



HAL
open science

Influence des paramètres environnementaux sur la biosynthèse d'éthers de glycérol bactériens : étude de modèles biologiques et exemples d'applications (paléo)environnementales

Arnauld Vinçon-Laugier

► **To cite this version:**

Arnauld Vinçon-Laugier. Influence des paramètres environnementaux sur la biosynthèse d'éthers de glycérol bactériens : étude de modèles biologiques et exemples d'applications (paléo)environnementales. Sciences de la Terre. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1081 . tel-01801977

HAL Id: tel-01801977

<https://theses.hal.science/tel-01801977>

Submitted on 28 May 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.



N° d'ordre NNT : 2017LYSE1081

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 341
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation (E2M2)

Spécialité de doctorat : Géochimie Organique

Soutenance publique le **mardi 23/05/2017 à 14h**
Amphithéâtre Istil - bâtiment Polytech – Campus de la DOUA

Arnauld Vinçon-Laugier

Influence des paramètres environnementaux sur la biosynthèse d'éthers de glycérol bactériens : étude de modèles biologiques et exemples d'applications (paléo)environnementales

Devant le jury composé de :

M. **Huguet Arnaud**
Mme **Molina-Jouve Carole**
Mme **Mattioli Emanuela**
M. **Schaeffer Philippe**

CR/Université Pierre et Marie Curie Paris
PU/INSA de Toulouse
PU/Université Claude Bernard Lyon 1
DR/Institut de Chimie de Strasbourg

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

M. **Grossi Vincent**

DR /Université Claude Bernard Lyon 1

**Directeur de
thèse**

Mme **Cravo-Laureau Cristiana**

MCF/Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Codirectrice
de thèse**

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Dans un premier temps, je remercie Arnaud Huguet, Carole Molina-Jouve, Philippe Schaeffer et Emanuela Mattioli d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de participer à mon jury de soutenance de thèse.

Je tiens à remercier grandement Vincent Grossi et Cristiana Cravo-Laureau, sans qui cette thèse n'aurait pu être possible. Merci Vincent d'avoir eu confiance en moi lors de mon stage de Master 2 et de m'avoir offert la chance d'effectuer ce doctorat avec toi. Tu as réussi à me donner goût à une discipline dans laquelle je ne pensais pas évoluer plus jeune et à me pousser constamment et sans relâche à produire le meilleur. Merci pour ton engagement continu, ta bonne humeur et ton humour décadent!

Un grand merci à toi Cristiana pour avoir assuré cette direction, pour ton soutien et ton investissement malgré la grande distance qui nous sépare!

Je remercie également Isabelle Mitteau pour son énorme travail dans les cultures de souche, et Ingrid Antheaume pour toutes ses aides au laboratoire de chimie organique.

Et un merci à Samuel Mailliot pour son travail d'impression exceptionnel.

Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de passer de très bons moments durant ces trois dernières années, et qui de près ou de loin, m'ont aidé à garder le moral durant les moments plus difficiles.

A mes collègues et amis du Labo... Big up à la Clique, David et Ivan, on contrôle le bastion du R6, notre swag en jalouse plus d'un et c'est chaque jour un bonheur de partager le bureau avec vous. Un merci tout particulier à toi David, avec qui je voue une véritable amitié. Merci à la troupe du R4 et du R6, Max, Very Bad Manu, Clément, Claire M., Véro, Chloé, Sylvain pour les délires de chaque jour dans la salle conviviale et lors de nos virées nocturnes. Je sais, je suis un peu pénible avec vous, mais qui aime bien châtie bien ! Un merci également à Jean, Ulysse et Hélène, tenez bon, c'est bientôt la fin pour vous aussi ! Un gros bisous à Gros Nico ! A Manu M. pour toutes les sessions potins et autres ! Et à Julien P. mon grand frère de thèse !

A mes compagnons de promo... A Romain, pour les nombreuses pauses ensembles, tes aides et toutes les choses qui se sont passées durant ces 3 ans que je ne pourrais citer ici. Profite bien de l'Argentine ! J'espère te revoir vite. A Cori, Axelle, Jean-Mi, Thomas, on en aura fait du chemin depuis la L2.

Aux fidèles et fous du Domus, Claire D., Gilles (bisous bisous), Guillaume, Vincent P., ces moments à table vont beaucoup me manquer! A Alex L., c'est bien toi le chic type de Lyon 1.

A mes amis d'enfance et d'adolescence... A Alex, mon plus grand poto, je te souhaite le meilleur ! A Benoit, courage pour ta thèse, ça a toujours été toi le meilleur. A mes gendarmettes Vic et Ugo. J'ai pas envie de vous écrire plus de choses, sinon vous allez me charrier à vie !!! Sachez que j'en pense pas moins. Que notre amitié perdure ! Et aux potes de Lyon, Toto et Momo, Mattouz, Guigui, Hugo et José (c'est du solide et c'est gravé dans la roche !).

A la très belle personne que j'ai eu la chance de rencontrer cette année, que notre parcours continue et mène vers une très belle histoire. Merci de m'avoir soutenu, épaulé et motivé surtout en cette fin de thèse.

Enfin, un profond remerciement à ma famille. A ma mère et ma sœur que j'aime. Nous n'avons pas toujours vécu des choses simples. Je ne suis peut-être pas le plus grands des expressifs, mais sachez que je tiens et tiendrai toujours à vous. A Pascal qui a été un véritable père. Et à Yvette qui a toujours été là et que je remercie de tout mon cœur.

Résumé de la thèse

Chez les organismes procaryotes, la structure chimique des lipides membranaires diffère fortement entre les Bacteria et les Archaea. Les phospholipides bactériens sont généralement constitués d'acides gras à chaînes carbonées linéaires estérifiés à une molécule de *sn*-1,2-glycérol (acylglycérols). Les lipides d'Archaea sont quant à eux constitués de chaînes isoprénoïdes liées à une ou deux molécules de *sn*-2,3-glycérol par des liaisons éthers (di- et tétraéthers de glycérol isoprénoïdes). Ces différences de structure chimique ont des implications en termes d'écologie et d'évolution entre Bacteria et Archaea, et permettent d'utiliser ces molécules comme biomarqueurs dans les environnements actuels ou passés.

Certaines Bacteria synthétisent cependant des phospholipides particuliers dont la structure possède des caractéristiques communes aux lipides des deux domaines procaryotes : les éthers de glycérol bactériens (AGE). Ces lipides sont constitués de chaînes carbonées non-isoprénoïdes liées à du *sn*-1,2-glycérol par des liaisons éthers au lieu des liaisons esters classiquement observées chez les bactéries. En raison de leur présence chez la plupart des bactéries (hyper)thermophiles, les AGE ont souvent été considérés comme une caractéristique des bactéries extrêmophiles. Toutefois, ces molécules ont déjà été identifiées chez quelques bactéries mésophiles, et sont omniprésentes dans les écosystèmes actuels ou anciens non-extrêmes, où leur(s) origine(s) et leur(s) mode(s) de formation sont encore inconnus. Le caractère singulier de ces lipides et leur structure chimique thermostable leur permettent d'être assez bien préservés dans l'environnement à la mort des cellules bactériennes, et suggèrent leur potentiel à constituer de bons marqueurs biogéochimiques et/ou environnementaux.

Pour s'adapter aux variations de leur milieu de croissance (variations de température, salinité, pH, etc...), et maintenir une intégrité membranaire optimale, les bactéries modifient notamment la structure chimique de leurs phospholipides membranaires. Ces modifications structurales (telles que la modification des longueurs des chaînes carbonées, du degré de ramification ou d'insaturation de ces chaînes, etc.) sont assez bien décrites pour les membranes bactériennes composées d'acylglycérols, mais très peu d'informations sont actuellement disponibles concernant les membranes contenant des AGE.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié la composition lipidique de différentes souches pures de bactéries anaérobies sulfato-réductrices (BSR appartenant aux familles des *Desulfobacteraceae* et des

Thermodesulfobacteriaceae) capables de synthétiser des AGE et cultivées dans différentes conditions contrôlées de température, pH et salinité. Diverses modifications structurales des AGE ont notamment été mises en évidence en réponse à des variations des conditions de croissance, dont certaines spécifiques d'une adaptation, et linéairement corrélées, à la température ou à la salinité. Les différents résultats démontrent l'implication des AGE dans l'adaptation membranaire en réponse à des variations physico-chimiques du milieu, et permettent d'envisager l'utilisation de la distribution structurale des AGE dans des échantillons naturels comme indicateur de conditions environnementales. Nous avons par ailleurs étudié la production d'AGE en fonction de la source de carbone (substrat de croissance) des BSR. Ce travail a permis de mieux appréhender les modes de formation des différents lipides membranaires (acides gras, mono- et di-éthers de glycérol) de bactéries capables de synthétiser des AGE. L'analyse de la composition en AGE d'échantillons issus de différents écosystèmes aquatiques actuels et anciens, caractérisés par des conditions environnementales contrastées (où la température ou la salinité varient dans le temps ou l'espace), a permis de vérifier le potentiel de certains AGE à être utilisés comme indicateurs de variations de conditions (paléo)environnementales.

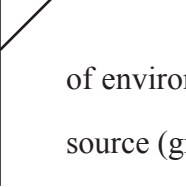
Abstract

In prokaryotic organisms, the chemical structure of membrane lipids contrasts between Bacteria and Archaea. Generally, bacterial phospholipids are constituted of fatty acids with linear carbon chains esterified to a *sn*-1,2-glycerol moiety (acyl glycerols). The lipids of Archaea are formed by isoprenoidal chains bound to one or two molecules of *sn*-2,3-glycerol(s) by ether linkages. These differences in chemical structures have implications in terms of ecology and evolution between Bacteria and Archaea, and allow the use of these molecules as (paleo)environmental biomarkers.

However, some Bacteria synthesize particular phospholipids, called glycerol ether lipids (alkyl glycerols or AGE) which have a chemical structure at the intersection of the two prokaryotic domains. These lipids consist of non-isoprenoid carbon chains linked to a *sn*-1,2-glycerol moiety by ether linkages instead of the conventional ester linkages observed in bacteria. Detected in different (hyper) thermophilic bacteria, AGEs are usually considered as a characteristic of extremophiles. However, these molecules have already been identified in some mesophilic bacteria, and are present in various past and actual non-extreme ecosystems, where their origin(s) and biosynthesis mode(s) are poorly constrained. The singular nature of these lipids and their thermostable chemical structure allow them to be well preserved in the environment following bacterial lysis, and suggest their potential to constitute good biogeochemical and/or environmental biomarkers.

To adapt to changes in growth conditions (variations in temperature, salinity, pH, etc.), and maintain optimal membrane integrity, bacteria specifically modify the chemical structure of their membrane phospholipids. These structural modifications (modification of the carbon chain lengths, of the type or degree of branching or unsaturation, etc.) are fairly well described for bacterial membranes composed of acyl glycerols, but very little information is currently available for AGE-containing membranes.

In this thesis, we studied the lipid composition of various pure strains of anaerobic sulfate-reducing bacteria (BSR belonging to the families *Desulfobacteraceae* and *Thermodesulfobacteriaceae*) able to synthesize AGEs, grown under various controlled conditions of temperature, pH and salinity. Various structural modifications of AGE were observed in response to variations in growth conditions, some of which being specific to, and linearly correlated with, changes in temperature or salinity. The results demonstrate the involvement of AGEs in membrane adaptation to changes in the physico-chemical conditions, and suggest the use of the structural distribution of AGEs in natural samples as an indicator



of environmental conditions. We further studied the production of AGEs as a function of the carbon source (growth substrate) of BSR. This allowed for a better understanding of the modes of formation and of the diversity of AGE structures observed in the environment. The analysis of the AGE content of samples from different actual and past aquatic ecosystems, characterized by contrasting environmental conditions (where temperature or salinity varies over time or space), allowed confirming the potential of AGEs to be used as indicators of variations of (paleo)environmental conditions.

Table des matières

Introduction	17
---------------------------	-----------

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique 27

1.1. Les trois domaines du vivant..... 29

1.1.1. Définition des trois domaines 29

1.1.1.1. Domaine des Bacteria 30

1.1.1.2. Domaine des Archaea (anciennement Archaeobacteria) 30

1.1.1.3. Domaine des Eukaryota 32

1.1.2. Structure cellulaire des trois domaines du vivant 32

1.1.2.1. Les cellules bactériennes..... 34

1.1.2.2. Les cellules d'Archaea 36

1.1.2.3. Les cellules eucaryotes..... 36

1.1.3. Composition de la membrane cytoplasmique et structure des lipides membranaires 37

1.1.3.1. Les esters de glycérol des Bacteria et des Eukaryota 37

1.1.3.2. Les éthers de glycérol des Archaea 39

1.1.3.3. Les éthers de glycérol bactériens 41

1.2. Adaptation membranaire aux variations environnementales :

rôle essentiel des lipides 44

1.2.1. Rôles de la membrane cytoplasmique 44

1.2.2. Propriétés physiques de la membrane cytoplasmique 45

1.2.3. Altérations des propriétés membranaires en fonction des stress environnementaux 49

1.2.3.1. Adaptation homéovisqueuse des membranes à des variations de température..... 49

1.2.3.2. Adaptations homéostatiques aux ions et solutés ioniques..... 51

1.2.3.3. Adaptation à la pression..... 52

1.3. Utilisation des lipides comme outils de reconstruction des variations des

conditions environnementales 52

1.3.1. Définition d'un biomarqueur et d'un proxy environnemental..... 52

1.3.2. Proxys organiques de température (paléo-thermomètres) 53

1.3.2.1. Indice U^{K}_{37} indicateur de température d'eau océanique de surface 53

1.3.2.2. Indice TEX_{86} indicateur de température d'eau océanique de subsurface..... 56

1.3.2.3. Indices MBT/CBT indicateurs de température de l'air continental et du pH des sols..... 58

1.3.2.4. Indice LDI indicateur de température des eaux océaniques de surface 60

1.3.3. Proxys organiques de salinité..... 62

1.3.3.1. Indice ACE 62

1.3.3.2. δD des alcénones et proportion de l'alcénone $C_{37:4}$ 63

1.3.4. Possibilités d'utilisation des éthers de glycérol bactériens (AGE) 64

comme proxys environnementaux..... 64

Chapitre 2 : Procédures expérimentales 69

2.1. Cultures bactériennes et analyse du contenu lipidique des cellules 71

2.1.1. Souches bactériennes et conditions de culture 71

2.1.2. Hydrolyse acide des cellules bactériennes..... 72

2.2. Echantillons naturels et analyse des lipides 73

2.2.1. Sédiments de la section de Punta Piccola (Pliocène supérieur)..... 73

2.2.2. Sédiments du site DSDP 511 (Eocène supérieur – Oligocène inférieur)..... 74

2.2.3. Colonne d'eau du lac Dziani Dzaha (actuel)..... 75

2.2.4. <i>Sédiments des mares salées de Guadeloupe (actuel)</i>	75
2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG-DIF) et par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM)	76
2.4. Estimation des températures des eaux pour les sites anciens (Punta Piccola et Site 511)	77
2.5. Détermination des indices structuraux des AGE.	78

Chapitre 3 : The alkyl glycerol ether lipid composition of heterotrophic sulfate reducing bacteria strongly depends on growth substrate..... 81

Chapitre 4 : Temperature-dependent alkyl glycerol ether lipid composition of mesophilic and thermophilic sulfate-reducing bacteria..... 107

4.1. Introduction	112
4.2. Experimental procedures	115
4.3. Results and discussion	115
4.3.1. <i>Lipid composition of SRB under optimal growth conditions</i>	115
4.3.2. <i>Influence of growth temperature on the lipid composition of SRB</i>	116
4.3.2.1. <i>Total lipids and lipid classes</i>	116
4.3.2.2. <i>Structural modifications of alkyl and acyl chains</i>	118
4.3.3. <i>Potential usefulness of alkyl glycerols as environmental indicators</i>	127

Chapitre 5 : Influence de la salinité et du pH sur la composition lipidique de BSR mésophiles synthétisant des éthers de glycérol 135

5.1. Introduction	137
5.2. Matériel et méthodes	139
5.3. Résultats	139
5.3.1. <i>Composition lipidique des souches PF2803 et CV2803 en condition optimale de croissance</i>	139
5.3.2. <i>Influence de la salinité et du pH sur la teneur en lipides totaux et la distribution des classes de lipides des souches PF2803 et CV2803</i>	139
5.3.3. <i>Modifications structurales des lipides en fonction de la salinité et du pH</i>	142
5.3.3.1. <i>Modifications de la longueur de chaîne et du taux de ramification des lipides en fonction de la salinité</i>	142
5.3.3.2. <i>Modifications de la longueur de chaîne et du taux de ramification des lipides en fonction du pH</i>	144
5.3.3.3. <i>Variations des proportions de certains composés ramifiés avec la salinité</i>	145
5.3.3.4. <i>Absence de variations des proportions des composés ramifiés en fonction du pH</i> ...	148
5.4. Discussion	149
5.4.1. <i>Stabilité de la quantité et de la distribution des lipides totaux en réponse à des variations de salinité et du pH</i>	149
5.4.2. <i>Modifications de la structure des chaînes carbonées des AG et des AGE en réponse</i>	

à des variations de salinité.....	151
5.4.3. Absence de modifications structurales des lipides des souches PF2803 et CV2803 avec des variations du pH	153
5.4.4. Rôle des éthers lipidiques et utilité de ces lipides pour les études (paléo)environnementales	154

Chapitre 6 : Exemples d'utilisation des AGE comme indicateurs de variations de conditions environnementales. 163

6.1. Introduction	165
6.2. Contexte géologique et description des sites	168
6.2.1. Formation sapropélique de Punta Piccola (Sicile)	168
6.2.2. Deep Sea Drilling Project (DSDP) site 511	170
6.2.3. Lac Dziani Dzaha.....	170
6.3. Résultats et discussion.....	173
6.3.1. Présence et identification des AGE dans le milieu naturel	173
6.3.2. Indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$: nouveaux indicateurs de variations de température ?.....	177
6.3.2.1. Détermination des indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$	177
6.3.2.2. Utilisation des indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ pour la section de Punta Piccola	179
6.3.2.3. Utilisation des indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ au site DSDP 511	181
6.3.2.4. Corrélation des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ avec l'indice $U^{K'}$	182
6.3.3. Indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$: nouveaux indicateurs de variations de salinité ?	185
6.3.3.1. Détermination des indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$	185
6.3.3.2. Variations des indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ dans la colonne d'eau du lac Dziani Dzaha.....	186
6.3.3.3. Application des indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ aux étangs salés de Guadeloupe.....	188
6.4. Conclusion.....	190

Conclusions et perspectives..... 195

Synthèse et conclusions des différentes études 197

Conclusions générales..... 201

Perspectives 203

Références 209

Introduction

Introduction

Le réchauffement climatique actuel, qui est en grande partie lié à l'activité anthropique (émission de gaz à effet de serre), entraîne des crises environnementales majeures (vagues de chaleur et de sécheresse, montées des eaux, tempêtes, fonte du permafrost, etc...) qui inquiètent les différentes communautés (sociétales et scientifiques) quant au devenir de notre biosphère. La Terre a cependant connu au cours de son histoire des épisodes climatiques similaires au réchauffement observé actuellement. L'étude des écosystèmes et des climats anciens en Sciences de la Terre (paléoenvironnements et paléoclimats) a pour objectif de reconstruire ces variations climatiques passées. Ceci doit permettre d'améliorer nos connaissances des interactions climat-biosphère à différentes échelles de temps, et de mieux paramétrer les modèles climatiques actuels afin d'appréhender le mieux possible les évolutions futures du climat et leurs impacts sur notre planète. Ne pouvant pas accéder directement aux informations environnementales et climatiques du passé, les scientifiques ont donc besoin d'« outils » (appelés proxys¹) qui sont utilisés pour retracer certains paramètres physiques, chimiques ou biologiques qui ont régi les écosystèmes et les climats anciens.

