54:2	<u>18:0/18:1/18:1</u> et <u>20:1/16:0/18/1</u> et <u>18:2/18:0/18:0 (m)</u>

54:3	18:1/18:1/18:1
54:4	18:1/18:1/18:2
54:5	16:0/16:0/22:5 et 18:1/16:0/20:4 (m)
54:6	16:0/16:0/22:6 et 18:2/20:4/16:0 et [18:1/14:0/22:5 (m) et 18:1/20:5/16:0 (m) et 18:1/18:2/18:3 (m)]
54:7	18:2/14:0/22:5 et 18:1/14:0/22:6 (M) et [18:4/16:0/20:3 et 20:4/18:2/16:0 et 20:5/18:1/16:0 (M)] et 18:1/18:2/18:4 et 18:2/18:2/18:3/ et 18:1/18:3/18:3 et [18:5/18:1/18:1]
54:8	18:2/14:0/22:6 et 18:3/14:0/22:5 et 18:4/16:0/20:4 et 18:3/16:0/20:5 et 18:2/18:4/18:2 et 18:2/18:3/18:3
54:9	18:4/16:0/20:5 et 16:4/16:0/22:5 et 18:3/14:0/22:6 et 18:4/14:0/22:5 et 18:3/18:3/18:3 et 20:4/20:5/14:0 et 20:4/18:3/16:0 et [16:3/16:0/22:6]
54:10	16:4/16:0/22:6 et 18:4/14:0/22:6 et 20:4/16:4/18:2 et 18:3/18:4/18:3 et 18:4/18:4/18:2
54:11	20:3/16:4/18:4 et 16:3/18:3/20:5 et 22:6/14:1/18:4 et 18:4/18:4/18:3 et 18:5/18:3/18:3
54:12	18:3/16:4/20:5 et 16:4/18:4/20:4 et 18:4/16:3/20:5 (M) et 18:5/16:3/20:4(M) et 22:6/16:3/16:3(m) et 22:5/16:3/16:4(m) et 18:3/18:4/18:5
54:13	18:5/18:4/18:4 et 18:5/16:4/20:4 et 18:4/16:4/20:5(m)
54:14	16:4/16:4/22:6
54:15	18:5/18:5/18:5
56:6	18:1/16:0/22:5 et 20:1/18:3/18:1 (Mm) et 22:6/18:0/16:0 (m)
56:7	18:1/16:0/22:6 et 18:2/16:0/22:5
56:8	18:2/16:0/22:6 et 18:3/16:0/22:5
56:9	18:3/16:0/22:6 et 18:4/16:0/22:5
56:10	18:4/16:0/22:6 et 18:5/16:0/22:5
56:11	16:3/18:3/22:5 et 18:3/18:3/20:5 et 18:5/18:1/20:5 et 16:4/18:1/22:6 et 16:3/18:2/22:6 et 16:4/18:2/22:5
56:12	16:3/18:3/22:6 et 16:4/18:3/22:5 et 22:6/6/16:4/18:2 et 22:5/16:4/18:2
56:13	16:3/18:4/22:6 et 16:4/18:3/22:6 et 16:4/18:4/22:5 (m)
56:14	16:4/18:4/22:6 et 16:3/18:5/22:6 et 18:5/16:4/22:5
56:15	18:5/16:4/22:6
58:7	18:5/20:1/20:1
58:11	22:6/20:5/16:0
58:12	22:6/14:0/22:6
62:14	22:6/22:6/18:2 et 22:5/22:6/18:3
62:15	22:6/22:6/18:3
62:16	22:6/22:6/18:4
66:18	22:6/22:6/22:6

Annexe 5 : Régulation transcriptionnelle exploratoire des gènes impliqués dans la biosynthèse des TAG au cours de la carence azotée, normalisée au premier temps de l'expérience.

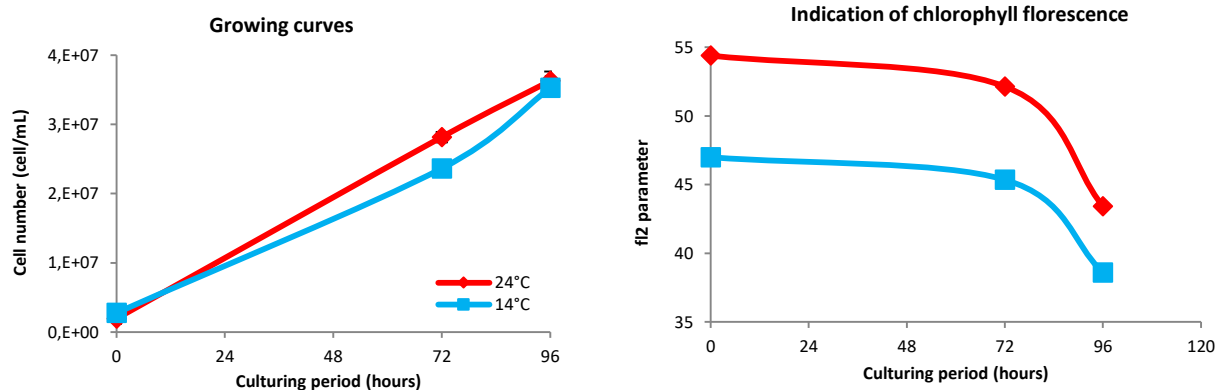
A, Cinétique conduite sur 36h. Les origines correspondent aux cultures avant leur lavage pour le lancement de la carence. L'expression des gènes a été normalisée par rapport à la moyenne géométrique des gènes de ménages (*EF1 α* , *CAL* et *ARP2*). **B,** Point indépendant à 72h de carence. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de ménages *EF1 α* . Dans les deux expériences, les niveaux d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à sa propre expression au premier temps de l'expérience, respectivement au point origine 1 ou au point contrôle 72h. (n=1, les barres d'erreurs = écart-types de répliques techniques de qPCR).