Certains constituants cellulaires synthétisés par les organismes vivants, les lipides, possèdent une forte spécificité biologique et une relative stabilité chimique (résistance à la dégradation) qui permettent de les utiliser comme « empreintes moléculaires » lors de l'étude d'écosystèmes actuels ou anciens. Ces composés, communément appelés biomarqueurs organiques ou lipidiques, suscitent un intérêt de plus en plus marqué pour les études de processus biogéochimiques ou pour les reconstructions (paléo)environnementales et (paléo)climatiques (Eglinton et Eglinton, 2008 ; Castañeda et Schouten, 2011 ; Schouten et al., 2013). Certains de ces biomarqueurs, tels que les tétraéthers de glycérol isoprénoïdes (produits par des archées), les alcénones et les diols à longues chaînes carbonées (synthétisés par différentes algues unicellulaires eucaryotes), et les tétraéthers de glycérol ramifiés (d'origine bactérienne), voient leurs structures chimiques modifiées en fonction de la température du milieu de vie des organismes producteurs (cf. section 1.3.2. Chapitre 1). Ils sont donc à ce jour de plus en plus utilisés pour reconstruire les températures des environnements passés (proxys organiques de température ou paléothermomètres). Cependant, malgré le nombre croissant

¹Le mot proxy est un nom commun anglais, étymologiquement proche du nom commun français « procuration ». En anglais: proxy (singulier), proxies (pluriel); en français: proxy (singulier), proxys (pluriel).

de proxys découverts ces dernières décennies pour retracer certaines conditions environnementales (changements de température de l'eau ou de l'air, de salinité, de pH, d'oxygénation, etc...), la recherche et le développement de nouveaux proxys constitue toujours un enjeu majeur en Sciences de la Terre, afin notamment d'améliorer la qualité des reconstructions paléoenvironnementales et paléoclimatiques.

Il y a environ 35 ans, des lipides particuliers appelés éthers de glycérol non-isoprénoïdes (ou AGE) ont été découverts chez certaines souches de bactéries (Figure 1C ; Caillon et al., 1983 ; Langworthy et al., 1983). Ces lipides membranaires possèdent une structure chimique singulière à l'intersection de celles des lipides de Bacteria et d'Archaea (Figure 1). Ils présentent en effet des liaisons chimiques de type éther (généralement caractéristiques des Archaea ; Figure 1B), reliant une ou deux chaînes carbonées non-isoprénoïdes (caractéristiques des Bacteria ; Figure 1A) à une molécule de *sn*-1,2-glycérol (respectivement monoéthers de glycérol ou MAGE, et diéthers de glycérol ou DAGE ; Figure 1C). Malgré l'identification de ces molécules chez quelques espèces bactériennes mésophiles (optimum de croissance < 40°C ; Caillon et al., 1983 ; Rütters et al., 2001 ; Grossi et al., 2015), les AGE ont souvent été identifiés chez des bactéries (hyper)thermophiles (Langworthy et al., 1983 ; Huber et al., 1992 ; 1996 ; Sinninghe Damsté et al., 2007 ; Hamilton-Brehm et al., 2013) ou acidophiles (Sinninghe Damsté et al., 2011 ; 2014) et chez de rares planctomycètes constituant une branche profonde de l'arbre du vivant (Sinninghe Damsté et al., 2005). En conséquence, la biosynthèse des éthers de glycérol a souvent été considérée comme une caractéristique de bactéries devant résister à des conditions environnementales extrêmes (cas des environnements primitifs), et plus spécialement à des températures élevées et/ou des pH très acides (Jahnke et al., 2001 ; Valentine, 2007 ; Koga, 2012). Ces observations faites sur des souches isolées ne sont cependant pas en adéquation avec celles faites dans le milieu naturel. En effet, au cours de ces dernières années, une grande diversité structurale d'éthers de glycérol non-isoprénoïdes a été mise en évidence dans divers écosystèmes non-thermophiles (e.g., sédiments marins/lacustres plus ou moins anciens, colonne d'eau océanique, sols), démontrant l'omniprésence de ces lipides dans l'environnement (e.g., Pancost et al., 2001 ; Bradley et al., 2009 ; Saito et al., 2013 ; Yang et al., 2015 ; Wang et al., 2016).

En raison de leur présence généralisée *in-situ*, de leur stabilité diagénétique², et de leur spécificité biologique, les AGE bactériens ont le potentiel de constituer des biomarqueurs utiles pour les études

²Les liaisons éthers sont relativement résistantes aux processus d'hydrolyse durant la dégradation de la matière organique, ce qui peut entraîner la préservation des éthers de glycérol dans des sédiments datant de plusieurs millions d'années (Saito et al., 2013).

paléoenvironnementales. Toutefois, un manque crucial d'information sur les (micro)organismes précurseurs limite notre compréhension des modes de formation et des fonctions physiologiques de ces lipides (Weijers et al., 2006 ; Goldfine, 2010 ; Grossi et al., 2015). Bien que la biosynthèse des éthers lipidiques et leur rôle dans l'organisation et la stabilité des membranes d'Archaea aient été beaucoup étudiés ces dernières années (e.g., Lombard et Moreira, 2011; Matsumi et al., 2011), il n'existe aucun corollaire chez les Bacteria. Il est également connu que, lorsqu'elles sont soumises à des variations des conditions environnementales, les bactéries maintiennent une fluidité et une perméabilité optimales de leurs membranes en ajustant leur composition en lipides membranaires (processus d'adaptation homéovisqueuse ; Sinensky, 1974 ; Denich et al., 2003 ; Mykytczuk et al., 2007). Mais si ces mécanismes sont bien documentés pour les membranes bactériennes constituées d'acides gras phospholipidiques (ou acylglycérols), l'implication éventuelle des éthers de glycérol dans cette adaptation est actuellement inconnue.

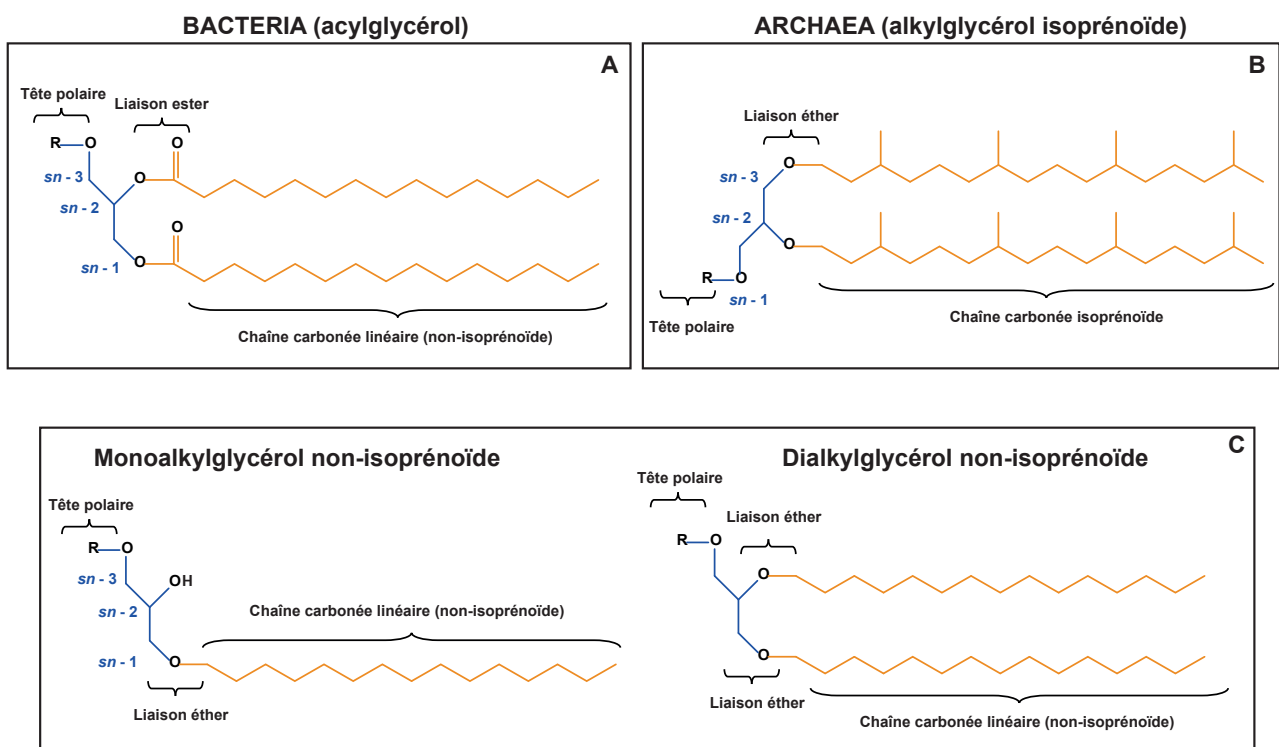


Figure 1 : Structures chimiques de glycérophospholipides communément retrouvés chez les Bacteria (A) et chez les Archaea (B), et structure d'un monoéther et d'un diéther de glycérol non-isoprénoïdes retrouvés chez certaines Bacteria (C).

Ce travail a été effectué dans le cadre du projet ANR BAGEL [Production bactérienne d'éthers lipidiques : Implications biogéochimiques, (paléo)environnementales et évolutives] financé par le programme ANR Blanc 2012 (Projet ANR-12-BSV7-0003; coordinateur V. Grossi).

Objectifs de la thèse

Cette thèse vise à répondre aux questions suivantes :

- *Quels sont les modes de formation des éthers de glycérol bactériens ? Leur synthèse est-elle influencée par la nature de la source de carbone ?*

- *Peut-on caractériser le rôle des AGE au sein des cellules bactériennes ? Ces lipides sont-ils impliqués dans la régulation de la fluidité et/ou de la perméabilité de la membrane lorsque les paramètres environnementaux varient ?*

- *Peut-on établir un lien direct entre des modifications de la composition en AGE des bactéries et des variables physico-chimiques telles que la température, la salinité et le pH ?*

- *Peut-on mettre en évidence ce même genre de liens dans le milieu naturel afin d'utiliser les AGE comme indicateurs de variations des conditions environnementales (actuelles ou passées) ?*

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons dans une première partie du doctorat employé une approche par culture en conditions contrôlées de souches pures de bactéries. Une première étape fut de déterminer et de sélectionner différents modèles biologiques capables de produire des éthers de glycérol. Le choix de ces modèles a été guidé par la découverte en amont de la thèse (stage de Master 2) d'une souche bactérienne mésophile et sulfato-réductrice appartenant au phylum des *Deltaproteobacteria* (*Desulfatibacillum alkenivorans* souche PF2803) capable de synthétiser à la fois des MAGE et des DAGE. Nous avons ensuite sélectionné différentes espèces bactériennes en fonction de leur proximité métabolique et phylogénétique avec la souche PF2803, afin de maximiser les chances de trouver des espèces capables de produire des AGE. Ces souches ont été mises en culture par l'équipe Environnement et Microbiologie de l'IPREM (UMR CNRS 5254) de l'université de Pau et des Pays de l'Adour (de même pour l'ensemble des cultures utilisées au cours de la thèse). Le contenu lipidique de ces souches a ensuite été analysé au sein du pôle de géochimie organique du Laboratoire de Géologie de Lyon. Une autre espèce du genre *Desulfatibacillum* est apparue capable

de synthétiser les deux classes d'AGE (MAGE et DAGE) alors que les autres souches testées n'ont été capables de produire que des MAGE ou aucun AGE. La seconde étape de ce travail fut de mettre au point un protocole optimisé et reproductible d'extraction et de séparation du contenu lipidique des cellules cultivées. Cette étape avait aussi pour but d'établir une procédure de purification des éthers de glycérol afin de faciliter leur identification et leur quantification dans des souches pures, mais également lors de l'analyse d'échantillons naturels. La troisième étape a consisté à étudier l'influence de la source de carbone sur la synthèse bactérienne d'éthers de glycérol, en effectuant différentes cultures de souches pures en présence de substrats de nature et de longueur de chaînes carbonées différentes. Cette étape avait pour but de mieux comprendre les modes de formation des AGE en réponse à des changements de substrat carboné. L'étape suivante a consisté à cultiver nos deux souches modèles capables de synthétiser des MAGE et des DAGE en faisant varier individuellement certains paramètres physico-chimiques de croissance : Température, Salinité et pH. Cette partie essentielle du travail de thèse avait pour but de déterminer les modifications de la composition en acides gras (AG), en MAGE et en DAGE induites par des variations des paramètres environnementaux, et de caractériser la réponse physiologique liée à chacun des paramètres testés afin de préciser le rôle des AGE dans l'adaptation des membranes bactériennes.

La seconde partie de la thèse est une approche environnementale qui a consisté en l'analyse de la distribution des AGE *in-situ*. Nous avons sélectionné différents écosystèmes d'âge et de conditions de dépôt variables. Deux de ces environnements sont des systèmes marins anciens (séries sédimentaires anciennes), et deux autres sont des systèmes aquatiques salés continentaux (lac et étangs actuels). La première étape de cette étude a été de déterminer la distribution structurale des AGE dans ces environnements aux conditions environnementales contrastées, afin d'identifier les homologues et/ou isomères d'AGE retrouvés les plus fréquemment. Nous avons ensuite tenté de relier des variations de distribution en AGE observées *in situ* avec des variables environnementales (en nous aidant des observations faites sur les cultures de souches pures), afin de tester le potentiel des AGE comme outil de reconstruction de conditions (paléo)environnementales. La sélection de différents environnements sédimentaires relativement bien contraints en termes de conditions de dépôt des sédiments et caractérisés par des conditions environnementales contrastées (température ou salinité) a permis de répondre à ce dernier objectif.

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de 6 chapitres, dont deux sous la forme d'articles de

recherche (un publié et un non publié en cours de soumission).

Le **Chapitre 1** présente un état de l'art sur les lipides membranaires des trois grands domaines du vivant, et sur le cas particulier des éthers de glycérol bactériens. Il traite également des adaptations membranaires classiquement observées chez les bactéries et du rôle physiologique des lipides membranaires dans ces adaptations. La dernière partie de ce chapitre décrit différents proxys organiques basés sur des lipides membranaires et couramment utilisés de nos jours pour retracer certaines conditions paléoenvironnementales.

Le **Chapitre 2** contient le détail des procédures expérimentales élaborées et utilisées au cours de cette thèse, des conditions de culture des souches pures jusqu'aux techniques d'extraction, de séparation et d'analyse des lipides cellulaires ou issues de matrices sédimentaires.

Le **Chapitre 3**, présenté sous forme d'article publié, traite de l'influence du substrat de croissance sur la synthèse d'éthers de glycérol par 3 souches de bactéries mésophiles sulfato-réductrices.

Le **Chapitre 4**, présenté sous forme de chapitre en anglais mais récemment publié dans le journal *Frontiers in Microbiology* (2017), se focalise sur les modifications en fonction de la température de croissance de la composition en AG, en MAGE et en DAGE de deux souches mésophiles et une souche thermophile sulfato-réductrices.

Le **Chapitre 5** traite de l'influence du pH et de la salinité sur la synthèse d'éthers de glycérol par deux souches de bactéries mésophiles sulfato-réductrices.

Le **Chapitre 6** concerne l'identification d'AGE dans le milieu naturel et l'utilisation possible de ces lipides en tant qu'indicateurs de variations de conditions environnementales passées.

Le manuscrit se termine par des conclusions générales et certaines perspectives.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1. Les trois domaines du vivant

1.1.1. Définition des trois domaines

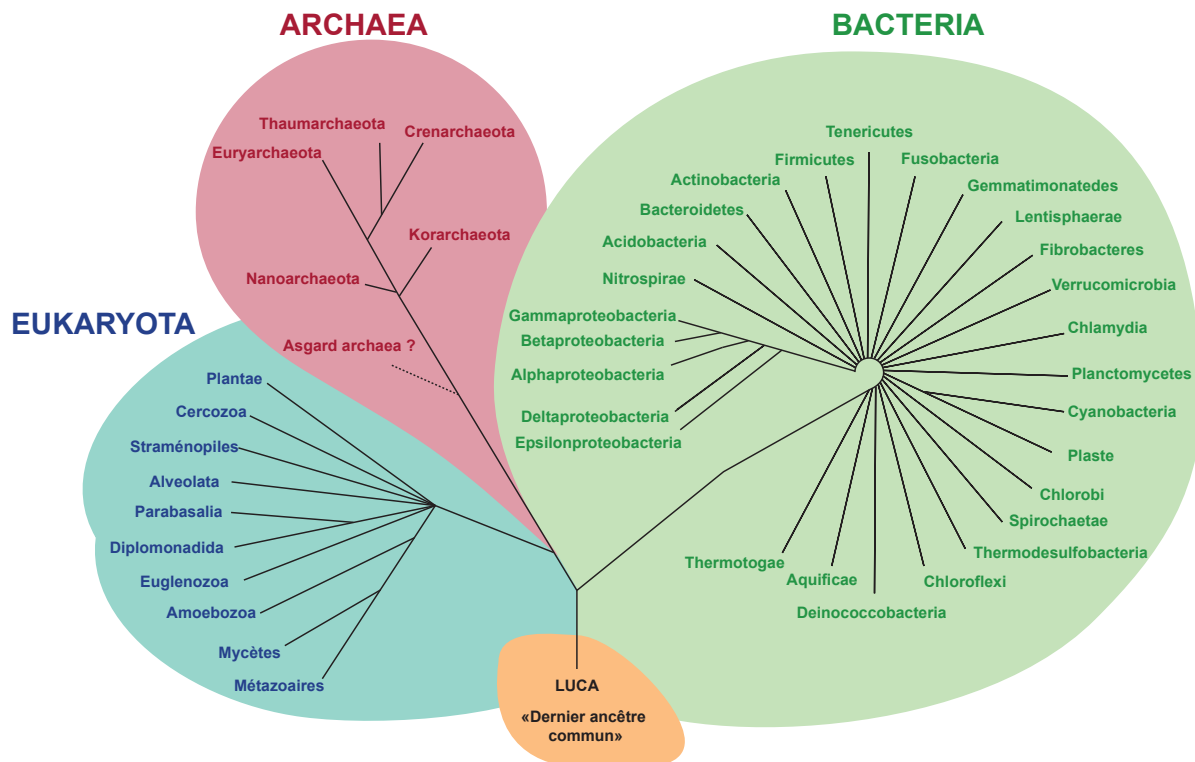


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique et principaux phylums des trois domaines du vivant sur Terre (modifié d'après Woese et al., 1990, Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006 et Madigan et al., 2015).

Les travaux de Woese et al. (1977, 1990) ont permis de distinguer les trois domaines du vivant: les Archaea, les Bacteria et les Eukaryota (Figure 1.1). Avant l'introduction des techniques de classification moléculaire dans les années 1970, la distinction entre les cellules d'Archaea et de Bacteria était impossible, et ces deux types d'organismes étaient confondus dans le même domaine des Prokaryota. En effet, la morphologie des cellules (dépourvues de noyau) des Bacteria et des Archaea est très similaire. A cette époque, il était également très compliqué de cultiver des Archaea en conditions contrôlées en laboratoire, ce qui a limité leur caractérisation (Brochier-Armanet et al., 2011). Seuls les Eukaryota étaient facilement différenciés des Prokaryota car la structure et la composition des cellules contenant un noyau sont plus complexes. La comparaison des séquences génétiques universelles comme celles impliquées dans la synthèse des protéines (ARN et protéines ribosomiques ; Fox et al., 1977), a été un outil essentiel pour distinguer les trois grands domaines

du vivant et ainsi constituer l'arbre phylogénétique actuel de la vie sur Terre (Figure 1.1). Les trois domaines ont tous divergé d'un même ancêtre commun appelé LUCA (pour Last Universal Common Ancestor) dont l'origine, la nature, la morphologie et la composition cellulaire sont à ce jour encore débattues (Figure 1.1 ; Fitch et Upper, 1987 ; Lombard et al., 2012).