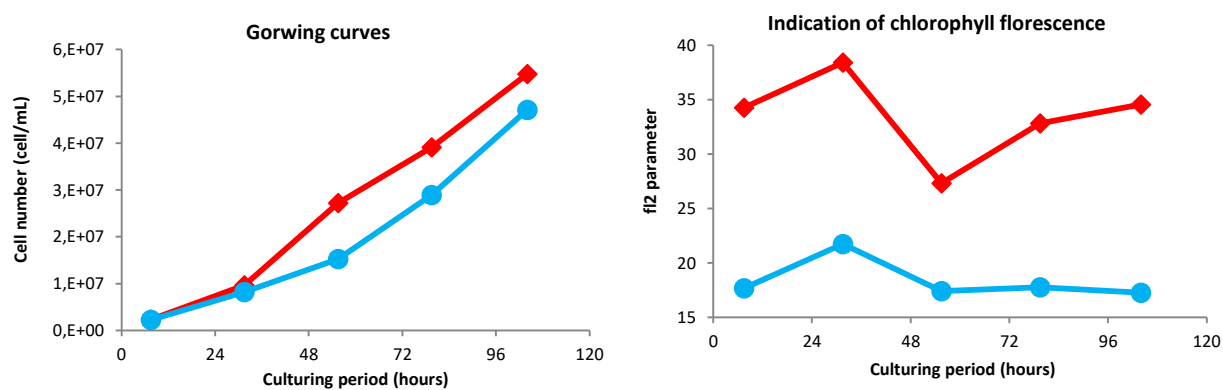
Annexe 6 : Courbe de croissance et évolution de la florescence de la chlorophylle représentatives de cellules acclimatées à température standard et à basse température.

Les résultats de trois cultures indépendantes sont représentés. La culture **A** correspond à la culture analysée en terme de composition lipidique figure 43 (24/14°C, LL). La culture **B** a été cultivée en LD 16h/8h (24/14°C). La culture **C** a été cultivée en LL (22/12°C).