1.1.1.1. Domaine des Bacteria

Les Bacteria sont des organismes unicellulaires procaryotes. Parmi les Bacteria, au moins 84 embranchements (appelés phylums) ont été découverts jusqu'à présent. Beaucoup de ces phylums ne sont connus que par séquençage des gènes de l'ARN ribosomique récupérés à partir d'échantillons environnementaux (Lang et al., 2013). En effet, ces méthodes de séquençage de l'ARN (16S) permettent d'identifier des centaines de micro-organismes (dont les bactéries présentes en faible abondance ou non cultivables) à partir d'une seule analyse. Seulement 32 des 84 phylums sont basés sur des souches pures qui ont été cultivées en laboratoire. Parmi ces dernières, 90% appartiennent aux phylums des *Actinobacteria*, des *Firmicutes*, des *Bacteroidetes* et à l'embranchement des *Proteobacteria* (lui-même divisé en 5 classes : les *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* et *Epsilon-Proteobacteria* ; Figure 1.1 ; Logan et Vos, 2015).

La plupart des phylums bactériens contiennent une grande diversité d'espèces et présentent une énorme diversité en termes de physiologie. Par exemple, le phylum des *Proteobacteria* inclue des organismes pratiquant la respiration aérobie, la fermentation, la nitrification et la dénitrification, la fixation de l'azote, la réduction des sulfates, l'oxydation du soufre et des sulfures, la phototrophie, l'oxydation du méthane, etc... (Horner-Devine et al., 2004).

1.1.1.2. Domaine des Archaea (anciennement Archaeobacteria)

En 1977, Woese et Fox proposent un nouveau domaine de la vie, les Archaeobacteria, en plus des Eubacteria (Bacteria) et des Eukaryota, sur la base de leurs assemblages génomiques. En effet, l'ARN ribosomique (ARNr) et l'ARN de transfert (ARNt) sont différents entre les Archaeobacteria et les Bacteria, ce qui a permis de distinguer ces deux grands groupes de microorganismes unicellulaires procaryotes (Woese et al., 1978). Le caractère souvent extrêmophile des Archaeobacteria, vivant dans

des conditions rappelant celles de la Terre primitive (haute salinité, haute température, forte acidité ou en condition d'anoxie), a conduit à l'idée que les Archaeobacteria étaient des organismes très anciens et limités à des environnements inhabituels (Woese et al., 1978). Après que Woese et al. (1990) aient modifié le terme Archaeobacteria en Archaea, l'idée que ces microorganismes sont tous extrêmophiles a été abandonnée suite à la découverte d'archées dans tous les compartiments océaniques (DeLong, 1992 ; Fuhrman et al., 1992) et à la mise en évidence de leur large répartition au sein de la biosphère (Chaban et al., 2006 ; Gribaldo et Brochier-Armanet, 2006).

Le domaine des Archaea est divisé en 7 phylums, mais seulement 5 sont basés sur des souches qui ont été cultivées en laboratoire (Figure 1.1 ; Logan et Vos, 2015). Les plus importants sont les *Euryarchaeota* (comprenant toutes les espèces halophiles et méthanogènes, ainsi que quelques thermophiles et psychrophiles) et les *Crenarchaeota* (comprenant les espèces hyperthermophiles ; Figure 1.1 ; Allers et Mevarech, 2005 ; Schleper et al., 2005 ; Brochier-Armanet et al., 2008). Il existe également le phylum des *Thaumarchaeota* composé d'organismes mésophiles (Brochier-Armanet et al., 2008), ainsi que deux autres phylums représentés chacun par une seule espèce cultivée : les *Korarchaeota* (Barns et al., 1996) et les *Nanoarchaeota* (Hohn et al., 2002) mais ce dernier embranchement demeure très controversé (Figure 1.1 ; Brochier-Armanet et al., 2005). Récemment, un nouveau phylum d'Archaea, les *Lokiarchaeota*, a été proposé (Spang et al., 2015). Il est composé d'archées issues de sédiments marins profonds mais non cultivées en laboratoire, et forme un groupe monophylétique avec les Eukaryota (Spang et al., 2015). Dernièrement, l'analyse d'autres archées marines dans des sédiments profonds a révélé l'existence d'un super-phylum nommé « Asgard archaea » également monophylétique avec les Eukaryota, qui inclurait les *Lokiarchaeota* (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Les génomes des archées appartenant à ce super phylum codent un grand nombre de protéines eucaryotes impliquées dans les fonctions cytosquelettiques et la formation de vésicules (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Ces archées sont suspectées être phylogénétiquement très proches du dernier ancêtre commun archée-eucaryote (Last Archaeo-Eukaryotic Common Ancestor ; LAECA ; Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017).

Les Archaea partagent des caractères communs avec les Eukaryota et les Bacteria. La physiologie ainsi que le métabolisme des Archaea sont très proches de ceux des Bacteria, alors que les mécanismes de réplication, transcription, traduction et réparation de l'ADN sont similaires aux Eukaryota (Forterre et al., 2002 ; Lindas et Bernander, 2013).

1.1.1.3 Domaine des Eukaryota

Les eucaryotes sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires possédant un noyau contenant le matériel génétique. Leur origine exacte reste une question majeure en évolution, à ce jour non résolue. La cellule eucaryote actuelle est à la fois composée de gènes provenant des Bacteria et des Archaea et plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer son origine. La théorie la plus commune propose que des phénomènes d'endosymbiose ainsi que des transferts de gènes ont été à l'origine des premières cellules des Eukaryota (Sagan, 1967 ; Tortora et al., 2010). En effet, les mitochondries des eucaryotes modernes proviendraient de l'incorporation d'une bactérie (du phylum des *Proteobacteria*) utilisant la respiration dans une archée anaérobie hôte, et les chloroplastes se seraient formés par l'incorporation d'une cyanobactérie photosynthétique (Vellai et Vida, 1999).

D'après l'arbre phylogénétique du vivant (Figure 1.1 ; Woese et al. 1990), les Eukaryota sont plus étroitement liés aux Archaea qu'aux Bacteria. Les nombreux transferts de gènes entre les Bacteria et les Archaea ont rendu la phylogénie des Eukaryota basée sur l'ARN ribosomique très difficile à reconstruire, et encore débattue à ce jour. Six super-phylums sont plus ou moins définis : les *Opisthokontes* (regroupant le phylum des mycètes et des métazoaires), les *Amoebozoa*, les *Plantae* (ou *Archaeplastida* ; regroupant les algues vertes, rouges et les plantes), les *Excavata*, les *Chromalveolata* (regroupant les *Alveolata* et les *Straménopiles*) et les *Rhizaria* ; toutefois, ces deux derniers formeraient un phylum à part nommé *Harosa* (Adl et al., 2012).

1.1.2. Structure cellulaire des trois domaines du vivant

D'un point de vue composition chimique, les procaryotes et les eucaryotes sont similaires, car leurs cellules possèdent toutes des acides nucléiques, des protéines, des lipides et des glucides. Les organismes des trois domaines utilisent des réactions chimiques similaires pour métaboliser leurs sources nutritives, stocker de l'énergie et synthétiser des protéines. En revanche, la structure des cellules (parois cellulaires et membranes) est un critère qui permet de distinguer les deux types de procaryotes, et de les différencier des eucaryotes. Nous verrons dans la suite de l'exposé bibliographique, que les lipides membranaires (glycérophospholipides) des Bacteria et des Eukaryota diffèrent de ceux des Archaea. Le contenu cellulaire est également différent entre les procaryotes et les eucaryotes. Le cytoplasme des procaryotes est principalement composé d'eau, de molécules inorganiques et

organiques, d'ADN libre (nucléoïde), de plasmides, de ribosomes et d'inclusions (Figure 1.2A). Les cellules eucaryotes possèdent quant à elles un noyau cellulaire contenant le matériel génétique, ainsi que de nombreux organites (structures spécialisées ayant des fonctions spécifiques ; Figure 1.2B ; Madigan et al., 2015).

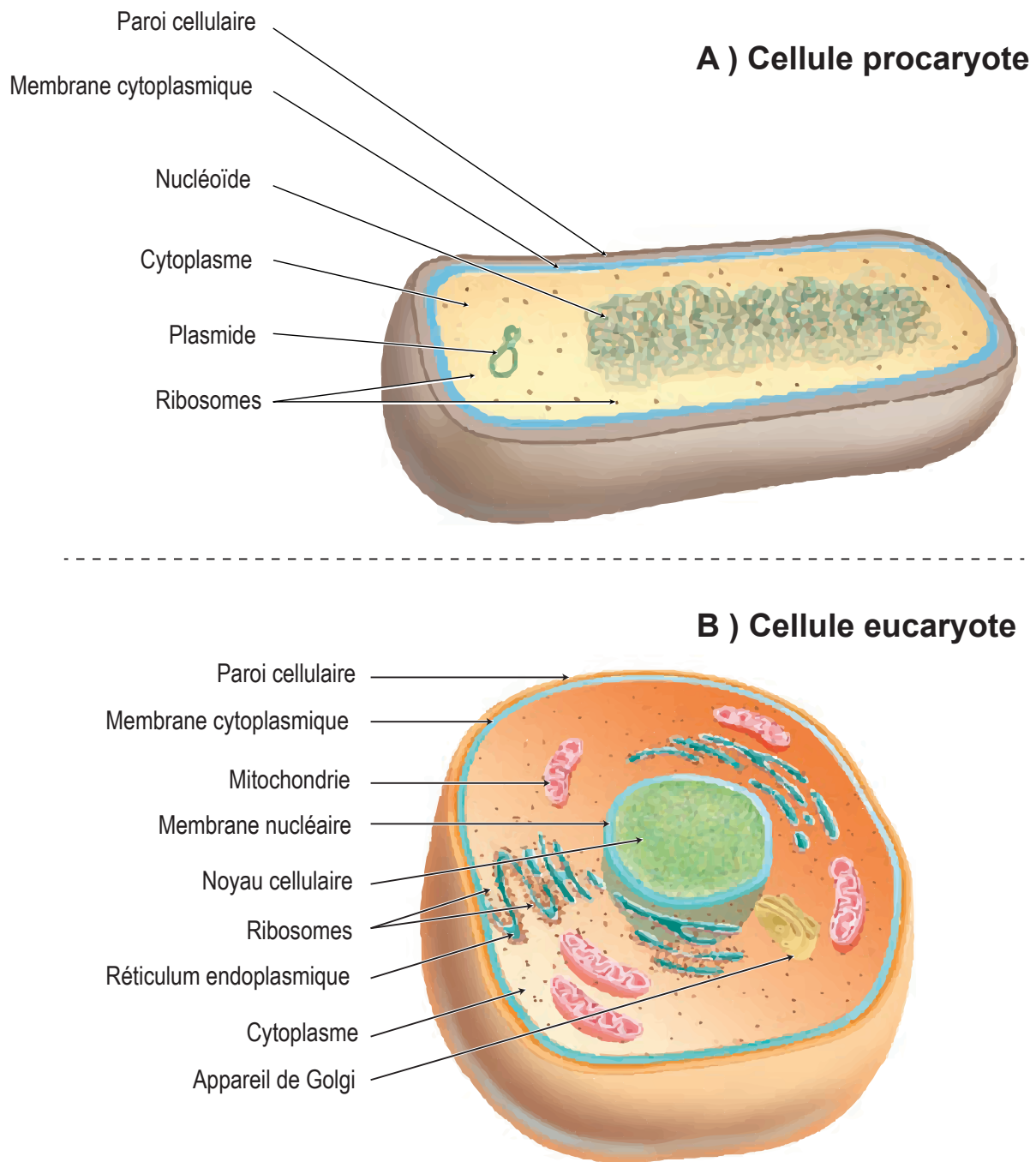


Figure 1.2 : Vues en coupe (modifiées d'après Madigan et al., 2015) d'une cellule procaryote (A) et eucaryote (B).

1.1.2.1. Les cellules bactériennes

Les cellules des Bacteria ont des diamètres généralement compris en 1 et 4 μm , mais des cellules allant de 0,2 μm (*Mycoplasma pneumoniae* ; Chanock et al., 1962) à 750 μm (*Thiomargarita namibiensis* ; Schulz et Schulz., 2005) de long ont été observées. Les morphologies décrites chez les bactéries sont diverses et variées. Une cellule qui est sphérique ou ovoïde est appelée un coccus (pluriel cocci). Plusieurs cocci peuvent former de longues chaînes ou des grappes. Une cellule de forme cylindrique est appelée tige ou bacille. Plusieurs tiges forment des spirales et sont appelées spirilles. D'autres formes moins communes peuvent être observées (e.g. bactéries filamenteuses). Les cellules bactériennes peuvent être ornementées par des fimbriae (permettant aux cellules de se fixer aux surfaces, y compris aux tissus des animaux dans le cas de bactéries pathogènes) et par des pili (facilitant l'échange génétique entre les cellules dans un processus appelé conjugaison et servant de récepteur pour certains virus ; Anderson, 1949 ; Yanagawa et al., 1968). Les cellules bactériennes peuvent aussi être encapsulées, présenter des inclusions servant de lieux de stockage (e.g. réserve de lipides, azote, soufre, etc...), ou bien des vésicules de gaz. Certaines bactéries sont capables de se déplacer soit grâce à un flagelle (mobilité dans les milieux liquides), soit en glissant sur des surfaces solides (Macnab, 2003).

Les espèces de Bactéries peuvent être divisées en deux grands groupes, appelés Gram-positifs et Gram-négatifs, en fonction de la structure de l'enveloppe cellulaire (ensemble paroi + membrane ; Figure 1.3). La paroi cellulaire des Gram-négatives se compose d'au moins deux couches, alors que celle des Gram-positives est uni-membrée et plus épaisse (Figure 1.3 ; Bishop et Work, 1965 ; Brown et al., 2015). Les parois cellulaires des bactéries Gram-négatives et Gram-positives sont composées d'une couche rigide qui est principalement responsable de leur résistance. Cette couche, appelée peptidoglycane (Figure 1.3), est composée d'un polysaccharide dérivé de deux sucres, l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine, de quelques acides aminés et de l'acide diaminopimélique (DAP). Le peptidoglycane est trouvé uniquement chez les bactéries et n'a jamais été trouvé dans les parois cellulaires d'Archaea ou d'Eukaryota (Salton, 1952, 1994). Jusqu'à 90% de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives est composée de peptidoglycane (Figure 1.3A). Bien que certaines bactéries n'aient qu'une seule couche de peptidoglycane, de nombreuses bactéries Gram-positives ont plusieurs feuillets de peptidoglycane empilés les uns sur les autres (Figure 1.3A ; Navarre et Schneewind, 1999). Les cellules Gram-positives contiennent également des acides

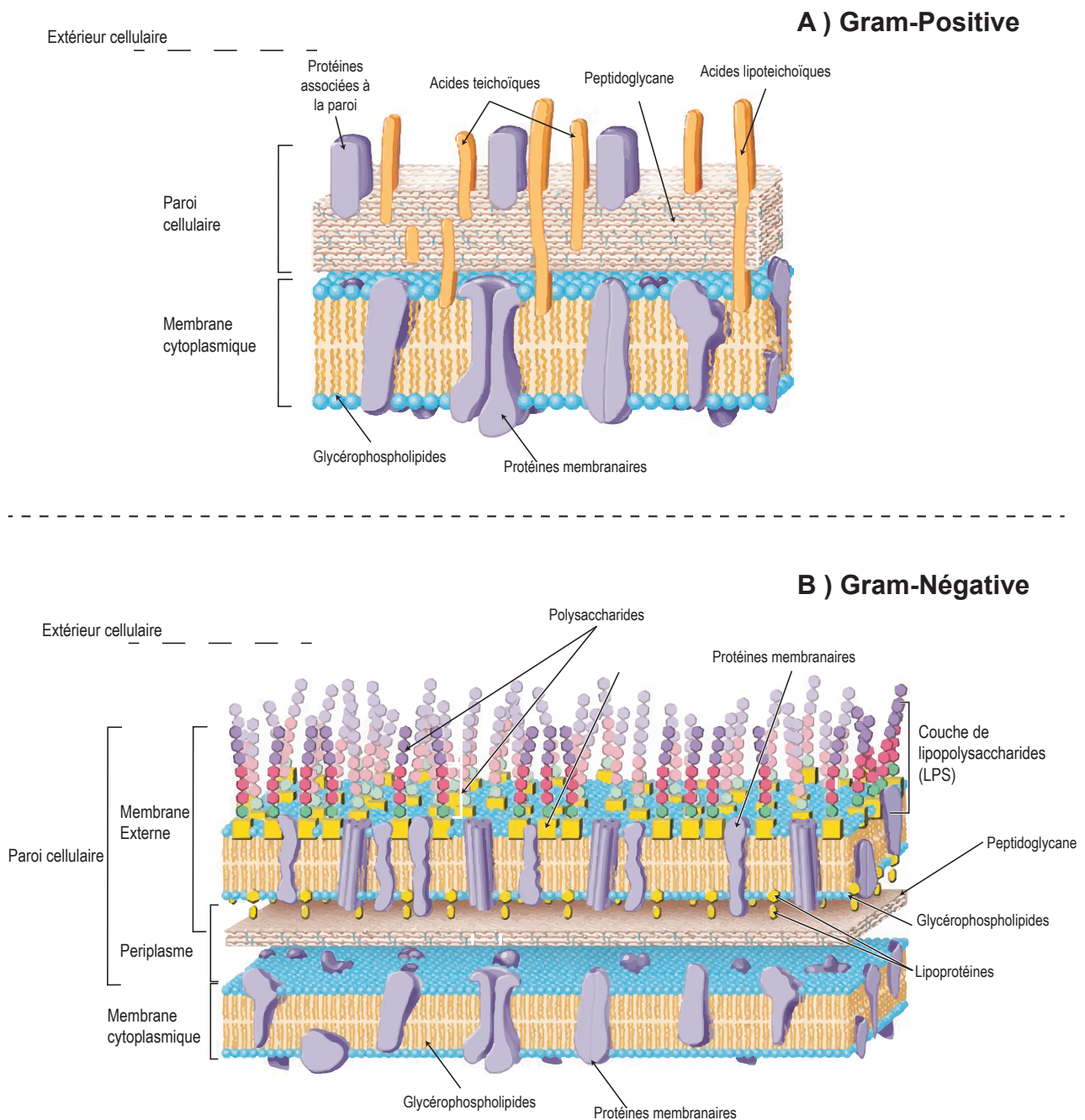


Figure 1.3 : Schéma (modifié d'après Madigan et al., 2015) de la structure de la paroi et membrane(s) chez les bactéries Gram-Positives (A) et Gram-Négatives (B).

teichoïques et des protéines incorporés à leur paroi (Figure 1.3A). Certains acides téichoïques, appelés acides lipoteichoïques, sont liés par covalence aux lipides membranaires (Figure 1.3A). En dessous de la couche de peptidoglycane se trouve la membrane cytoplasmique composée d'environ 50% de glycérophospholipides (GPL) et 50 % de protéines (Figure 1.3A).

Chez les bactéries Gram-négatives, la structure de l'enveloppe cellulaire est beaucoup plus complexe (Figure 1.3B). Seule une petite partie de la paroi cellulaire totale est constituée de peptidoglycane

(Figure 1.3B). La majeure partie de la paroi est constituée par la membrane externe. Celle-ci est une couche lipidique similaire à la membrane cytoplasmique, mais qui comporte des lipoprotéines en plus des GPL et des protéines membranaires (Figure 1.3B). La membrane externe contient également de nombreux polysaccharides liés aux lipides, formant une couche de lipopolysaccharide (LPS ; Figure 1.3B). Comme les bactéries Gram-positives, les cellules Gram-négatives présentent une membrane interne cytoplasmique, composée de protéines et de GPL (50% respectivement ; Figure 1.3B).

1.1.2.2. Les cellules d'Archaea

La morphologie des Archaea vue au microscope optique est très proche de celle des Bacteria (Madigan et al., 2015). Les cellules d'Archaea sont dépourvues de noyau et autres organites, et leurs tailles sont comprises entre 0,1 et 15 μm . Certaines cellules présentent des flagelles assurant la mobilité de la cellule dans les milieux liquides (Ghosh et Albers, 2011).

Le peptidoglycane, spécifique des bactéries, est absent des parois cellulaires des Archaea. Cependant, les parois de certaines Archaea méthanogènes contiennent une molécule apparentée au peptidoglycane, un polysaccharide appelé pseudomuréine. La plupart des membranes d'Archaea possèdent à leur surface une couche superficielle protéique appelée «couche S», souvent associée à la membrane cytoplasmique et composée de protéines ou de glycoprotéines. La structure paracrystalline des couches S peut former diverses symétries (hexagonale, tétragonale ou trimérique), contribue à la forme des cellules et constitue une protection contre les stress osmotiques (Albers et Meyer, 2011). Comme chez les bactéries, la membrane cytoplasmique des Archaea est composée de protéines et de GPL (~50% respectivement).

1.1.2.3. Les cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes sont généralement plus grandes que celles des procaryotes. Le diamètre des cellules eucaryotes peut être compris entre 2 et plus de 600 μm (en moyenne 8 μm de diamètre). Une différence majeure entre le cytoplasme des Eukaryota et celui des Prokaryota réside dans leur structuration qui est plus complexe chez les Eukaryota qui forme un cytosquelette (présences de microfilaments et de microtubules). Le cytoplasme eucaryote comporte des ribosomes comme celui

des procaryotes, mais également de nombreux organites comme le noyau cellulaire, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, des lysosomes, des vacuoles, des mitochondries, des chloroplastes, etc... (Figure 1.2B).

De nombreux eucaryotes ont des extensions cellulaires (composées de cytoplasme et entourées par une membrane plasmique) utilisées pour la mobilité cellulaire ou pour déplacer des substances à la surface de la cellule. Lorsque les extensions sont peu nombreuses et sont longues par rapport à la taille de la cellule, elles sont appelées flagelles. Si elles sont nombreuses mais courtes par rapport à la taille de la cellule, elles sont appelées cils (Gibbons, 1981).

La plupart des cellules eucaryotes ont des parois cellulaires, qui sont en général beaucoup plus simples que celles des cellules procaryotes. Comme pour les Archaea, les parois cellulaires des Eukaryota ne contiennent pas de peptidoglycane. De nombreuses algues ont des parois cellulaires constituées d'assemblages polysaccharides-cellulose (comme toutes les plantes). Les parois cellulaires de certains champignons contiennent aussi de la cellulose, mais également des assemblages polysaccharides-chitine (qui constituent aussi majoritairement l'exosquelette des crustacés et des insectes). Les parois cellulaires des levures contiennent quant à elles des mannoprotéines, des polysaccharides-glucanes et de la chitine. Dans d'autres cellules eucaryotes, y compris les cellules animales, la membrane plasmique est recouverte par un glycocalyx. Cet élément permet la protection de la membrane cytoplasmique. Il est composé de glycoprotéines et de protéoglycanes, et l'ensemble est lié de manière covalente aux lipides et aux protéines de la membrane cytoplasmique (Madigan et al., 2015). Il permet notamment chez les mammifères de relier les cellules entre elles et peut contribuer à la reconnaissance cellulaire. Les membranes cytoplasmiques sont quant à elles assez proches de celles des procaryotes car elles sont au même titre composées de GPL et de protéines.

1.1.3. Composition de la membrane cytoplasmique et structure des lipides membranaires

1.1.3.1. Les esters de glycérol des Bacteria et des Eukaryota

Les composants lipidiques les plus abondants dans la plupart des membranes sont les GPL. Les GPL des bactéries et des eucaryotes sont typiquement constitués d'acides gras avec des chaînes carbonées linéaires (pouvant contenir des insaturations ou des ramifications, et différer en nombre

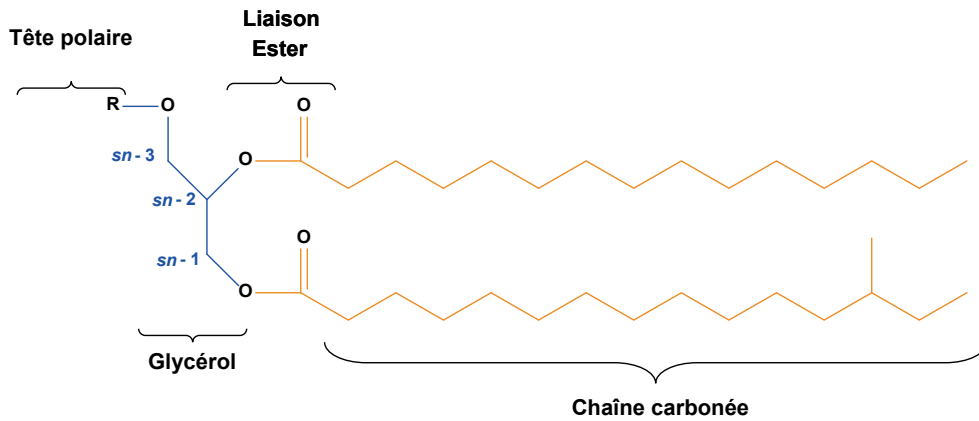


Figure 1.4 : Structure chimique d'un glycérophospholipide de type diacylglycérol communément retrouvé chez les Bacteria et les Eukaryota.

d'atomes de carbone), reliées à une molécule de glycérol par des liaisons esters (diacylglycérol ou diester de glycérol ; DAG ; **Figure 1.4** ; **Madigan et al., 2015**). La stéréochimie des GPL des bactéries et des eucaryotes est la même : les chaînes carbonées sont reliées en position *sn-1* et *sn-2* à un *sn*-glycérol-3-phosphate (**Figure 1.4** ; **Koga et al., 1998** ; **Albers and Meyer, 2011** ; **Lombard et al., 2012** ; **Koga, 2014**). La membrane cytoplasmique communément observée chez les Bacteria et les Eukaryota est composée de GPL possédant des longueurs des chaînes acyles comprises entre 14 à 20 atomes de carbone. Les GPL sont des molécules amphipathiques : la tête polaire contenant le groupement phosphate est hydrophile, alors que les chaînes d'acides gras estérifiées sont hydrophobes. Pour cette raison et grâce à leurs petites tailles, ces lipides membranaires s'organisent sous la forme d'une bicouche lipidique stable (**Figure 1.5A** ; **Lodish et al., 2001**). Des protéines membranaires extrinsèques dites périphériques (situées de part et d'autre de la membrane) et des protéines intrinsèques dites

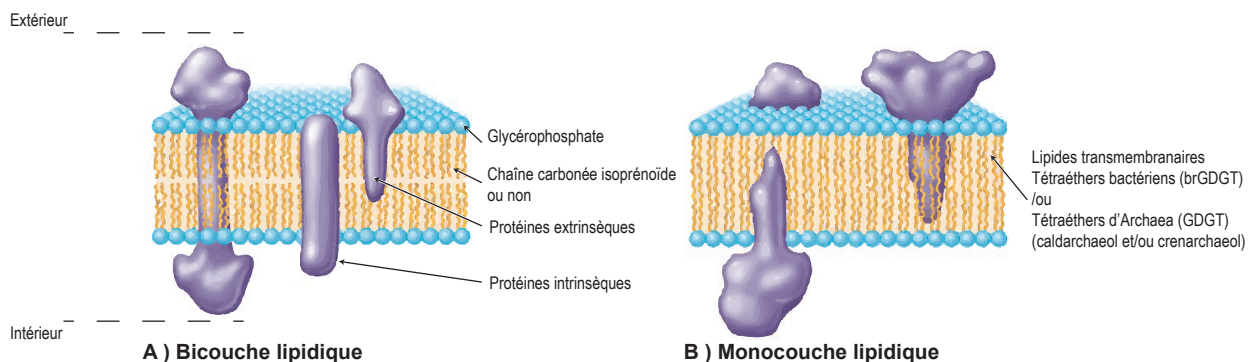


Figure 1.5 : Architecture d'une bicouche (A) et d'une monocouche (B) lipidique (modifié d'après **Madigan et al., 2015**).

transmembranaires (traversant la membrane de part en part) s'intègrent également dans la bicouche lipidique (Figure 1.5A ; Finean et Michell, 1981).

Les membranes cytoplasmiques sont composées d'environ 50% de lipides et 50% de protéines, bien que ces proportions puissent varier. La composition lipidique des différentes membranes cellulaires varie également. Ainsi, la membrane cytoplasmique d'*Escherichia coli* se compose principalement de phosphatidyléthanolamine (PE), qui constitue 80% des lipides totaux (Cooper, 2000) alors que chez les autres bactéries, le phosphatidylglycérol (PG) et la PE sont les GPL les plus synthétisés (Ratledge et Wilkinson, 1988). Chez les eucaryotes (notamment les mammifères), les membranes cytoplasmiques sont principalement composées de quatre GPL principaux : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS), la PE et la sphingomyéline (Cooper, 2000).

Les membranes eucaryotes (mais aussi celles des Bacteria) contiennent des carbohydrates (hydrates de carbone), qui servent de sites d'attache et de récepteurs pour les bactéries, et qui ont aussi un rôle dans la reconnaissance cellulaire. Les eucaryotes possèdent également des stérols (lipides renforçant la rigidité des membranes) qui ne sont jamais retrouvés dans les membranes des Prokaryota (à l'exception des cellules bactériennes du genre *Mycoplasma* ; Razin et al., 1982). En revanche, les membranes cytoplasmiques de certaines bactéries sont renforcées par des molécules de type hopanoïdes qui jouent le même rôle que les stérols chez les eucaryotes mais qui ne sont pas retrouvés chez les archées (Larry, 2005).

1.1.3.2. Les éthers de glycérol des Archaea

Les lipides membranaires des Archaea sont typiquement constitués d'alcools avec des chaînes carbonées isoprénoïdes (répétition d'une unité isoprène) reliées à une ou deux molécules de glycérol par des liaisons éther (Figure 1.6 ; Kates et al., 1963 ; Sprott et al., 1991 ; Kates, 1992 ; Valentine, 2007). La stéréochimie des GPL d'archées est différente de celle des bactéries et des eucaryotes (Figure 1.6 ; Albers et Meyer, 2011 ; et références associées). En effet, les chaînes carbonées sont reliées en position *sn*-2 et *sn*-3 à un ou deux *sn*-glycérol-1-phosphate (Figure 1.6A ; Kates et al., 1963 ; Albers et Meyer, 2011 ; Lombard et al., 2012). Les Archaea possèdent des lipides membranaires qui ne sont pas retrouvés chez les autres formes de vie, principalement l'archaeol (un diéther composé de 2 chaînes

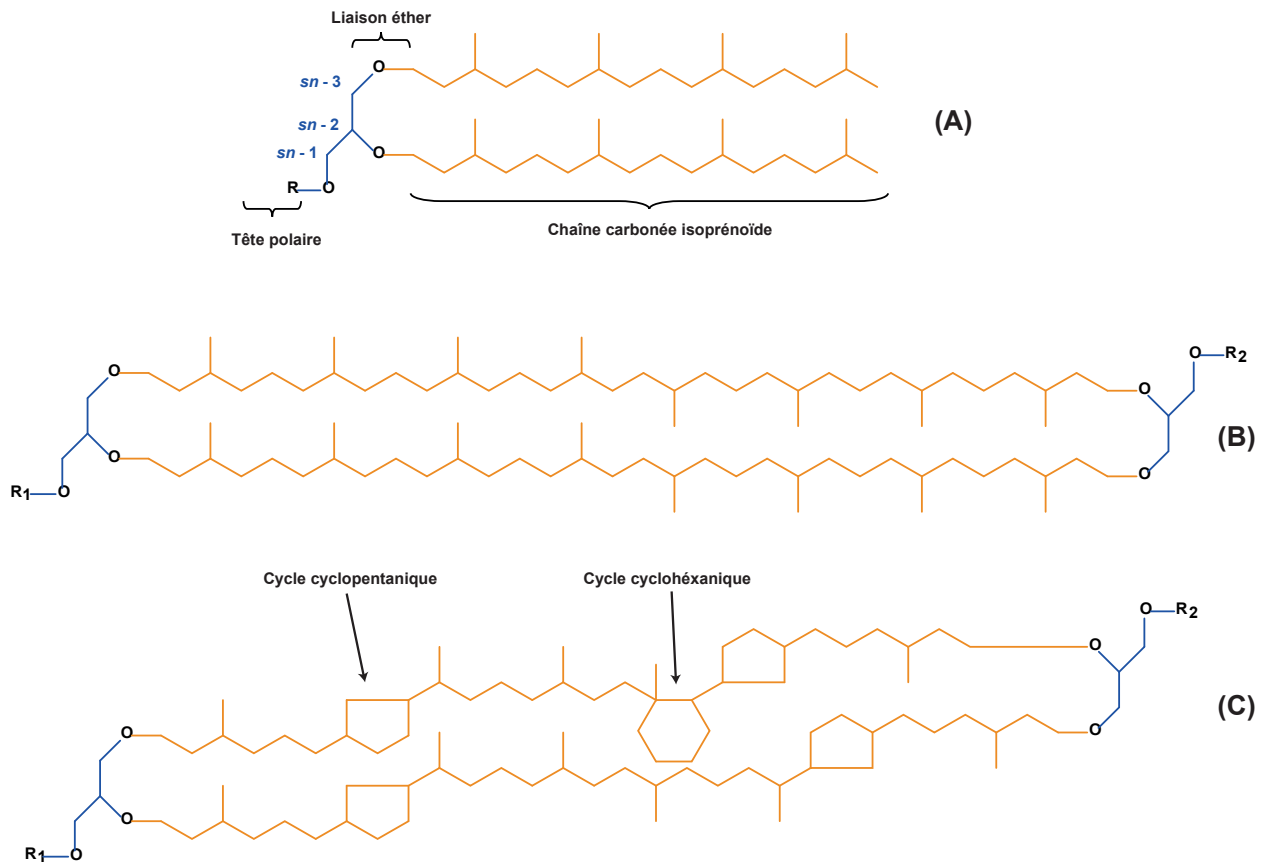


Figure 1.6 : Structures chimiques des glycérophospholipides de type dialkylglycérol (A, archaeol) et tétraéther de glycérol (B, caldarchaeol et C, crenarchaeol) isoprénoïdes communément retrouvés chez les Archaea.

isoprénoïdes en C₂₀; **Figure 1.6A**) et le caldarchaeol (un tétraéther composé de 2 chaînes de biphytane en C₄₀ éthérfiées à 2 molécules de glycérol; **Figure 1.6B** ; [Valentine, 2007](#)). De nombreux lipides dérivés des 2 précédents existent également, dont des tétraéthers contenant des cycles dans leurs chaînes carbonées (**Figure 1.6C** ; [Gliozzi et al., 1983](#) ; [De Rosa et Gambacorta, 1988](#) ; [Zhang et al., 2006](#)). C'est l'exemple du crenarchaeol qui est omniprésent chez les *Thaumarchaeota* (**Figure 1.6C** ; [Sinninghe Damsté et al., 2002](#)). Le crenarchaeol possède 4 cycles à 5 carbones (cyclopentaniques) et un cycle à 6 carbones (cyclohexanique). En raison de leur structure macrocyclique, les caldarchaeols et les crenarchaeols forment une monocouche lipidique dans la membrane de certaines Archaea (**Figure 1.5B**) alors que la présence d'archaeol (ou de ses dérivés) induit l'existence d'une bicouche lipidique (**Figure 1.5A** ; [Patel et Sprott, 1999](#) ; [Patel et Chen, 2010](#)).

Les principaux groupes polaires (ou têtes polaires) des phospholipides d'Archaea sont le glycérol (glycolipide), le myo-inositol, la L-sérine et l'éthanolamine ; ceux-ci sont également retrouvés dans

les phospholipides bactériens (Koga et al., 2014). D'autres groupes polaires ont été identifiés chez les Archaea (e.g. diméthyl- et triméthylaminopentanetetrol, et glucosaminylinositol), mais n'ont été identifiés que dans un nombre restreint d'espèces (Ferrante et al., 1987 ; Nishihara et al., 1992 ; Morii et al., 1999).

1.1.3.3. Les éthers de glycérol bactériens

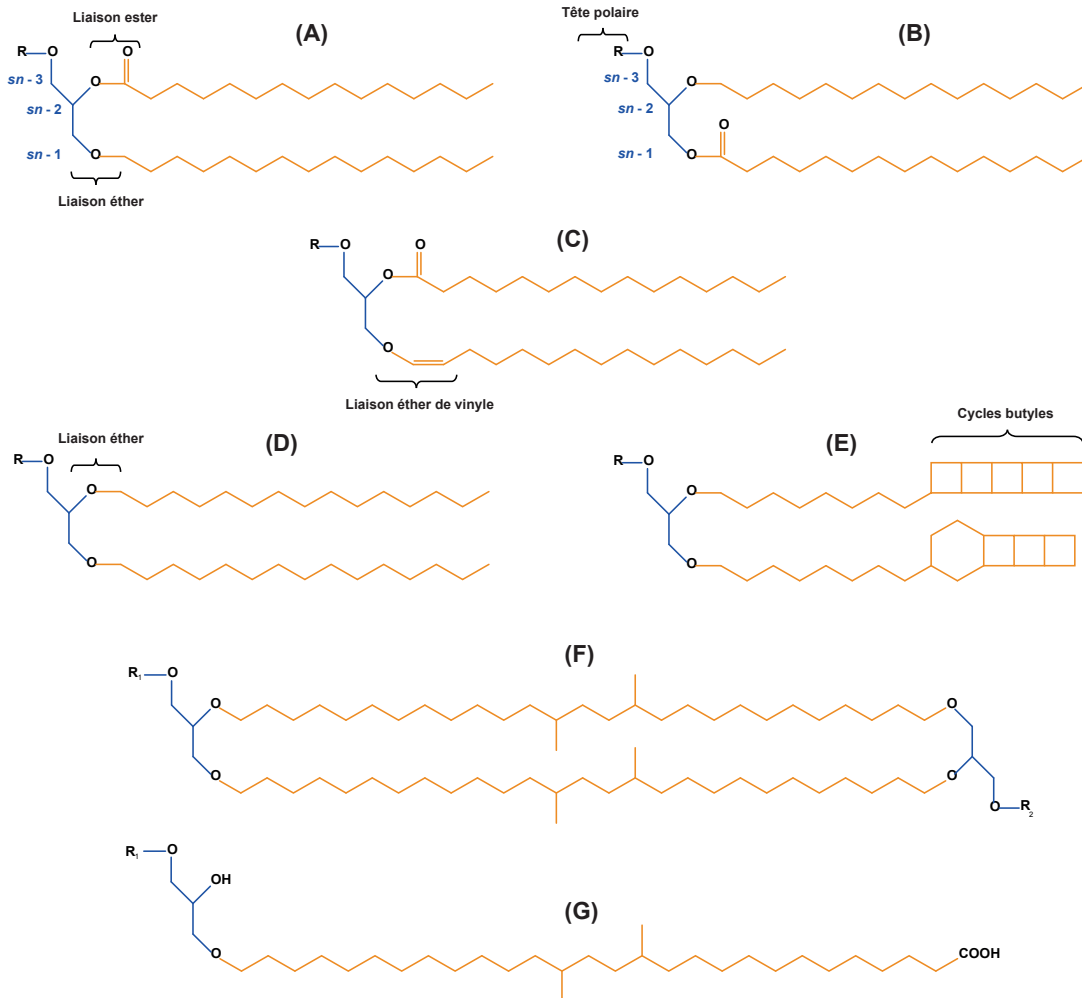


Figure 1.7 : Structures chimiques des glycérophospholipides de type alkylglycérol non-isoprénoïdes retrouvés chez certaines bactéries. Structure d'un monoalkyl/monoacylglycérol (A ; 1-O-MAGE), d'un monoacyl/monoalkylglycérol (B ; 2-O-MAGE), d'un plasmalogène (C), d'un dialkylglycérol (D), d'un dialkylglycérol de type ladderane (E), d'un tétraéther de glycérol ramifié (F) et d'un monoalkylglycérol dérivé de l'acide *iso*-diabolique (G)

Nous avons vu précédemment que les GPL des Bacteria et des Eukaryota se différencient de ceux des Archaea notamment par le type de liaison chimique qui relie les chaînes carbonées à la molécule de glycérophosphate. En effet, les lipides de Bacteria et d'Eukaryota possèdent généralement des liaisons esters, alors que les lipides d'Archaea possèdent des liaisons éthers. Il existe cependant des exceptions à cette règle. Des phospholipides constitués de chaînes carbonées non-isoprénoïdes reliées par des liaisons éthers à une molécule de *sn*-glycérol-3-phosphate (stéréochimie du glycérophosphate

propre aux Bacteria et Eukaryota) ont en effet été identifiés chez un certain nombre de bactéries (Koga et al., 1998 ; Grossi et al., 2015 ; et références associées). Les souches connues à ce jour pour synthétiser des éthers de glycérol non-isoprénoïdes (ou alkylglycérol bactériens ; AGE), ont été répertoriées dans le **tableau 1.1** en fonction du type d'AGE synthétisé. Ce tableau inclut aussi les souches testées au cours de cette thèse (dans le cadre de l'ANR BAGEL) mais qui n'ont pas été utilisées pour les études décrites dans les chapitres suivants. Les AGE ont été retrouvés à ce jour chez 46 espèces cultivées en laboratoire, réparties au sein de 10 phylums de Bacteria.