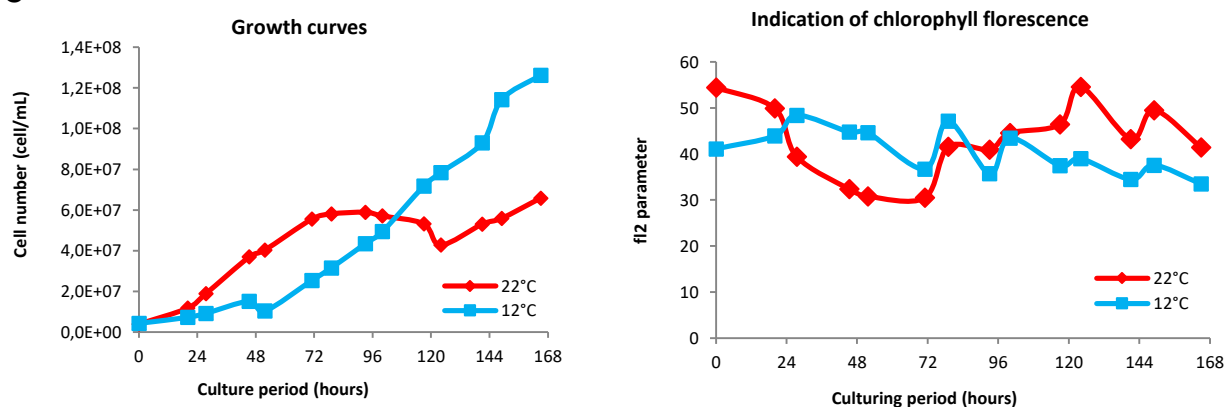
A



B



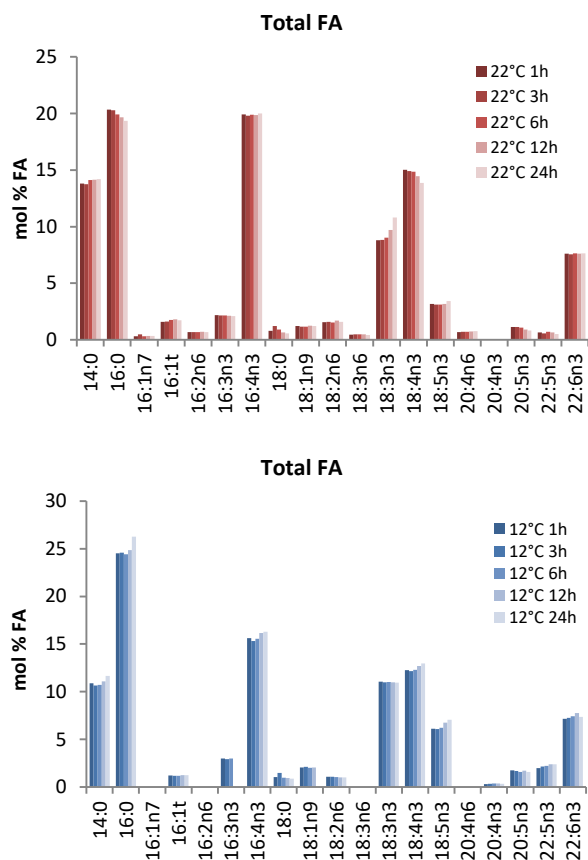
C



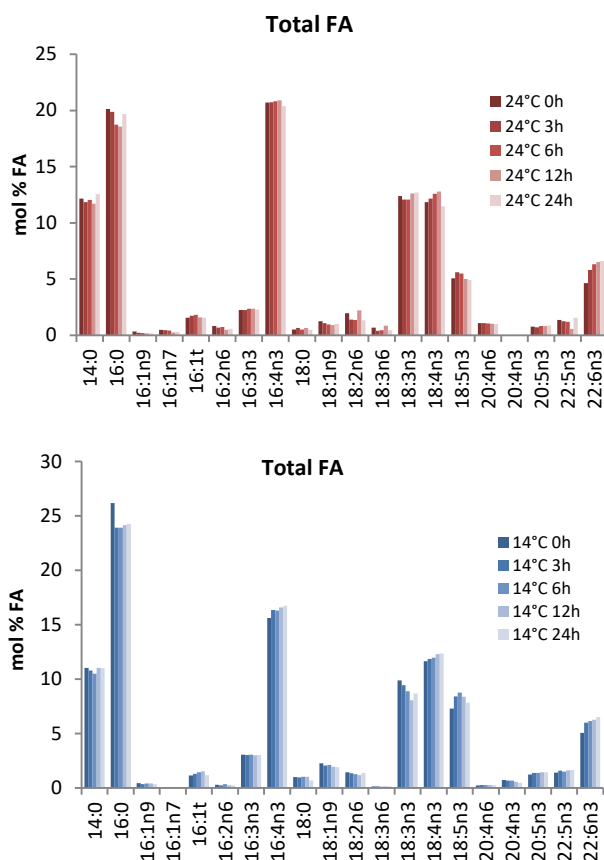
Annexe 7 : Profil en acides gras totaux des contrôles acclimatés à température standard et à basse température lors des expérience de refroidissement.

Les profils ont été obtenus en GC-FID à parti de FAMES 'directs'. **A**, les cellules ont été cultivées à 22°C et 12°C en LD (16h/8h). **B**, les cellules ont été cultivées à 24°C et 14°C en LL.