Il existe différentes structures d'éther de glycérol bactériens. Les principales sont représentées dans la **figure 1.7**. La forme la plus simple contient une chaîne alkyle liée en position *sn*-1 d'un glycérol (1-*O*-monoalkylglycérol ; 1-*O*-MAGE) et éventuellement une chaîne acyle en position *sn*-2 (monoalkyl/monoacylglycérol ; **Figure 7A** et **Tableau 1**). Si la chaîne alkyle est liée en position *sn*-2 du glycérol, il s'agit alors d'un 2-*O*-monoalkylglycérol (2-*O*-MAGE), qui peut éventuellement contenir une chaîne acyle en position *sn*-1 (monoacyl/monoalkylglycérol ; **Figure 1.7B** et **Tableau 1.1**). Ces deux types de MAGE ont été retrouvés chez des bactéries aérobies et anaérobies (**Tableau 1.1**). De nombreuses bactéries anaérobies et quelques bactéries aérobies synthétisent également des plasmalogènes (Pla), qui possèdent une liaison éther de vinyle en position *sn*-1 d'un glycérol (1-alken-1'-yl-2-acylglycérol ; **Figure 1.7C**). Les plasmalogènes sont aussi retrouvés dans les tissus des mammifères et notamment chez les humains, où ils peuvent avoir un certain nombre de fonctions biologiques telles que la signalisation intracellulaire (en réponse à des stimuli) ou un rôle protecteur contre des stress oxydatifs (Horrocks and Sharma, 1982 ; Goldfine, 2010). Cependant, les plasmalogènes présenteraient des voies biosynthétiques distinctes entre les bactéries (anaérobies) et les animaux (Goldfine, 2010 ; Guan et al., 2011 ; Pearson, 2014 ; Grossi et al., 2015). Des éthers de glycérol présentant deux chaînes alkyles liées en positions *sn*-1 et *sn*-2 à un glycérol (1,2-*O*-dialkylglycérol ; DAGE ; **Figure 1.7D**), ont été identifiés chez un petit nombre de bactéries (**Tableau 1.1**). Certaines espèces de *Planctomycètes* sont capables de synthétiser des DAGE présentant des cycles butyles en bout de chaîne alkyle (nommés ladderanes ; Lad ; **Figure 1.7E** et **Tableau 1.1**). Des structures transmembranaires présentant 4 liaisons éthers (tétraéthers de glycérols ramifiés ; brGDGT ; **Figure 1.7F**) ont été identifiées chez seulement 3 espèces de Bacteria (**Tableau 1.1**). Logiquement, les bactéries capables de synthétiser des DAGE, sont également capables de synthétiser les 2 classes de monoalkylglycérols (i.e., 1-*O*- et 2-*O*-MAGE ; **Tableau 1.1**). Il est toutefois surprenant de remarquer

Tableau 1.1 : Liste des espèces bactériennes reportées pour synthétiser des éthers de glycérol. Des exemples de structures représentatives des différents types d'éthers de glycérol sont présentés dans la **figure 1.7**.

	Espèces	Ordre / Phylum	Préférence de température	Type d'éthers de glycérol						Références
				1-O-MAGE	2-O-MAGE	DAGE	brGDGT	Pla	Lad	
Bactéries aérobies	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	Rubrobacterales / Actinobacteria	T	✓						Carreto et al., 1996
	<i>R. radiotolerans</i>	Rubrobacterales / Actinobacteria	T	✓						Carreto et al., 1996
	<i>Demabacter hominis</i>	Micrococcales / Actinobacteria	M	✓						Valero-Guillén et al. 2016
	<i>Rhodothermus marinus</i>	Bacteroidetes / Bacteroidetes	T	✓	✓	✓				Jorge et al., 2015
	<i>Myxococcus xanthus</i>	Myxococcales / Deltaproteobacteria	M	✓				✓		Ring et al., 2006
	<i>M. stipitatus</i>	Myxococcales / Deltaproteobacteria	M	✓						Stein et Budzikiewicz, 1987
	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	Myxococcales / Deltaproteobacteria	M	✓	✓	✓				Caillon et al. 1983 ; Asselineau et Asselineau, 1990
	<i>Mycoplasma fermentans</i>	Mycoplasmatales / Tenericutes	M	✓				✓		Wagner et al., 2000
	<i>Aquifex pyrophilus</i>	Aquificales / Aquificae	H	✓	✓	✓				Huber et al., 1992
	<i>Pyrinomonas methylaliphatoenes</i>	Acidobacteriales / Acidobacteria	T	✓*						Crowe et al., 2014 ; Sinnighe Damsté et al., 2014
	<i>Blastocatella fastidiosa</i>	Acidobacteriales / Acidobacteria	M	✓*						Sinnighe Damsté et al., 2014
	<i>Aridibacter famidurans</i>	Acidobacteriales / Acidobacteria	M	✓*						Sinnighe Damsté et al., 2014
	<i>A. kavangonensis</i>	Acidobacteriales / Acidobacteria	M	✓*						Sinnighe Damsté et al., 2014
	<i>Edaphobacter aggregans</i>	Acidobacteriales / Acidobacteria	M	✓*			✓			Sinnighe Damsté et al., 2011
Acidobacteriaceae A2-4c and 307	Acidobacteriales / Acidobacteria	M	✓*			✓			Sinnighe Damsté et al., 2011	
Bactéries anaérobies	<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> AM13	Desulfobivriales / Deltaproteobacteria	M	✓						Non publié
	<i>Desulfatirhabdium butyrivorans</i>	Desulfobacterales / Deltaproteobacteria	M	✓						Non publié
	<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Desulfobacterales / Deltaproteobacteria	M	✓						Rütters et al., 2001 ; Sturt et al., 2004
	<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>	Desulfobacterales / Deltaproteobacteria	M	✓	✓	✓				Grossi et al., 2015 ; Vinçon-Laugier et al., 2016
	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	Desulfobacterales / Deltaproteobacteria	M	✓	✓	✓				Vinçon-Laugier et al., 2016
	<i>Desulfatiferula olefinivoran</i>	Desulfobacterales / Deltaproteobacteria	M	✓						Vinçon-Laugier et al., 2016
	<i>Desulforhabdus amnigenus</i>	Syntrophobacterales / Deltaproteobacteria	M	✓						Rütters et al., 2001
	<i>Frankia Alni</i>	Actinomycetales / Actinobacteria	M	✓						Non publié
	<i>Propionibacterium propionicum</i>	Actinomycetales / Actinobacteria	M	✓						Paściak et al., 2003
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bifidobacteriales / Actinobacteria	M					✓		Oberg et al., 2011
	<i>B. longum</i>	Bifidobacteriales / Actinobacteria	M	✓				✓		Timmer et al., 2014
	<i>Clostridium novyi</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Guan et al., 2011
	<i>C. butyricum</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Koga et Goldfine, 1984 ; Johnston et Goldfine, 1988 ; MacDonald et Goldfine, 1990
	<i>C. beijerinckii</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Goldfine et Johnston, 2005
	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Goldfine et Johnston, 2005
	<i>C. tetani</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Johnston et al., 2010
	<i>C. thermocellum</i>	Clostridiales / Firmicutes	T					✓		Timmons et al., 2009
	<i>Veillonella parvula</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Prins et Van Golde 1973 ; Prins et Van Golde, 1976
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Clostridiales / Firmicutes	M					✓		Prins et Van Golde 1973 ; Prins et Van Golde, 1976
	<i>Ruminococcus RT94</i>	Clostridiales / Firmicutes	M	✓						Hynönen et al., 2016
	<i>Ammonifex degensii</i>	Clostridiales / Firmicutes	H	✓	✓	✓				Huber et al., 1996
	<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	Thermodesulfobacterales / Thermodesulfobacteria	H	✓	✓	✓				Langworthy et al., 1983 ; Sturt et al., 2004 ; Hamilton-Brehm et al., 2013
	<i>T. hveragerdense</i>	Thermodesulfobacterales / Thermodesulfobacteria	T	✓	✓	✓				Sturt et al., 2004
	<i>T. geofontis</i>	Thermodesulfobacterales / Thermodesulfobacteria	H	✓	✓	✓				Hamilton-Brehm et al., 2013
	<i>T. hydrogeniphilum</i>	Thermodesulfobacterales / Thermodesulfobacteria	T	✓	✓	✓				Hamilton-Brehm et al., 2013
	<i>Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"</i>	Planctomycetales / Planctomycetes	M	✓	✓	✓			✓	Sinnighe Damsté et al., 2005
<i>Candidatus "Brocadia anammoxidans"</i>	Planctomycetales / Planctomycetes	M	✓	✓	✓			✓	Sinnighe Damsté et al., 2005	
<i>Thermotoga maritima</i>	Thermotogales / Thermotogae	H	✓*			✓			Sinnighe Damsté et al., 2007	
<i>T. lettingae</i>	Thermotogales / Thermotogae	H	✓*						Sinnighe Damsté et al., 2007	
<i>T. elfii</i>	Thermotogales / Thermotogae	H	✓*						Sinnighe Damsté et al., 2007	
<i>T. neapolitana</i>	Thermotogales / Thermotogae	H	✓*						Sinnighe Damsté et al., 2007	

^a M = mésophile ; T = thermophile ; H = hyperthermophile

^b 1-O-MAGE = alkyl/acylglycérol ; 2-O-MAGE = acyl/alkylglycérol ; DAGE = 1,2-O-dialkylglycérol

Pla = plasmalogènes ; Lad = Ladderanes ; brGDGT = glycerol dialkyl glycerol tétraéthers branchés.

Non publié = Souches étudiées au cours de la thèse mais non présentées dans le manuscrit de thèse

✓* = 1-O-Monoalkylglycérol dérivé de l'acide iso-diabolique (en C₃₀ ou C₃₂)

qu'aucun 2-*O*-MAGE n'a été reporté chez les bactéries capables de former des brGDGT, alors que des 1-*O*-MAGE (contenant une chaîne dérivée de l'acide *iso*-diabolique en C₃₀ ou C₃₂ di-ramifiée) ont été identifiés en parallèle des brGDGT (Figure 1.7G et Tableau 1.1 ; Sinnighe Damsté et al., 2007, 2011 et 2014).

La biosynthèse des liaisons éthers a souvent été considérée comme une spécificité de bactéries extrêmophiles du fait que les DAGE ont été identifiés initialement dans des bactéries (hyper) thermophiles (Langworthy et al., 1983 ; Huber et al., 1992, 1996). Mais l'identification de ces lipides chez de plus en plus de souches de bactéries mésophiles démontre que ce postulat initial n'est plus valable (Tableau 1.1). En raison du caractère atypique et de la présence restreinte des éthers de glycérol chez les bactéries (à l'exception des plasmalogènes qui sont répandus chez les Eukaryota et les Bacteria), très peu d'informations sont actuellement disponibles concernant la biosynthèse et le rôle physiologique de ces lipides membranaires (Weijers et al., 2006 ; Grossi et al., 2015).

1.2. Adaptation membranaire aux variations environnementales : rôle essentiel des lipides

1.2.1. Rôles de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique a plusieurs fonctions. C'est une barrière perméable qui contrôle le transport d'ions ou de molécules à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (Cooper et al., 2000). La membrane est aussi un lieu où se concentrent les protéines. Certaines protéines transportent des solutés entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, et d'autres sont des enzymes qui ont un rôle dans la conservation de l'énergie. La membrane cytoplasmique est un site majeur de conservation d'énergie dans la cellule procaryote. La membrane peut exister sous une forme énergétiquement chargée dans laquelle les protons (H⁺) sont séparés des ions hydroxydes (OH⁻) à travers la surface de la membrane. La séparation des charges forme un état excité et cette source d'énergie, appelée la force proton motrice, est responsable de nombreuses fonctions cellulaires nécessitant de l'énergie, telles que des réactions de transport, la motilité cellulaire, et la biosynthèse de l'Adénosine-TriPhosphate (ATP ; énergie nécessaire pour le métabolisme, la locomotion, la division cellulaire, etc... ; Dowhan, 1997 ; Cooper et al., 2000). Le maintien de l'intégrité membranaire est donc essentiel pour garder une activité cellulaire optimale.

1.2.2. Propriétés physiques de la membrane cytoplasmique

La configuration structurale de la membrane la plus couramment observée chez différents organismes est une version modifiée du modèle de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicolson (1972). La membrane cytoplasmique est constituée d'une bicouche lipidique fluide intégrant des protéines membranaires extrinsèques et intrinsèques (e.g. Figure 1.5A ; Finean et Michell, 1981). Les lipides neutres comme les hopanoïdes (bactéries), stérols (eucaryotes) et caroténoïdes (bactéries et archées) contribuent à la structure de la membrane (Ratledge et Wilkinson, 1988). Des hydrates de carbones peuvent être retrouvés attachés à des protéines ou à des lipides et s'étendent à partir de la membrane vers l'extérieur de la cellule (Finean et al., 1978). Cette structure confère diverses propriétés physico-chimiques (Denich et al., 2003). Dans des conditions physiologiques normales, les GPL membranaires organisés en bicouches forment un liquide cristallin, considéré comme l'état biologiquement actif de la membrane (Sinensky et al., 1974 ; Denich et al., 2003). Cette bicouche se comporte comme un fluide en deux dimensions (deux couches de lipides), en raison de l'agitation thermique naturelle qui entraîne les phospholipides à tourner librement autour de leurs axes et à diffuser latéralement à l'intérieur de la membrane, tout en laissant les chaînes d'acides gras (pour les Bacteria et les Eukaryota) et les chaînes alcools (pour les Archaea) des phospholipides orientées vers l'intérieur hydrophobe de la membrane (Borenstain et Barenholz, 1993 ; Lodish et al., 2000). Les phospholipides qui constituent la membrane sont donc libres de se déplacer au sein d'une des deux couches, permettant à la membrane de se comporter comme un fluide bidimensionnel (Lodish et al., 2000 ; Denich et al., 2003 ; Ersnt et al., 2016). En revanche, les phospholipides ne migrent pas, ou ne basculent pas, d'une couche à une autre, car de tels mouvements seraient extrêmement défavorables énergétiquement en raison de la tête polaire hydrophile du phospholipide qui devrait être transportée à travers l'intérieur hydrophobe de la membrane (Lodish et al., 2000). Cependant, dans certaines membranes naturelles, ces mouvements de « flip-flop » peuvent exister et sont amorcés par certaines protéines membranaires appelées flippases (Lodish et al., 2000).

La fluidité d'une membrane est intimement liée à l'agencement des lipides au sein de celle-ci, qui comprend l'empaquetage (« packing »), la structure des lipides, ainsi que la courbure de la membrane (Figures 1.8 et 1.9 ; Rilfors et al., 1984 ; van de Meer, 1984 ; Bloom et al., 1991). Il est également connu que les protéines et les interactions lipides-protéines contribuent à la structure de la membrane

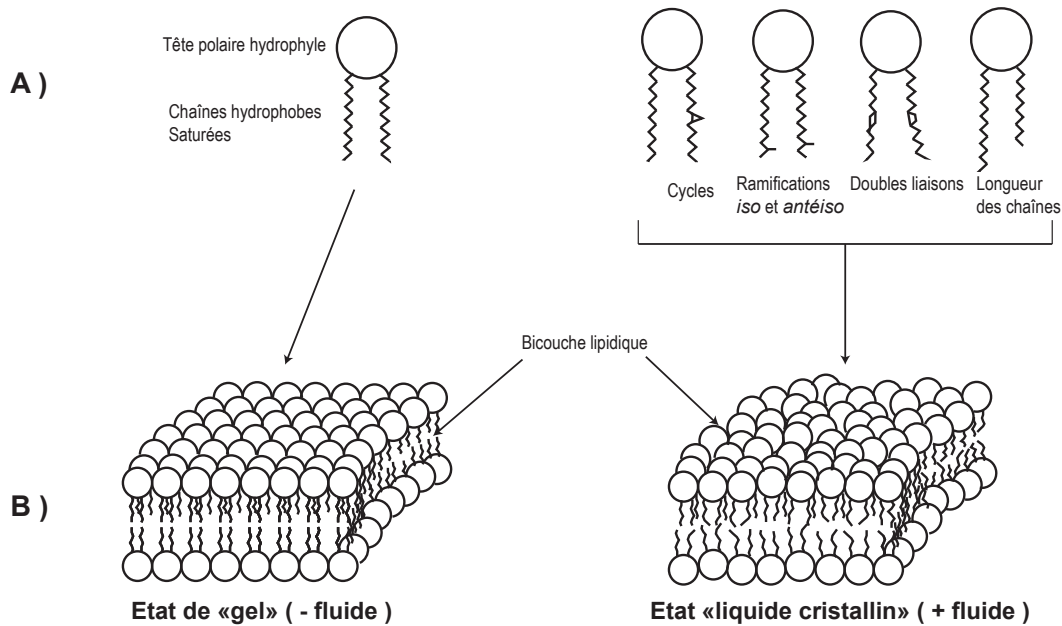


Figure 1.8 : A) Représentation schématique de glycérophospholipides saturés, insaturés, ramifiés ou dont les longueurs des chaînes acyles diffèrent. B) Schéma d'une bicouche lipidique en état de « gel » ou en état de « liquide cristallin ». Modifié d'après Mykytczuk et al., 2007.

et modulent sa fluidité (Sperotto et al., 1989 ; Dumas et al., 1999 ; Fyfe et al., 2001). La fluidité de la bicouche lipidique dépend de sa composition en phospholipides, et en particulier de la nature des chaînes hydrocarbonées (Figures 1.8A et 1.9). Plus ces chaînes sont serrées et entassées (phénomène d'empaquetage ou de packing), moins la membrane est fluide (Figure 1.8B ; Denich et al., 2003). L'empaquetage des chaînes carbonées dans la membrane dépend de plusieurs facteurs : de leurs longueurs, de leur taux d'insaturation et de la présence éventuelle de ramifications (Figures 1.8A-B et 1.9 ; Denich et al., 2003 ; Mykytczuk et al., 2007). Les acides gras bactériens incorporés dans les phospholipides varient en longueur de 12 à 24 atomes de carbones et les chaînes les plus courantes possèdent entre 14 et 20 atomes de carbone (Finean and Michell, 1981 ; Russell and Fukunaga, 1990). En général, la stabilité de la bicouche augmente avec une augmentation de la longueur des chaînes acyles. Les chaînes plus longues pénètrent davantage dans la bicouche en augmentant les interactions de van der Waals entre les chaînes acyles des deux couches, et favorisent une structure membranaire plus rigide (Figures 1.8A-B et 1.9 ; Rilfors et al., 1984 ; Lodish et al., 2000). A l'inverse, des chaînes acyles plus courtes contribuent à la séparation de la bicouche et à une structure plus fluide (Figures 1.8A-B et 1.9 ; Rilfors et al., 1984 ; Mykytczuk et al., 2007). La plupart des phospholipides contiennent des acides gras saturés et des acide gras insaturés (Gennis, 1989 ; Denich et al., 2003). Les doubles

liaisons perturbent les interactions entre les chaînes acyles et entraînent une augmentation du volume du phospholipide et la liberté de rotation (Figures 1.8A-B et 1.9; Quinn, 1981). Chez les bactéries, la modification des proportions des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés est le mécanisme prédominant pour contrôler la fluidité membranaire (Russell, 1984 ; Denich et al., 2003). Les acides gras ramifiés (présence d'un groupement méthyle sur la chaîne) ou présentant des cycles (e.g. cyclopropanique) augmentent la fluidité de la membrane car ils ne favorisent pas la formation de structures cristallines entre les chaînes acyles des phospholipides adjacents (Figures 1.8A-B et 1.9 ; Denich et al., 2003 ; Poger et al., 2015). La présence d'une ramification entraîne une modification de la configuration des phospholipides qui est variable suivant la position à laquelle elle se situe le long de la chaîne acyle (Russell, 1984 ; Denich et al., 2003 ; Poger et al., 2014). Plus la ramification est située en milieu de chaîne, plus l'espace entre deux phospholipides adjacents est important, et plus la fluidité de la membrane est accrue (Figure 1.9 ; Poger et al., 2014). Récemment, il a également été démontré que les chaînes acyles possédant un cycle cyclopropane perturbent l'agencement lipidique, favorisent la diffusion latérale des phospholipides, et améliorent donc la fluidité (Figure 1.9 ; Poger et al., 2015). Mais ces derniers assurent également une seconde fonction en rendant les membranes beaucoup plus stables (Figure 1.9 ; Poger et al., 2015).