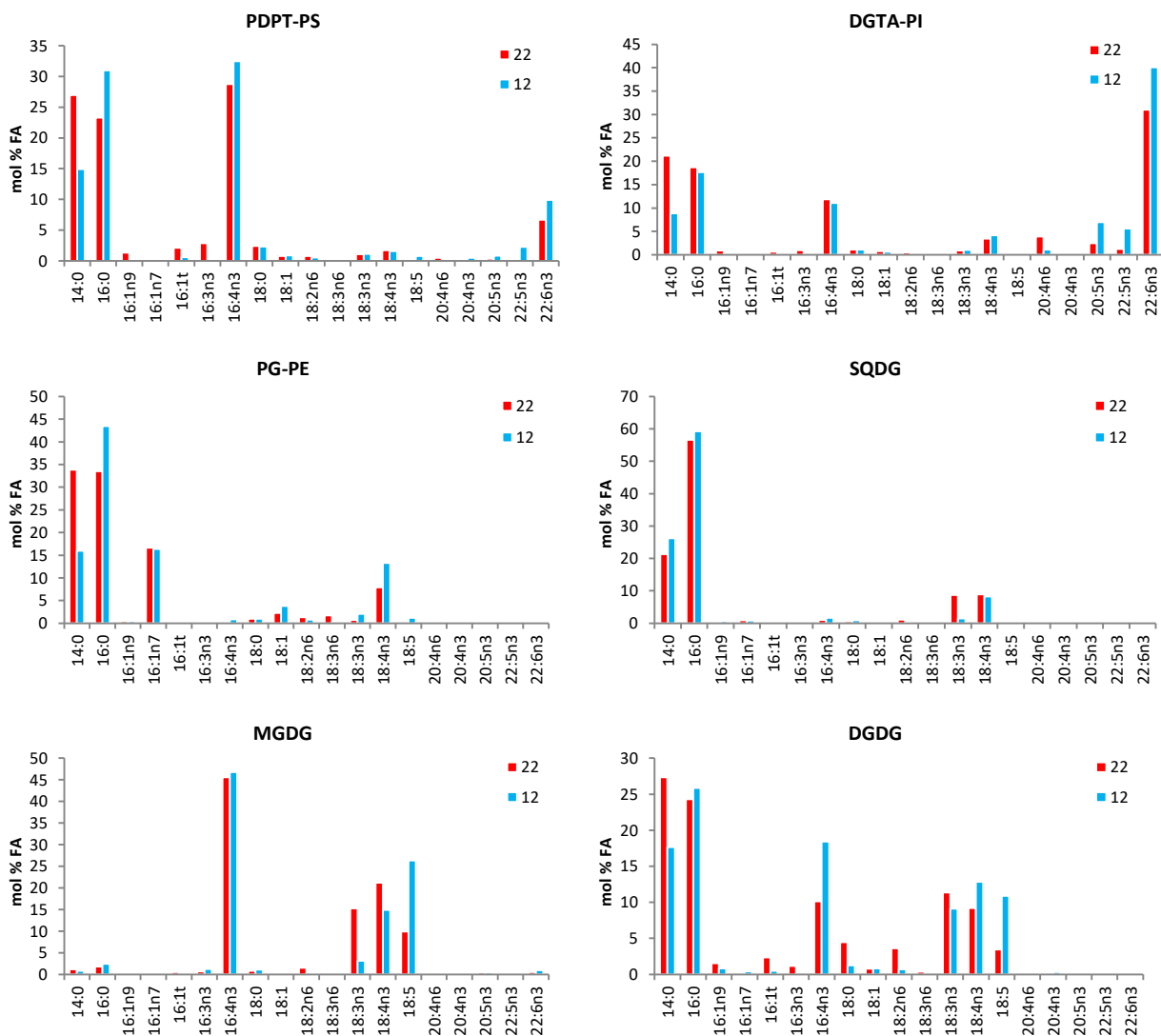
A



B

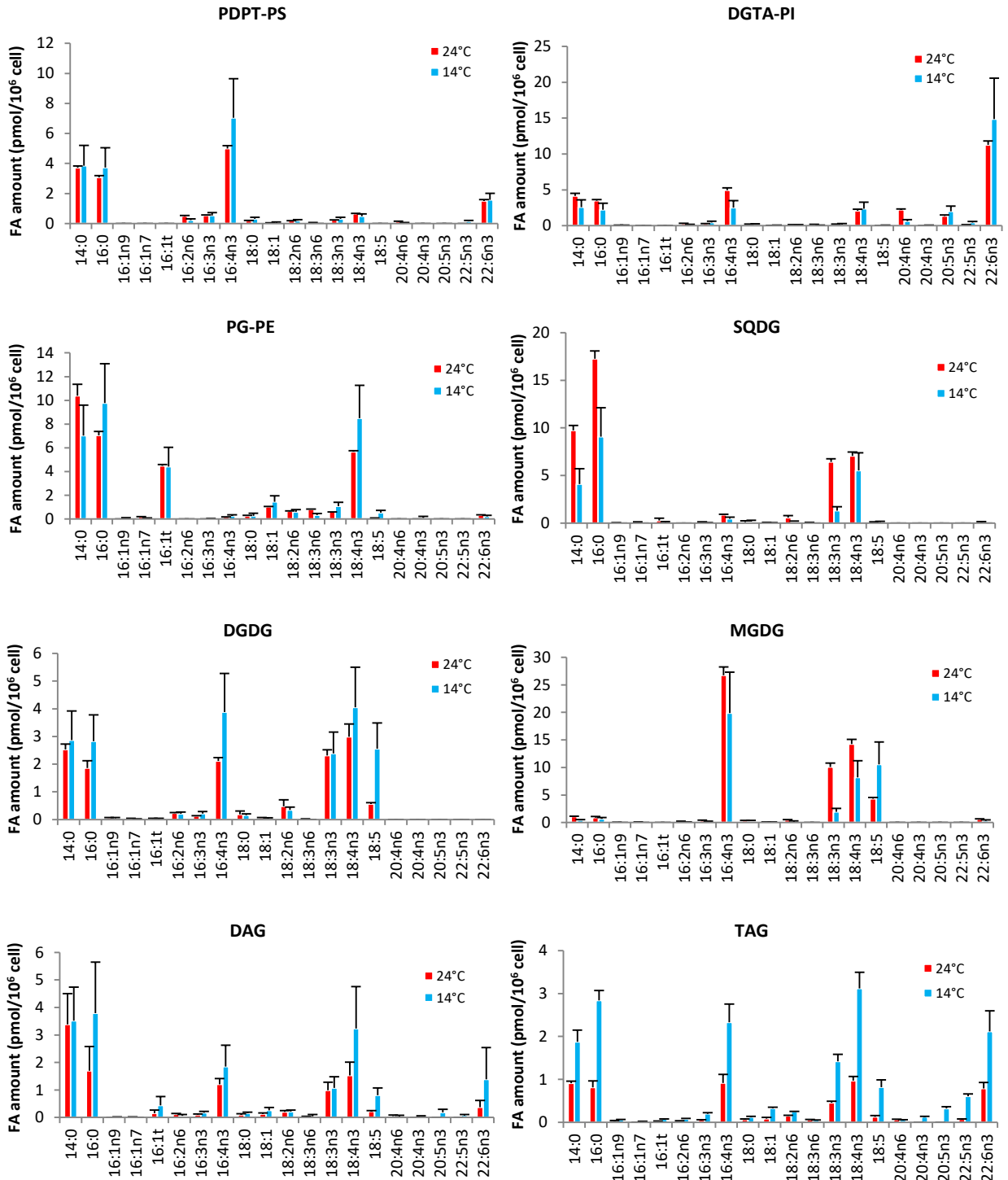


Annexe 8 : Expérience préliminaire sur les effets de la basse température de culture de cellules acclimatées sur la composition en pourcentage molaire de leurs classes de lipides polaires.
 Les cellules ayant servies à l'analyse ont été cultivées à 22°C et 12°C en LL (n=1).



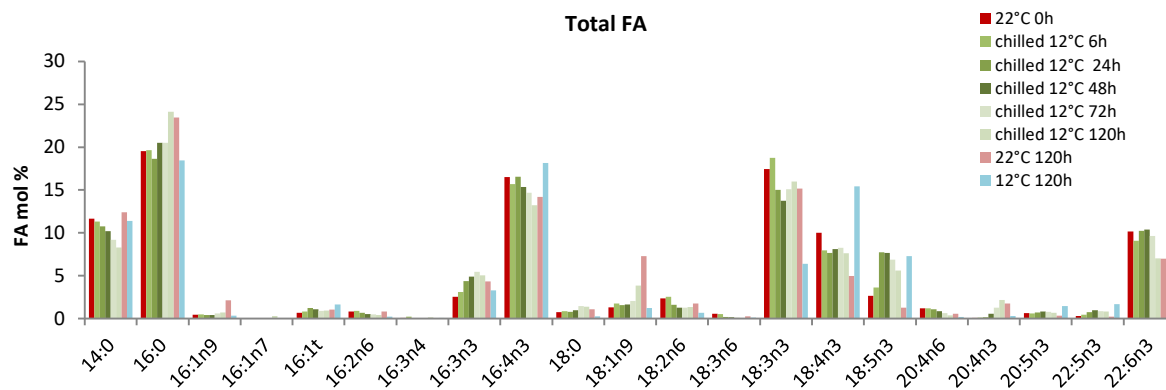
Annexe 9 : Effet de la basse température de culture de cellules acclimatées sur la composition en quantité de leurs différentes classes de lipides.

Les résultats exprimés en pourcentage molaire sont donnés figure 45. (n=3 (batch de départ identique), barres d'erreur = écart-type).



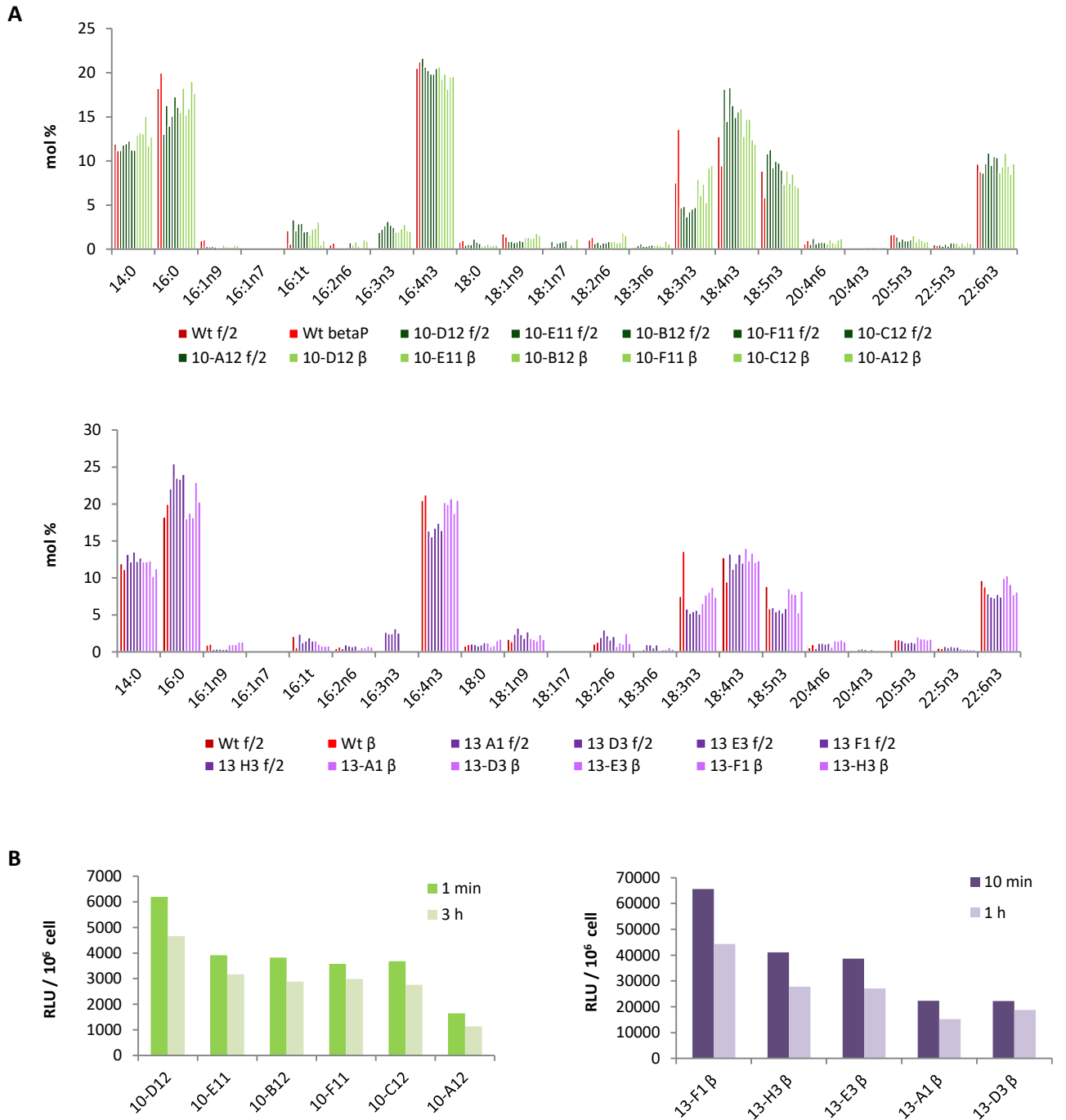
Annexe 10 : Evolution du profil en acides gras totaux lors d'un refroidissement de 120h.