Comme précédemment mentionné, l'état actif de la membrane est défini par une phase fluide liquide-cristalline. Cependant, dans des conditions physiologiques normales, certains des lipides membranaires peuvent évoluer vers une phase de « gel » (Mykytczuk et al., 2007). La température est le paramètre qui va entraîner des transitions de phase de la membrane, de l'état cristallin type « gel » à l'état liquide, défini par la température de fusion des phospholipides (en particulier des chaînes acyles) (Sinensky, 1974 ; McElhaney, 1982 ; Cullis et al., 1985 ; Trevors, 2003). Etant donné que le point de transition de phase de la membrane dépend de la température de fusion des chaînes acyles, la composition hétérogène en lipides des membranes biologiques crée une situation dans laquelle des phases « fluide » et des phases « gel » peuvent coexister (Hazel and Williams, 1990 ; Hazel, 1995).

La perméabilité de la membrane est contrôlée par la composition de certaines protéines (appelées conductines à ions qui sont par exemple perméables aux ions minéraux tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^-), mais est également intimement liée à la configuration des lipides et des protéines, et donc à la fluidité de la membrane. Plus la membrane est compacte et rigide, moins d'ions ou de molécules peuvent pénétrer ou sortir de la cellule (van de Vossenberg et al., 1995). La perméabilité à certains ions ou

Avec les chaînes R ₁ et/ou R ₂ =	Effets membranaires	Adaptation à :
Chaîne courte linéaire et saturée 	Augmente la fluidité et la perméabilité	Diminution de la température, de la salinité Augmentation de la pression
Chaîne longue linéaire et saturée 	Diminue la fluidité et la perméabilité	Augmentation de la température, de la salinité, du stress ionique et protonique
Position de la ramification 	Diminue la fluidité et la perméabilité Augmente la fluidité et la perméabilité	Augmentation principalement de la température Diminution principalement de la température
Insaturation (double liaison) trans 	Diminue la fluidité et la perméabilité	Augmentation de la température et du stress osmotique
Insaturation (double liaison) cis 	Augmente la fluidité et la perméabilité	Diminution de la température Augmentation de la pression
Insaturation cyclique 	Augmente la fluidité Diminue la perméabilité Augmente la stabilité	Diminution de la température pH acide

Figure 1.9 : Impact des modifications structurales des chaînes acyles des GPL sur les propriétés des membranes, implications dans l'adaptation à des variations des conditions environnementales.

molécules chargées est également fonction de la nature et de la charge des groupements polaires des GPL (Quinn, 1986). La configuration de la membrane de certaines Archaea en monocouche de lipides transmembranaires (e.g. caldarchaeols) lui confère par défaut une importante rigidité, stabilité et imperméabilité (Choquet et al., 1994 ; Patel et Chen, 2005 ; Valentine, 2007).

1.2.3. Altérations des propriétés membranaires en fonction des stress environnementaux

Le maintien de la fluidité de la membrane est vital pour la cellule car il permet notamment aux protéines membranaires de diffuser rapidement et d'interagir les unes avec les autres. Il permet aussi d'assurer que les constituants membranaires soient répartis de manière égale entre les cellules filles lors de la division cellulaire (Kell, 1984 ; Russell, 1989 ; Lodish et al., 2000). La gestion de la perméabilité des membranes face à l'entrée sélective d'ions ou de petites molécules est également vitale pour la cellule, et permet de maintenir sa composition interne en équilibre avec le milieu extérieur (principe d'homéostasie). Des stress environnementaux (modifications de la température, du pH, de la pression, des concentrations en sel, solutés, solvants, etc...) peuvent venir altérer la fluidité et la perméabilité membranaire et nuire au bon fonctionnement de la cellule (Sajbidor, 1997 ; Denich et al., 2003 ; Mykytczuk et al., 2007). Les bactéries, archées et certains eucaryotes utilisent la diversité de leurs lipides pour modifier l'état physique de leurs membranes en réponse à un stress environnemental, assurant que la membrane cellulaire reste dans un état optimal pour assurer une fonctionnalité continue de la cellule (Finean and Michell, 1981 ; Hazel and Williams, 1990 ; Dowhan, 1997). Cependant, aucune étude n'a été effectuée à ce jour pour caractériser d'éventuelles modifications de la composition en éthers de glycérol de bactéries (MAGE et DAGE) lorsque les paramètres environnementaux varient (Grossi et al., 2015). Le rôle de ces lipides dans l'adaptation des membranes à des variations environnementales n'est pas connu. Nous ne décrivons donc à la suite que les adaptations intervenant au niveau des membranes, et les modifications structurales des lipides classiquement observés chez les bactéries, eucaryotes et archées, en réponse à des variations de certains paramètres environnementaux.

1.2.3.1. Adaptation homéovisqueuse des membranes à des variations de température

En considérant une membrane cellulaire d'un point de vue moléculaire, un changement de température est équivalent à un changement dans le degré de liberté ou de mobilité des acides gras et des protéines dissoutes, et donc à une altération de la fluidité membranaire (Ladbrooke et Chapman, 1969). L'effet de la température est à ce jour le paramètre le plus étudié sur les membranes bactériennes (Mykytczuk et al., 2007). Une augmentation de la température au-dessus des températures optimales de croissance (maximum de division cellulaire) exerce un effet de fluidisation de la membrane cytoplasmique entraîné par la fusion des GPL, tandis qu'une diminution de température induit une

plus grande restriction des mouvements des GPL et des protéines rendant la membrane plus rigide dans un état dit de type « gel » (Quinn, 1981 ; de Mendoza and Cronan, 1983 ; Russell, 1984 ; Hazel and Williams, 1990). Les modifications de la fluidité membranaire entraînées par des variations de température ont été démontrées avec la technique de polarisation de fluorescence chez différents organismes (Sinensky et al., 1974 ; Cossins et al., 1978 ; Pehowich et al., 1988 ; Horváth et al., 1998).

La première observation du remodelage de la composition membranaire en fonction de la température a été faite chez *Escherichia coli* (Marr et Ingraham, 1962). A des températures élevées de croissance, *E. coli* synthétise une proportion accrue de phospholipides membranaires avec des chaînes acyles saturées (Marr et Ingraham, 1962), maintenant ainsi la fluidité membranaire dans des conditions optimales (Sinensky, 1971). Ce mécanisme physiologique a été qualifié d'adaptation homéovisqueuse (Sinensky, 1974) et a été décrit chez divers organismes poïkilothermes (qui ne contrôlent pas la température de la cellule ou de leur corps) comme les procaryotes, champignons, reptiles et poissons (Tiku et al., 1996 ; Los et Murata, 2004 ; Martin et al., 2007 ; Saita et al., 2016). Les modifications structurales les plus courantes des chaînes des GPL induites par la température sont des changements des longueurs moyennes des chaînes ou du degré d'insaturation (Figure 1.9 ; Donato et al., 2000 ; Mannistö et Puhakka, 2001). En effet, les proportions de GPL avec des chaînes courtes et insaturées augmentent avec une diminution de la température de croissance, permettant d'augmenter la fluidité membranaire (Figure 1.9 ; Denich et al., 2003). Des effets similaires sont également obtenus en augmentant la proportion relative de chaînes ramifiées (Haque et Russell, 2004), le rapport des acides gras insaturés *cis* par rapport à la configuration *trans* (Heipieper et al., 1992 ; Henderson et al., 1995), ou le rapport entre les chaînes ramifiées en position *antéiso* et *iso* (Figure 1.9 ; Haque et Russell, 2004 ; Unell et al., 2007).

Les organismes poïkilothermes ont d'autres possibilités pour adapter la fluidité de leur membrane à des variations de la température du milieu environnant que des modifications structurales des chaînes GPL. Certaines bactéries peuvent par exemple changer le taux d'hopanoïdes (Kannenberg et Poralla, 1999), certains eucaryotes leurs teneurs en stérols (Klose et al., 2012) ou en protéines membranaires (Denich et al., 2003), d'autres modifiant la nature des groupements polaires des glycérophospholipides (Donato et al., 2000 ; Klose et al., 2012).

1.2.3.2. Adaptations homéostatiques aux ions et solutés ioniques

Il existe une étroite relation entre la fluidité membranaire et la perméabilité à toutes les substances chimiques présentes dans le milieu (Lande et al., 1995). Le sel et autres solutés ainsi que le pH sont connus pour influencer la structure des chaînes des GPL (Russell et al., 1989, 1993). Par exemple, des concentrations croissantes en NaCl entraînent généralement une diminution de la proportion d'acides gras insaturés, diminuant ainsi la fluidité membranaire (état de « gel ») et par conséquent la perméabilité membranaire (Figure 1.9 ; Adler et Liljenberg, 1981 ; Watanabe et Takakuwa, 1984). Les taux de composés saturés ou possédant des motifs cyclopropaniques (améliorant la stabilité des membranes en conditions de stress ionique et protonique ; Poger et al., 2015) sont également connus pour augmenter à faible pH (Figure 1.9 ; LePage et al., 1987 ; Brown et al., 1997 ; Beales et al., 2004).

Étant donné que la membrane cytoplasmique agit comme une barrière contre les espèces chargées, les ions présents dans le milieu environnant la cellule interagissent principalement avec les têtes polaires des GPL (Quinn, 1986). Dans des environnements fortement ioniques, des adaptations aux stress osmotiques appelées « adaptation à la perméabilité homéo-proton » conduisent généralement à des modifications des charges des lipides membranaires (van de Vossenberg et al., 2000 ; Konings et al., 2002). Ainsi, il est bien connu que les concentrations en phospholipides anioniques (chargés négativement) augmentent avec la salinité, le pH, l'osmolarité ou la présence de solvants organiques (Russell, 1993 ; Russell, 1995 ; Dowhan, 1997 ; López et al., 2006 ; Tsai et al., 2011 ; Ohniwa et al., 2013). La charge globale de la membrane devient négative et permet d'attirer les cations (e.g. Na⁺ et H⁺) pour stabiliser la structure membranaire (Denich et al., 2003).

Les bactéries sont aussi capables de synthétiser de grandes quantités de molécules organiques zwitterioniques telles que la glycine bêtaïne, la carnitine, la choline, la proline ou l'ectoïne, qui sont communément appelées « osmoprotecteurs » (Wood, 1999). Certaines de ces molécules entraînent une augmentation du volume cytoplasmique et de la teneur en eau libre des cellules, permettant aux bactéries de continuer à proliférer même dans des conditions environnementales défavorables comme à haute salinité (Record et al., 1998).

1.2.3.3. Adaptation à la pression

Les effets de la pression ont été largement attribués à des dommages physiques et des pertes de fonction de la membrane cytoplasmique (Yanos, 1986 ; Hazel and Williams, 1990 ; Wuytack et al., 1998 ; Tanaka et al., 2001 ; Mykytczuk et al., 2007). La pression provoque la compaction des lipides et des protéines de la membrane, entraînant la membrane dans un état de type gel, réduisant la fluidité de la membrane (MacDonald, 1984, 1987 ; Hazel et Williams, 1990). Certaines bactéries piézophiles (évoluant à haute pression) sont capables d'augmenter à la fois leur teneur en GPL insaturés mais aussi de produire des lipides membranaires polyinsaturés (Hazel and Williams, 1990). Le degré élevé d'insaturation permet à la membrane de rester fluide même dans des situations de haute pression (Figure 1.9 ; De Long and Yanos, 1985 ; Denich et al., 2003).

1.3. Utilisation des lipides comme outils de reconstruction des variations des conditions environnementales

A la mort des organismes, les composants cellulaires sont libérés dans le milieu naturel, et pour certains, sont préservés au cours du temps. Ainsi, l'étude de la distribution de ces composés dans les sédiments peut parfois permettre de relier cette distribution à une adaptation spécifique des (micro)organismes à des changements environnementaux, et d'utiliser certains composants cellulaires pour retracer des variations environnementales dans des écosystèmes anciens.

1.3.1. Définition d'un biomarqueur et d'un proxy environnemental

Certains constituants de la matière organique (MO) possèdent une spécificité biologique et une stabilité diagénétique qui permettent de les utiliser comme « empreintes moléculaires » sur diverses échelles de temps géologiques. Ces molécules sont appelées biomarqueurs organiques. L'analyse de ces biomarqueurs ou de leurs produits de transformation dans différents compartiments environnementaux (e.g. eau, sédiments, sols) permet entre autre de définir l'origine biologique (production par certaines espèces ou groupes d'espèces) de la MO présente dans ces écosystèmes. L'étude de la MO au niveau moléculaire peut également permettre de retracer les conditions environnementales dans lesquelles les biomarqueurs ont été biosynthétisés, apportés ou préservés.

En effet, nous avons vu précédemment que les organismes vivants modifient la composition de leurs membranes en réponse à des changements environnementaux afin de maintenir la viabilité de leurs cellules. La distribution de certains biomarqueurs organiques préservés dans des environnements marins ou continentaux (sols, lacs) peut donc parfois refléter une adaptation biologique à une condition environnementale donnée. Au cours des dernières décennies, un nombre croissant de biomarqueurs de sources biologiques spécifiques ont été utilisés comme indicateurs de conditions environnementales (ou « proxy environnementaux ») passées (Eglinton et Eglinton, 2008).

Les plus couramment utilisés de nos jours pour reconstruire des paléo environnements sont présentés dans cette section.

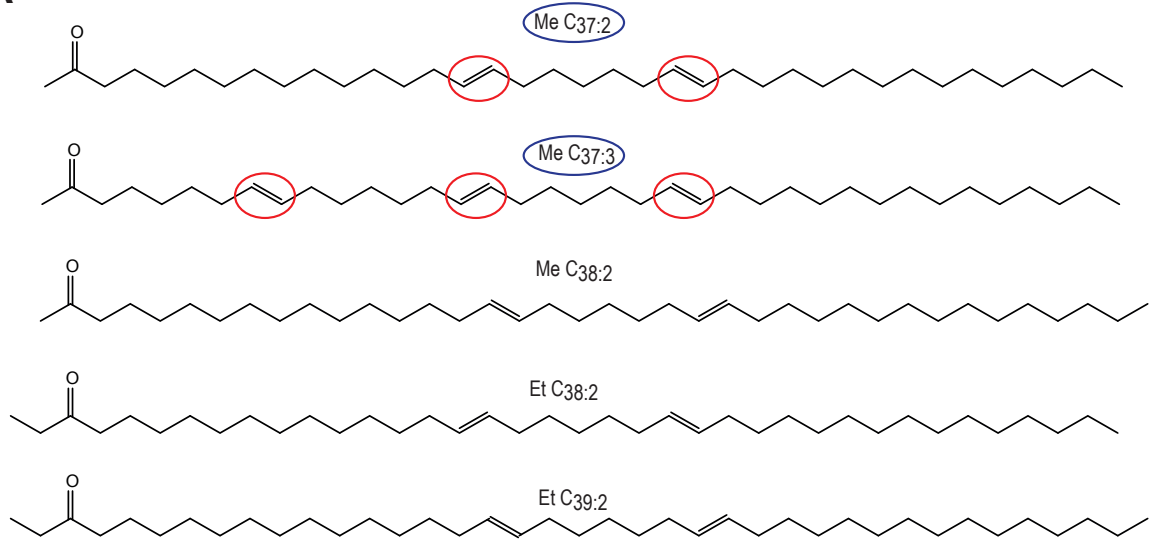
1.3.2. Proxys organiques de température (paléo-thermomètres)

La possibilité d'estimer des températures anciennes de surface de la mer (SST), de lacs ou même de l'air continental est un objectif clé pour reconstruire les conditions climatiques ayant régnées dans le passé, comprendre l'évolution de la Terre à des périodes charnières de son histoire, et améliorer les modèles climatiques actuels en prévision des changements climatiques futurs. Les proxys géochimiques les plus couramment utilisés pour la reconstruction des températures anciennes sont la composition en isotopes stables de l'oxygène ($\delta^{18}\text{O}$) et le rapport Mg/Ca des foraminifères planctoniques (Emiliani, 1955 ; Shackleton, 1967 ; Ravelo et Hillaire-Marcel, 2007). Il existe toutefois différents proxys organiques basés sur des biomarqueurs qui sont couramment utilisés pour reconstruire les SST ou les températures de l'air continental.