Les cellules ont été cultivées à 12 versus 22°C en LL sans différence de croissance quelques soient les conditions (basse température ou refroidissement (chilled)).



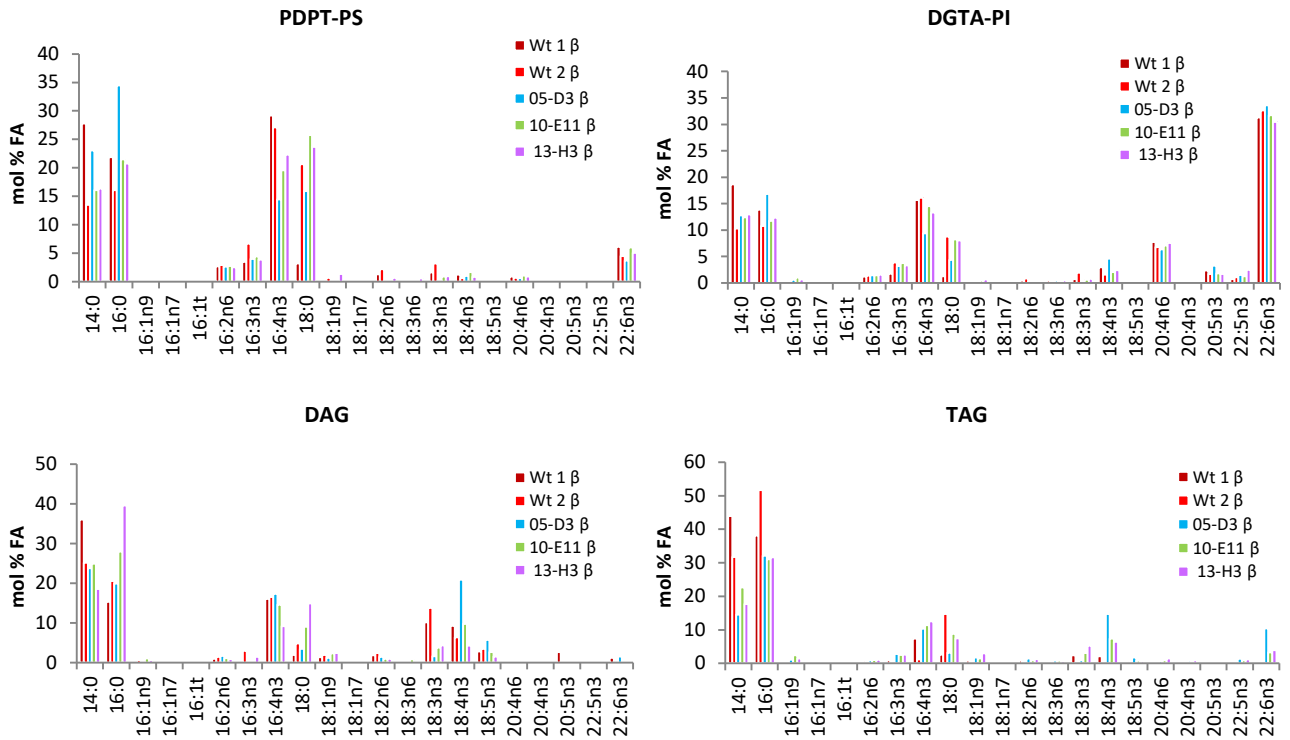
Annexe 11 : Profils en FA totaux des lignées surexprimant soit la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ désaturases (Ot10) ou l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase (Ot13) cultivées en phosphate organique ou inorganique.

A, les profils totaux ont été obtenus en GC-FID par 'FAMES directs'. Les milieux de culture contenaient soit du phosphate inorganique (milieu f/2), soit du phosphate organique (milieu β). Les cellules des lignées Ot10 (vert) et Ot13 (violet) sont classées par ordre décroissant de leur signal de luminescence. **B**, Signaux de luminescence relative obtenus des cellules des lignées Ot10 (vert) et Ot13 (violet).