1.3.2.1. Indice $U_{37}^{K'}$ indicateur de température d'eau océanique de surface

Le paléo-thermomètre basé sur des biomarqueurs lipidiques le mieux calibré et le plus utilisé à ce jour est connu sous le nom d'indice d'insaturation des alcénones ; il est nommé $U_{37}^{K'}$ (Brassell et al., 1986 ; Prahl et Wakeham, 1987). Cet indice est basé sur l'abondance relative de certains isomères d'alcénones, qui sont des cétones à longue chaîne carbonée (de 35 à 41 atomes de carbone) possédant 1 à 5 insaturations (doubles liaisons ; Figure 1.10A). Les alcénones sont biosynthétisées par des microalgues marines haptophytes (eucaryotes unicellulaires) très répandues dans la zone

A



B

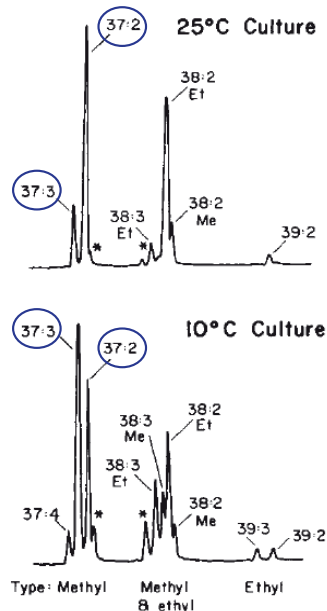


Figure 1.10 : **A)** Structures chimiques des alcénones les plus fréquemment observées. **B)** Chromatographie en phase gazeuse de la composition en alcénones de *E. huxleyi* après croissance à 10 et à 25°C (d'après [Prah et Wakeham, 1987](#)).

photique des océans actuels, et constituants l'un des principaux producteurs de carbonate de calcium en milieu pélagique ([Milliman, 1993](#) ; [Eglinton et Eglinton, 2008](#)). Dans les environnements marins, les alcénones sont principalement produites par deux espèces largement distribuées dans les océans, *Emiliana huxleyi* ([Volkman et al., 1980](#)) et *Gephyrocapsa oceanica* ([Conte et al., 1994](#) ; [Volkman et al., 1995](#)). Le rôle physiologique des alcénones chez les algues haptophytes est encore incertain, mais ces lipides sembleraient jouer un rôle important dans le stockage d'énergie ([Eltgroth et al., 2005](#)). Des cultures de *E. huxleyi* en conditions contrôlées en laboratoire ont permis de mettre en évidence une

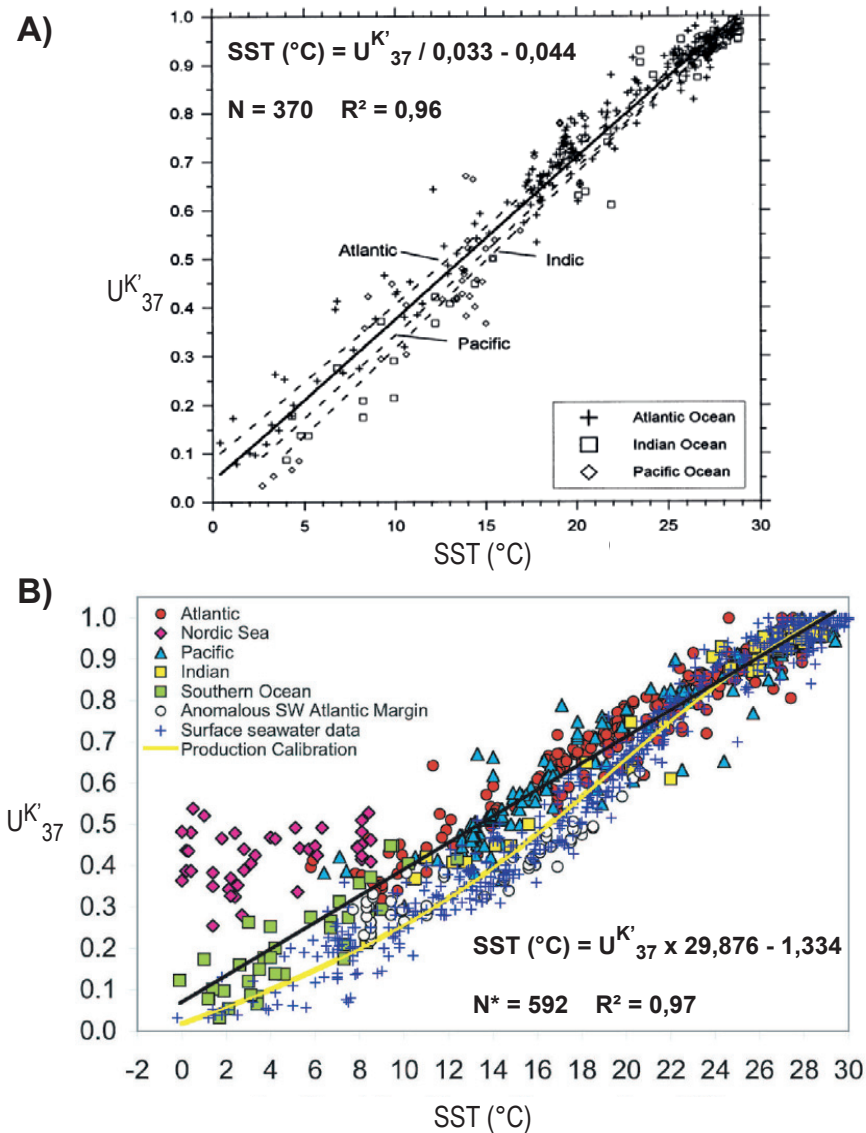


Figure 1.11 : Calibration globale de l'UK₃₇ avec les températures annuelles des eaux de surface d'après (A) Müller et al. (1998) et (B) Conte et al. (2006). *L'équation de calibration globale de Conte et al. (2006) exclut les valeurs d'UK₃₇ obtenues dans la Mer du Nord et la Marge Sud-Ouest Atlantique.

relation entre le degré d'insaturation des alcénones en C₃₇ et la température du milieu de vie (Figure 1.10 ; Marlowe, 1984 ; Prahl et Wakeham, 1987 ; Prahl et al., 1988). Une diminution de la température entraîne principalement une augmentation de la proportion relative des alcénones tri-insaturées Me C_{37:3} au dépend des homologues di-insaturés Me C_{37:2} (Figures 1.10A-B). Ce rapport d'alcénones, exprimé sous la forme de l'indice U^{K'}₃₇ (équation 1), varie de façon linéaire avec la température de croissance des organismes producteurs, et a donc été proposé comme proxy de température des eaux de surface marines (SST) par Prahl et Wakeham (1987) :

$$U_{37}^{K'} = [C_{37:2}] / ([C_{37:2}] + [C_{37:3}]) \quad (1)$$

Ce rapport peut avoir des valeurs comprises entre 0 et 1 pour un intervalle de température de 0 et à 26°C, correspondant aux SST moyennes annuelles observées dans différentes régions océaniques. Des analyses de sédiments de surface (Eglinton et Eglinton, 2008 ; et références associées) ont permis l'établissement de droites de calibration à l'échelle mondiale (dite calibration globale), applicables dans la plupart des environnements océaniques (Figures 1.11A-B; Müller et al., 1998 ; Conte et al., 2006). Ces équations de calibration (Figures 1.11A-B) permettent d'estimer les SST océaniques à partir des mesures de l' $U_{37}^{K'}$ faites dans un environnement. Les températures des eaux de surfaces des lacs semblent dans certains cas pouvoir être également estimées à l'aide de l'index $U_{37}^{K'}$ mais les calibrations marines ne s'avèrent pas toujours applicables en milieu continental (Castañeda et Schouten, 2011).

Malgré sa robustesse, l'indice $U_{37}^{K'}$ peut parfois être influencé par d'autres facteurs que la température, telle que la disponibilité en nutriments et en lumière (Epstein et al., 1998; Prahl et al., 2003). De plus, les relations entre les valeurs d' $U_{37}^{K'}$ et la température diffèrent entre les espèces productrices d'alcénones (Conte et al., 1995, 1998). Enfin, les valeurs du ratio $U_{37}^{K'}$ peuvent être influencées par les saisons et il existe une variabilité latitudinale de ce rapport induite par la circulation océanique (Brassell et al., 1986 ; Prahl et al., 2005).

1.3.2.2. Indice TEX_{86} indicateur de température d'eau océanique de subsurface

L'index TEX_{86} (Schouten et al., 2002) est un rapport moléculaire permettant d'estimer les températures des eaux marines ou lacustres qui est basé sur des lipides membranaires d'Archaea produit notamment par le phylum des *Thaumarchaeota* : les tétraéthers de glycérol isoprénoides (Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraethers ; GDGT ; cf. paragraphe 1.1.3.2 Chapitre 1). Les GDGT possèdent un total de 86 carbones, et les chaînes carbonées peuvent généralement contenir entre 0 et 3 cycles pentaniques (respectivement nommés GDGT-0 ou caldarchaeol, GDGT-1, GDGT-2 et GDGT-3 ; Figure 1.12A). Certains GDGT peuvent toutefois contenir jusqu'à 8 cycles dans leurs chaînes alkyles (Schouten et al., 2007). Le crenarchaeol (4 cycles pentaniques et un cycle hexanique ; GDGT-4) et son stéréoisomère (GDGT-4') font également partie de ces GDGT (Figure 1.12A). Schouten et al. (2002) ont démontré que la composition en GDGT des Archaea pélagiques varie avec la température moyenne annuelle des eaux océaniques de (sub)surface (Figure 1.12B). Plus un GDGT

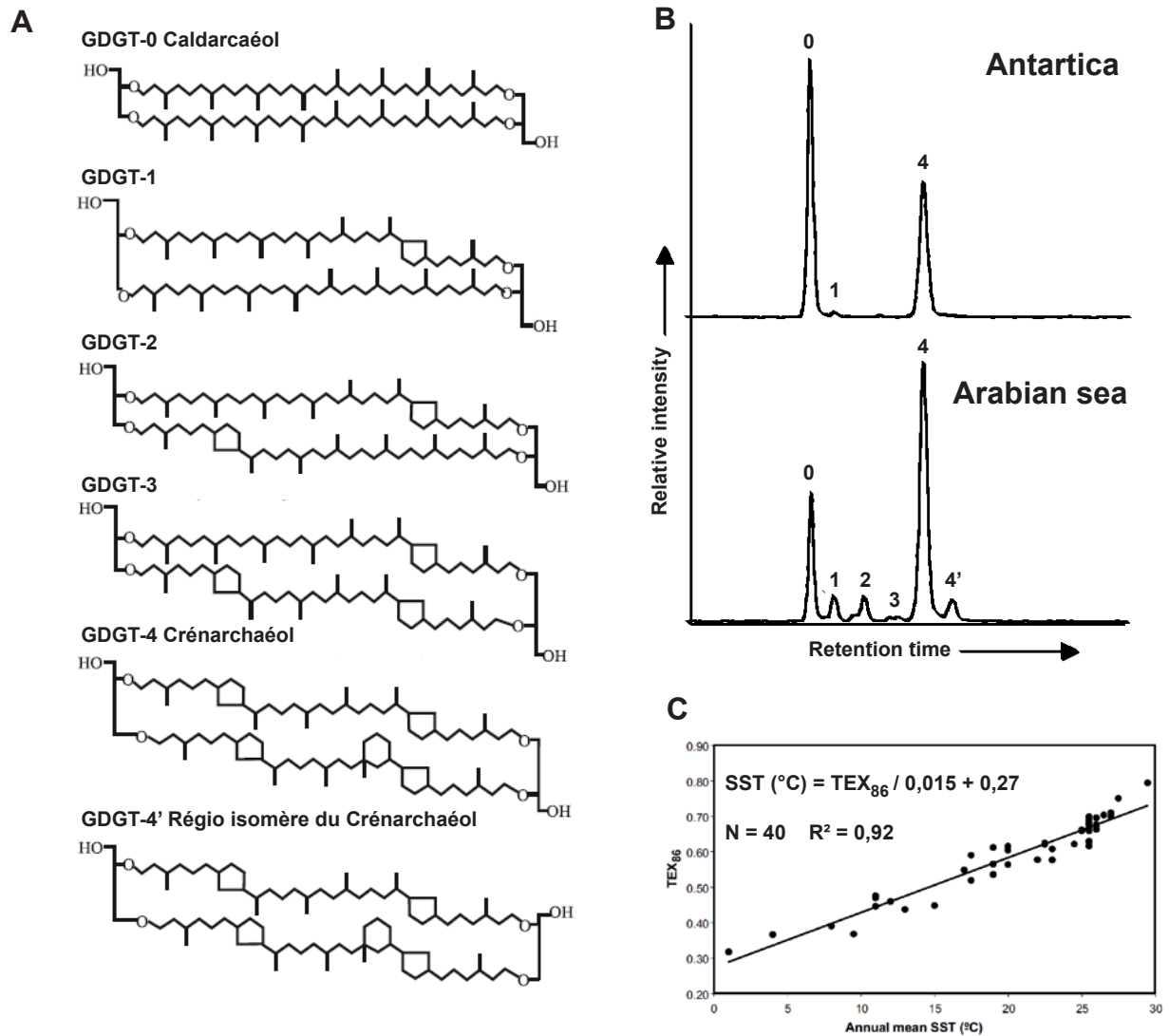


Figure 1.12 : A) Structures chimiques des Glycérol Dialkyl Glycérol Tétratéther isoprénoïdes (GDGT) produits par certaines archées modifié d'après [Castañeda et Schouten \(2011\)](#). B) Chromatogrammes montrant la distribution en GDGT dans un sédiment de surface prélevé en Antarctique et en mer Arabique (d'après [Schouten et al., 2002](#)). C) Calibration globale de l'indice TEX_{86} avec les températures annuelles des eaux de surface d'après [Schouten et al. \(2002\)](#).

possède de cycles (e.g. GDGT-4), plus sa proportion sera importante dans des échantillons prélevés à haute température ([Schouten et al., 2002](#)). L'index TEX_{86} (équation 2) compare donc les proportions relatives des GDGT-1 à 4' qui diffèrent principalement par le nombre de cycle qu'ils contiennent dans leurs chaînes isoprénoïdes ([Schouten et al., 2002](#)).

$$TEX_{86} = ([2] + [3] + [4']) / ([1] + [2] + [3] + [4']) \quad (2)$$

avec [1] = abondance du GDGT 1; [2] = abondance du GDGT 2 ; etc...

A partir des valeurs du TEX_{86} mesurées sur 40 sédiments de surface issus de 15 régions du monde

et des températures des eaux de surface associées, [Shouten et al. \(2002\)](#) ont établi une droite de calibration globale ([Figure 1.12C](#)). Par la suite, différentes calibrations ont été établies à partir d'un plus grand nombre d'échantillons de sédiments. La calibration la plus utilisée à l'heure actuelle est celle de [Kim et al. \(2008\)](#) établie à partir de l'analyse de 223 échantillons [$SST(^{\circ}C) = - 10.78 + 56.2 * TEX_{86}$; $R^2 = 0,94$]. La comparaison des températures estimées à partir de l' $U^{K'}_{37}$ avec celles estimées à partir de l'index TEX_{86} démontre une très bonne corrélation entre ces deux proxys organiques ([Schouten et al., 2013](#)). Cependant, [Kim et al. \(2010\)](#) ont étendu les calibrations du TEX_{86} en prenant en compte les zones polaires et ont établi un nouvel index (TEX^L_{86}) dont les valeurs sont mieux corrélées avec les faibles températures des eaux de surface aux pôles.

Le TEX_{86} a comme l' $U^{K'}_{37}$ différentes limites. Les organismes sources ne sont pas encore bien contraints, et d'autres Archaea que les *Thaumarchaeota* peuvent produire des GDGT cycliques ([Schouten et al., 2013](#) ; [Pearson et Ingalls, 2013](#)). L'écologie précise de ces organismes n'est pas clairement définie et leur profondeur de vie dans la colonne d'eau est incertaine ([Schouten et al., 2013](#)). Différentes communautés d'Archaea vivant à différentes profondeurs et ne répondant pas de la même manière à des variations de températures sont également supposées produire des GDGT cycliques ([Schouten et al., 2013](#)). Récemment, des cultures de *Thaumarchaeota* effectuées en conditions de température, de salinité et de pH contrôlées ont démontré que d'autres facteurs environnementaux que la température peuvent influencer les valeurs du TEX_{86} ([Elling et al., 2015](#)). Par ailleurs, près des côtes ou à l'embouchure des fleuves, des apports de GDGT d'origine continental peuvent arriver dans les sédiments et biaiser les estimations de température des eaux étudiées ([Schouten et al., 2013](#) ; [Pearson et Ingalls, 2013](#)).

1.3.2.3. Indices MBT/CBT indicateurs de température de l'air continental et du pH des sols

La distribution de lipides bactériens particuliers retrouvés dans les sols, les tétraéthers de glycérol ramifiés (branched Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraether ; brGDGT, [Figure 1.13](#)), peut être utilisée pour estimer les températures de l'air continental mais aussi le pH des sols ([Sinninghe Damsté et al., 2000](#) ; [Weijers et al., 2006, 2007](#)). L'origine de ces brGDGT est encore mal définie mais leur structure chimique non isoprénoïde et la stéréochimie *sn*-1,2 du glycérol indique que ces lipides transmembranaires ont une origine bactérienne ([Weijers et al., 2006](#)). A ce jour, seul le brGDGT-Ia

a été identifié chez deux espèces d'*Acidobacteria* (Figure 1.13 et Tableau 1.1 ; Sinnighe Damsté et al., 2011, 2014).

Une étude d'échantillons de sols prélevés à travers le monde (N = 176) a démontré que la distribution des différents brGDGT varie en fonction de la température moyenne annuelle de l'air (MAAT) et du pH du sol (Figure 1.14). Le nombre de cycle pentanique (variant de 0 à 2 ; Figure 1.13) est fonction du pH du sol, alors que le nombre de ramifications méthyles (pouvant varier de 4 à 6 ; Figure 1.13) dépend de la température et aussi, indirectement, du pH du sol (Figure 1.14 ; Weijers et al., 2007). Pour quantifier ces changements, les indices de cyclisation des tétraéthers ramifiés (CBT ; équation 3) et de méthylation des tétraéthers ramifiés (MBT ; équation 4) ont été développés.

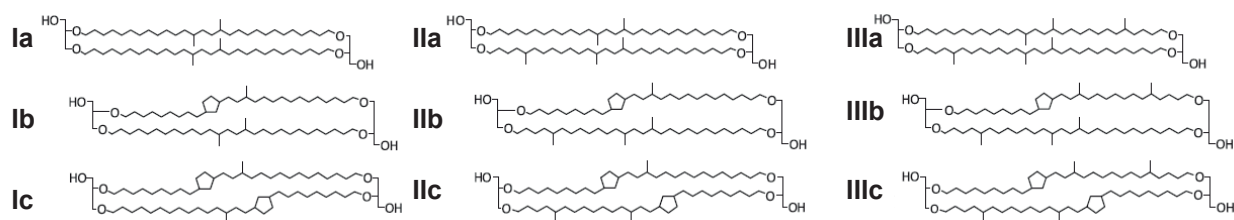


Figure 1.13 : Structures chimiques des Glycérol Dialkyl Glycérol Tétratéther branchés (brGDGT) produits par certaines bactéries modifié d'après Peterse et al., 2012.

$$\text{CBT} = -\text{Log} \left(\frac{[\text{Ib}] + [\text{IIb}]}{[\text{Ia}] + [\text{IIa}]} \right) \quad (3)$$

$$\text{MBT} = \frac{([\text{Ia}] + [\text{Ib}] + [\text{Ic}])}{([\text{Ia}] + [\text{Ib}] + [\text{Ic}] + [\text{IIa}] + [\text{IIb}] + [\text{IIc}] + [\text{IIIa}] + [\text{IIIb}] + [\text{IIIc}])} \quad (4)$$

Un nouvel indice MBT' excluant les brGDGT-3b et 3c (Figure 1.13) de l'équation initiale définie par Weijers et al. (2007 ; Figure 1.14) a été récemment proposé car ces deux structures ne sont pas systématiquement retrouvées (ou en trop faible abondance pour être quantifiées) d'un sol à un autre (Peterse et al., 2012). L'exclusion de ces deux structures entraîne une plus faible corrélation de ce proxy avec les températures annuelles de l'air que celle obtenu par Weijers et al. (2007), mais permet d'étendre son application à un plus grand nombre de sols [MAAT (°C) = 0.81–5.67 * CBT + 31.0 * MBT' ; N = 176 ; R² = 0,59 ; Peterse et al., 2012).

Bien que les proxys MBT/CBT soient prometteurs, plusieurs facteurs limitent leur utilisation. Puisque les GDGT ramifiés sont produits dans les sols, ils sont susceptibles de refléter la température du sol plutôt que celle de l'air. Comme pour les autres indices, les températures estimées à partir de l'index MBT/CBT peuvent être biaisées par des effets de saisonnalité (Weijers et al., 2010 ; Schouten

et al., 2013). La distribution des brGDGT peut aussi être influencée par l'aridité/humidité des sols (Schouten et al., 2013). De plus, comme indiqué précédemment, les sources biologiques des brGDGT ne sont pas clairement caractérisées et une production en milieu aquatique (notamment dans des lacs et dans la mer bordière) a été démontrée, accentuant les incertitudes sur l'origine de ces composés (Tierney et al., 2012 ; Schouten et al., 2013 ; Buckles et al., 2014 ; Loomis et al., 2014). L'absence à ce jour d'organismes isolés capables de synthétiser ces lipides n'a pas permis de tester l'influence de différents paramètres environnementaux sur la synthèse des brGDGT (Schouten et al., 2013).