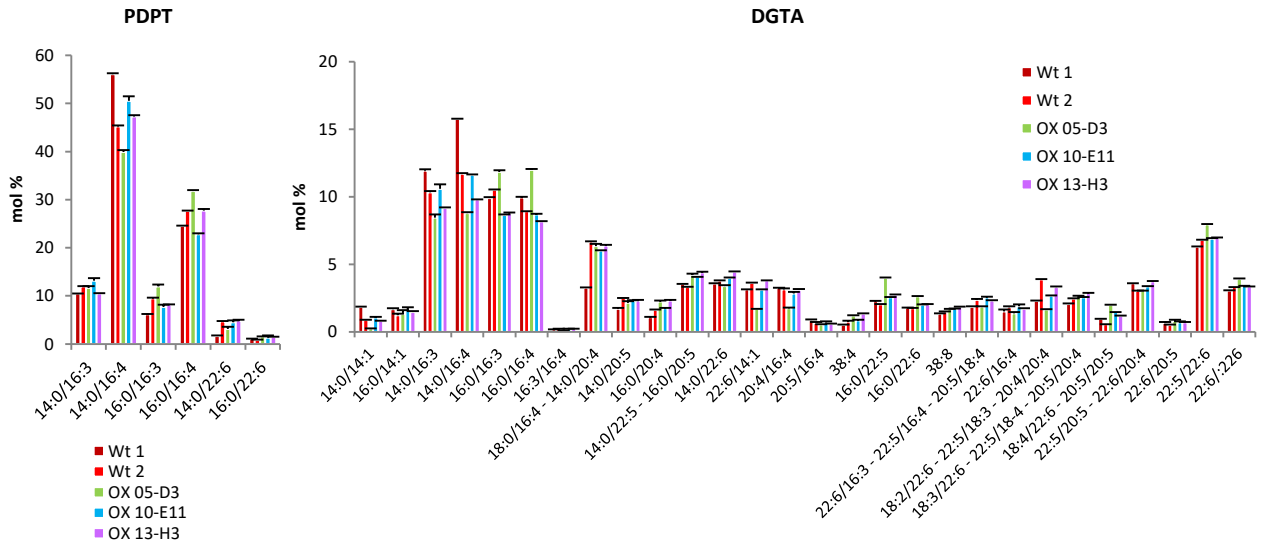
Annexe 12. Effet de la surexpression de désaturases $\Delta 6/\Delta 8t$ putatives (Ot05 et Ot10) et de la désaturase $\Delta 6$ acylCoA sur la composition en pourcentage molaire des différentes classes de lipides

Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). La composition des lipides plastidiaux est donnée figure 59.



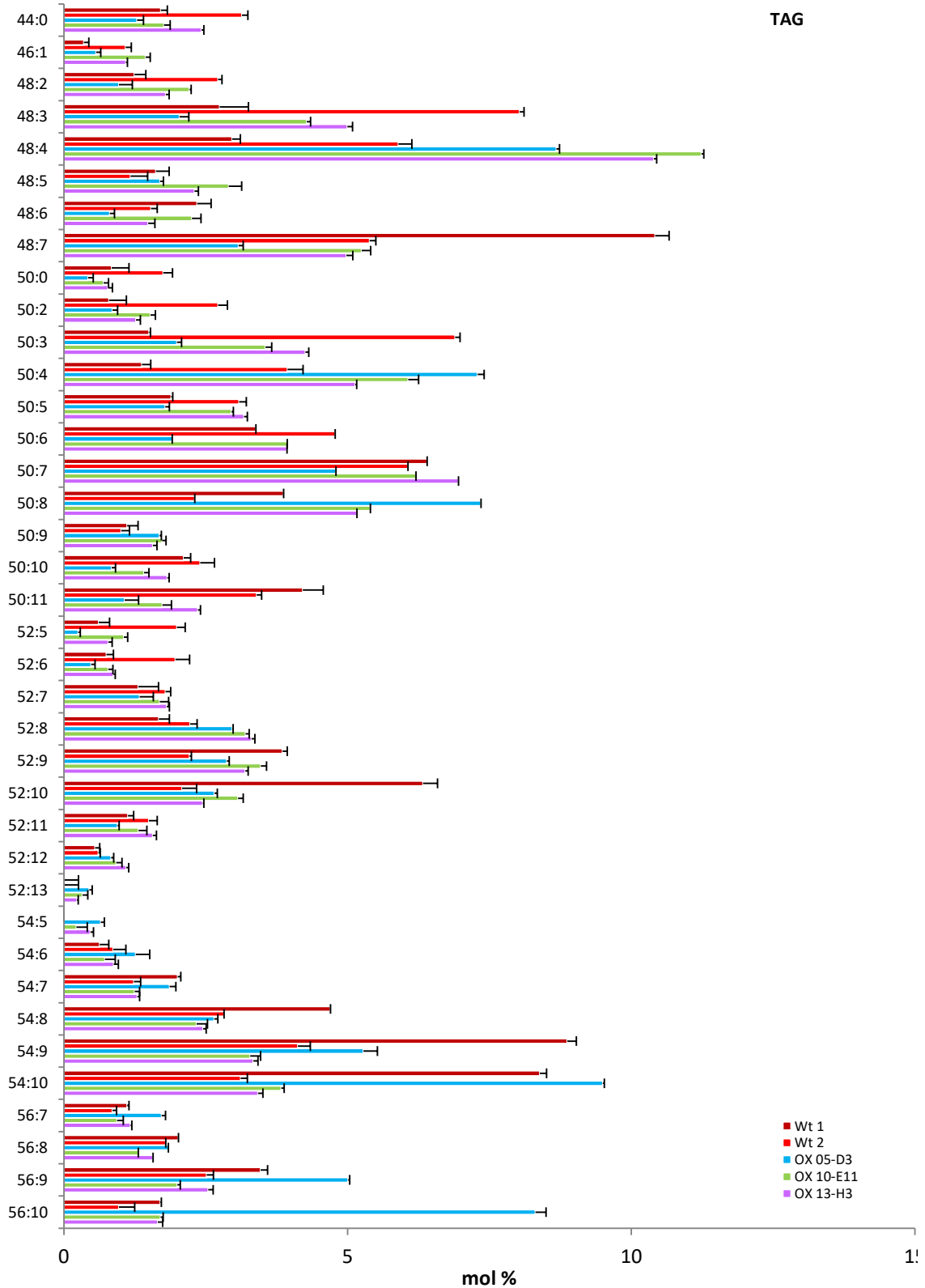
Annexe 13. Effet de la surexpression des gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et -2 et $\Delta 6$ acyl-CoA sur les espèces moléculaires des lipides extraplastidiaux.

Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). Les espèces moléculaires des lipides plastidiaux sont données figure 60.



Annexe 14. Effet de la surexpression des gènes des désaturases $\Delta 6/\Delta 8S-1$ et -2 et $\Delta 6$ acyl-CoA sur les espèces moléculaires des lipides extraplastidiaux.

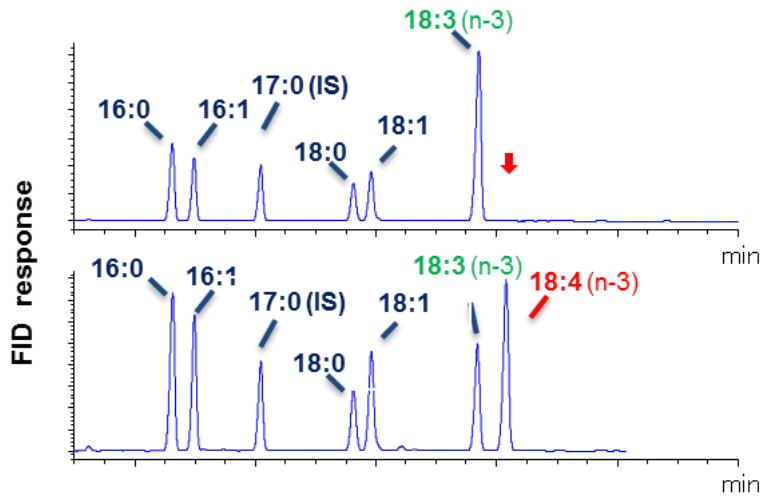
Les cellules ont été cultivées en Erlenmeyer de 200mL en lumière continue et en milieu β . En rouge les lignées contrôles non transformées. Les lignées Ot05-D3 (en bleu), Ot10-E11 (en vert) et Ot13-H3 (en violet) surexpriment respectivement les gènes codant la $\Delta 6/\Delta 8S-1$, la $\Delta 6/\Delta 8S-2$ et l'acyl-CoA $\Delta 6$ désaturase. (n=1, analyse exploratoire). Les espèces moléculaires de chaque combinaison sont données en annexe 4. Les espèces moléculaires des lipides plastidiaux sont données en figure 60 et celles des lipides extraplastidiaux en annexe 12.



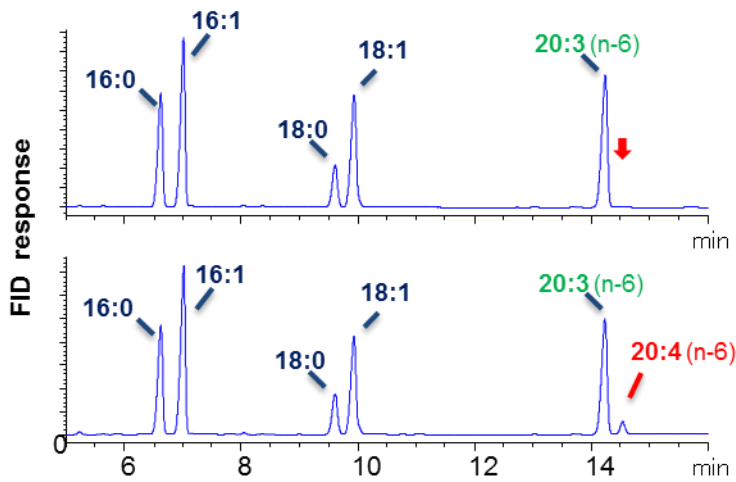
Annexe 15 : Expression des désaturase d'*O. tauri* : acyl-CoA $\Delta 6$, $\Delta 5$ et $\Delta 4$ chez la levure *S. cerevisiae*.

A, l'acyl-CoA $\Delta 6$ produit du 18:4 *n*-3 lorsque la levure est nourrie en 18:3 *n*-3. **B**, la $\Delta 5$ désaturase produit du 20:4 *n*-3 lorsque la levure est nourrie en 20:3 *n*-6. **C**, la $\Delta 4$ désaturase produit très faiblement du 22:6 *n*-3 lorsque la levure est nourrie en 22:5 *n*-3. Les levures transformées avec le vecteur vide pour contrôle sont indiquées en haut de chaque panneau A, B et C.

A



B



C