Depuis les travaux de Weijers et al. (2006, 2007), de nouvelles calibrations ont été établies (Ding et al., 2015 ; Naaf et al., 2017), et le proxy MBT (MBT') / CBT est à ce jour également utilisé pour retracer les températures de lacs (D'Anjou et al., 2013), de tourbières (Ballantyne et al., 2010) et de

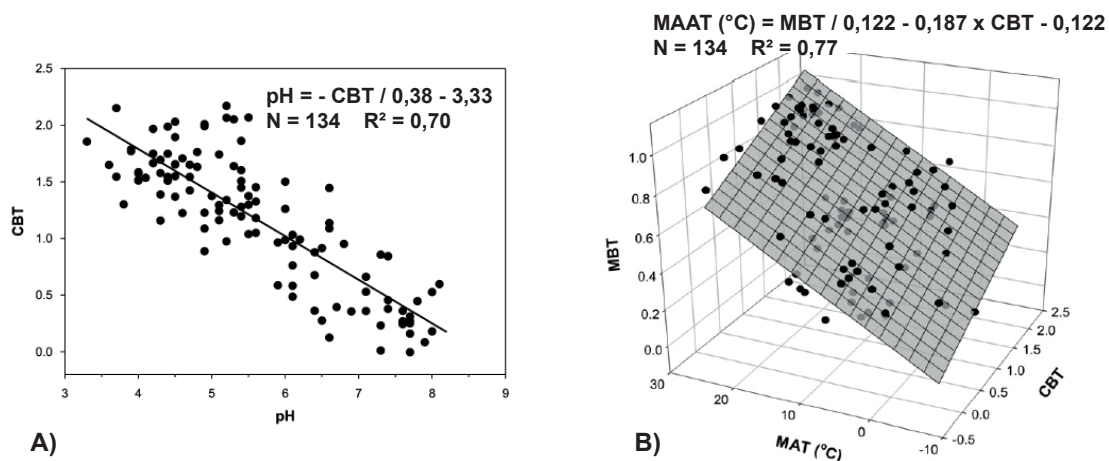


Figure 1.14 : A) Relation établie entre le ratio CBT et le pH des sols (d'après Weijers et al., 2007). B) Relation établie entre les ratios MBT et CBT et les températures annuelles de l'air (MAAT) (d'après Weijers et al., 2007).

mer bordière (Zell et al., 2014).

1.3.2.4. Indice LDI indicateur de température des eaux océaniques de surface

Un nouvel indicateur de température des eaux marines de surface, basé sur des diols à longues chaînes alkyles produits par certaines espèces de phytoplancton, a été récemment proposé (Rampen et al., 2012). Cet indice, nommé LDI, est défini comme le rapport d'abondance de lipides possédant 28 à 30 atomes de carbone et deux fonctions alcool dont une en position terminale (C-1) et l'autre en milieu de chaîne (Figure 1.15). Ainsi, le LDI est défini par la proportion relative du C_{30} -1,15-diols par rapport aux abondances des C_{28} et C_{30} -1,13-diols (Figure 1.15). L'analyse de 162 sédiments marins

de surface a démontré une corrélation significative entre les SST et les valeurs du LDI (Figure 1.16; Rampen et al., 2012).

Des cultures de microalgues de la famille des *Eustigmatophytes* ont permis l'identification d'une origine biologique de ces diols (Volkman et al., 1992 ; Rampen et al., 2014). L'origine de ces molécules dans le milieu marin reste toutefois imprécise et le rôle physiologique de ces lipides encore incertain (Rampen et al., 2012, 2014). D'autres organismes que les *Eustigmatophytes*, vivant en milieu continental, seraient également susceptibles de synthétiser les diols à longues chaînes. Par ailleurs, une variété de facteurs environnementaux autres que la température (e.g. salinité, disponibilité en nutriments) pourrait également avoir un impact sur la distribution des diols à longue chaîne. Récemment, une étude a montré que ces lipides pouvaient être dégradés en présence d'oxygène,

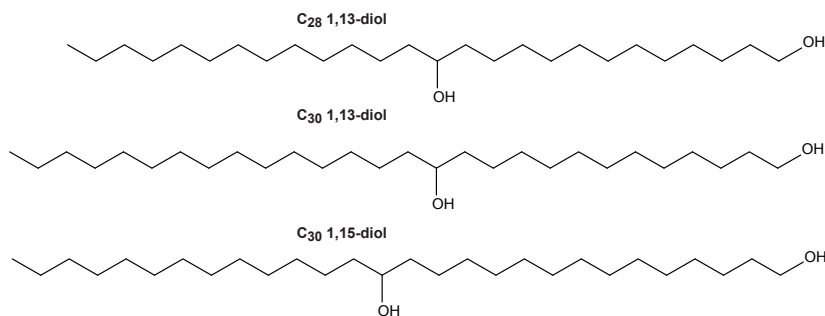


Figure 1.15 : Structures chimiques du C₂₈ 1,13-diol, C₃₀ 1,13-diol et C₃₀ 1,15-diol produits par certaines espèces phytoplanctoniques.

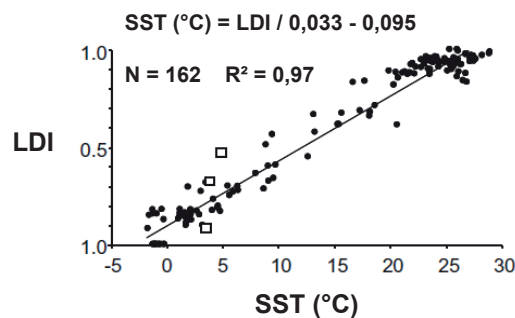


Figure 1.16 : Relation entre les valeurs du Long Chain Diol Index (LDI) mesurées dans des sédiments marins de surface et la température annuelle des eaux de surface (d'après Rampen et al., 2012).

biaisant les estimations de température faites avec le LDI (Rodrigo-Gámiz et al., 2016).

1.3.3. Proxys organiques de salinité

Malgré l'intérêt de reconstruire les variations de salinité des milieux aquatiques dans le passé, très peu de proxys organiques basés sur des biomarqueurs lipidiques existent pour estimer les paléo-salinités. Les trois principaux proposés à ce jour sont l'indice ACE (basé sur des lipides d'Archaea), le δD des alcénones et les proportions de l'alcénone $C_{37:4}$.

1.3.3.1. Indice ACE

Turich et Freeman (2011) ont mis en évidence une relation entre l'abondance relative de l'archaeol par rapport au caldarchaeol (rapport arch/caldarch) et la salinité. Selon ces auteurs, l'archaeol (Figure 1.6A) est surtout produit par des Archaea (hyper)halophiles, alors que le caldarchaeol (cf. Figure 1.6B) est davantage produit par des Archaea se développant en milieu marin classique. Ces auteurs ont donc proposé l'indice ACE (Archaeol and Caldarchaeol Ecometric ; équation 5) qui permet d'estimer les transitions écologiques entre des populations d'archées marines et des populations évoluant en milieu hypersalin.

$$ACE = [Archaeol] / ([Archaeol] + [Caldarcheol]) \quad (5)$$

A partir de l'analyse de particules en suspension et de sédiments de surface prélevés dans des eaux hypersalines, marines, estuariennes et côtières, Turich et Freeman (2011) ont observé une très bonne corrélation du rapport ACE avec la salinité (Figure 1.17). Ce rapport a ensuite été appliqué à deux séries sédimentaires datant du Miocène (6.96–5.93 Ma) et enregistrant des variations de salinité au cours de cette période. Les résultats ont montré que les paléosalinités estimées avec l'ACE étaient corrélées avec les salinités absolues au moment du dépôt des sédiments (Turich et Freeman, 2011). L'utilisation de ce proxy de salinité a également été possible en contexte lacustre (Wang et al., 2013). Cependant, l'application de l'ACE à certains environnements contemporains ne semblent pas nécessairement refléter la salinité du milieu (Günther et al., 2014 ; Huguet et al., 2015). Récemment, il a été démontré que l'apport aux sédiments de caldarchaeol du bassin versant d'un lac peut biaiser les mesures d'ACE (Li et al., 2016).

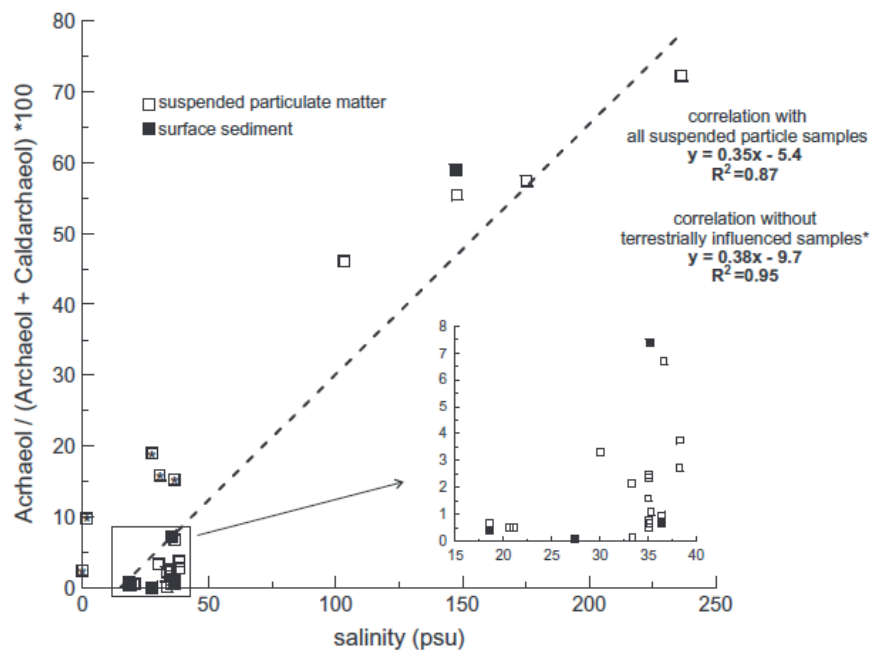


Figure 1.17 : Salinité et abondance relative de l'archaeol au caldarchaeol obtenus par Turich et Freeman (2001) à partir de particules en suspensions et de sédiments marins actuels.

1.3.3.2. δD des alcénones et proportion de l'alcénone $C_{37:4}$

Il a été postulé qu'il existe un fractionnement isotopique de l'hydrogène (δD) entre l'eau du milieu de vie des organismes et certains lipides (Sessions et al., 1999). Par conséquent, les valeurs de δD des biomarqueurs lipidiques ont le potentiel d'enregistrer des modifications de la composition isotopique de l'eau (source d'hydrogène). Ainsi, les valeurs de δD des alcénones synthétisées par *E. huxleyi* semblent enregistrer précisément la composition isotopique de l'eau du milieu dans lequel les cellules se sont développées (Figure 1.18 ; Englebrecht et Sachs, 2005). Les basses températures diminuent l'amplitude du fractionnement isotopique entre H et D alors que des fortes précipitations l'augmentent (Dansgaard, 1964 ; Sachs et al., 2007). De même, le δD des alcénones est connu pour augmenter quand la salinité de l'eau augmente (Schouten et al., 2005). Les mesures du δD des alcénones contenues dans des sédiments constitue donc un outil puissant pour reconstruire des variations hydrologiques passées et des variations de salinité en milieu lacustre ou marin (Sachs et al., 2007). Cependant, la biosynthèse des alcénones implique également un fractionnement isotopique H/D, dont l'amplitude peut être influencée par la phase de croissance de ces organismes (Schwab et Sachs, 2009 ; Wolhowe et al., 2009).

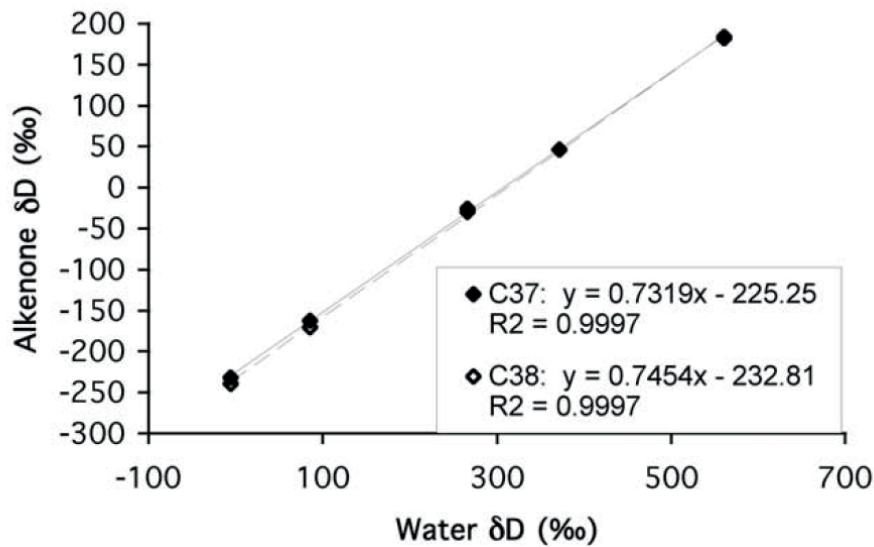


Figure 1.18 : Composition isotopique de l'hydrogène des alcénones en C_{37} et C_{38} provenant de cultures d'*Emiliana huxleyi* (d'après Englebrecht et Sachs, 2005).

L'alcénone en $C_{37:4}$ est principalement produite dans les régions froides ($SST < 10^{\circ}C$). Lorsque l'abondance relative (en %) du $C_{37:4}$ par rapport au $C_{37:4} + C_{37:3} + C_{37:2}$ devient supérieur à 5%, il a été démontré une corrélation de ce rapport avec la salinité dans la mer du nord et l'océan atlantique nord (Rosell-Melé et al., 2002 ; Sikes et al., 2002). Les faibles salinités entraînent une augmentation des proportions du $C_{37:4}$ (Harada et al., 2008). Cependant, l'utilisation du $\%C_{37:4}$ comme proxy de salinité reste limité à des environnements marins froids et à faibles salinités (Sachs et al., 2007). Les alcénones en $C_{37:4}$ sont également facilement dégradées dans les sédiments par rapport à leurs homologues di et tri-insaturés (Rosell-Melé et al., 1994).

1.3.4. Possibilités d'utilisation des éthers de glycérol bactériens (AGE) comme proxys environnementaux

Les éthers de glycérol non-isoprénoïdes (AGE) ont été identifiés dans un grand nombre de phylum bactériens, mais peu de souches pures sont à ce jour connues pour en synthétiser (cf. Tableau 1.1 et Figure 1.1). Cependant, ces lipides particuliers et spécifiques aux bactéries sont retrouvés dans un grand nombre d'environnements anciens et actuels, caractérisés par des conditions physico-chimiques très différentes (Grossi et al., 2015 ; Vinçon-Laugier et al., 2016). Ils ont été identifiés dans des sédiments marins contemporains ou anciens (Orphan et al., 2001 ; Baudrand et al., 2010 ; Guido

et al., 2013 ; Saito et al., 2013), dans les océans (Hernandez-Sanchez et al., 2014 ; Wang and Xu, 2016), des lacs (Yang et al., 2015 ; Wang and Xu, 2016), et des rivières (Wang and Xu, 2016). Des 1-*O*-MAGE ont également été observés dans des sols (Oppermann et al., 2010 ; Yang et al., 2015 ; Wang and Xu, 2016) ainsi que dans des environnements moins communs et parfois extrêmes tels que des volcans de boue (Pancost et al., 2001) et des sources hydrothermales chaudes (Zeng et al., 1992 ; Kaur et al., 2008, 2015) ou froides (Elvert et al., 2005 ; Bouloubassi et al., 2006 ; Bradley et al., 2009 ; Chevalier et al., 2011). Certains AGE ont également été retrouvés dans des carbonates âgés de 250 Ma, ce qui témoigne de leur bonne stabilité chimique au cours du temps et de leur fort potentiel de préservation durant la diagenèse (Saito et al., 2013).

En raison de leur spécificité biologique, de leur ubiquité environnementale et de leur stabilité diagénétique, les AGE peuvent être considérés comme de bons biomarqueurs lipidiques. De récentes études ont tenté de relier les variations de la distribution structurale des AGE observées dans le

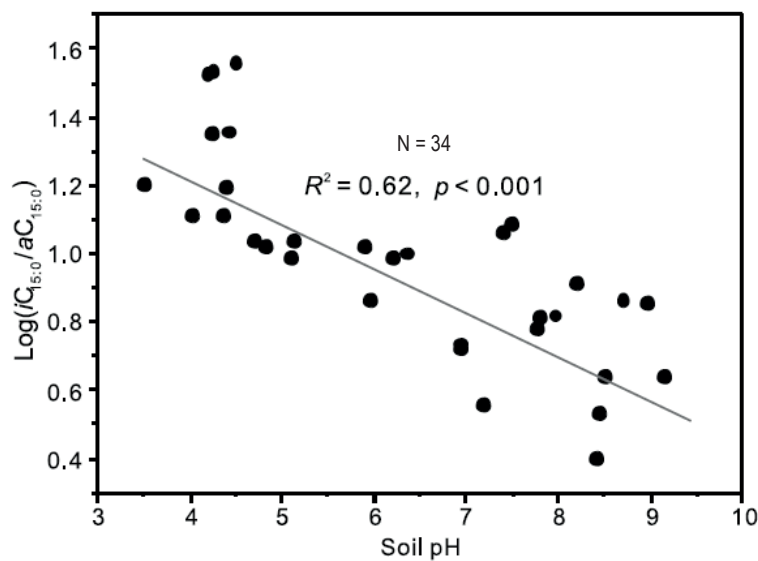


Figure 1.19 : Corrélation obtenue par Yang et al. (2015) entre le rapport des proportions des MAGE 1-*O*-*i*C₁₅ vs 1-*O*-*ai*C₁₅ et le pH des sols.

milieu naturel à des variables environnementales telles que la température et le pH, ou dépendantes à la nature de l'environnement de dépôt. Ainsi, Yang et al. (2005) ont observé que le 1-*O*-MAGE en C₁₅ ramifié en position *iso* (1-*O*-*i*C₁₅) domine dans divers sols, alors que le 1-*O*-MAGE linéaire en C₁₆ (1-*O*-C₁₆) y est minoritaire. En revanche, dans les sédiments lacustres, la proportion de ces mêmes homologues de 1-*O*-MAGE est inversée (Yang et al., 2015). Ces auteurs ont également mis en évidence un effet du pH sur la distribution des 1-*O*-MAGE ramifiés en position *iso* et *antéiso* (Figure

1.19 ; Yang et al., 2015). Wang et Xu (2016) ont par ailleurs observé une diminution progressive des proportions du 1-O-iC15 dans des échantillons provenant de sols, de rivières, de lacs, de la mer bordière jusqu'à l'océan ouvert, ce qui suggère que les MAGE peuvent être utilisés pour discerner les différents environnements de formation de ces composés. Toutefois, l'étude de sédiments siliceux de sources hydrothermales par Kaur et al. (2015) illustre des relations peu convaincantes entre la longueur de chaîne moyenne (ACL) des DAGE et la température ou le pH du milieu. Enfin, une augmentation de l'abondance relative des 1-O-MAGE insaturés a été observée entre des eaux de l'océan Austral (plus froides) et celles de l'Atlantique Sud (plus chaudes), suggérant une adaptation de la composition en MAGE des communautés bactériennes pélagiques à la température des eaux océaniques (Hernandez-Sanchez et al., 2014).

Ces études permettent donc d'envisager l'utilisation des AGE comme indicateurs de conditions environnementales, mais laissent aussi entrevoir de nombreuses incertitudes sur les processus biologiques et environnementaux qui contrôlent leur formation et leur distribution dans le milieu naturel. Aussi, il est avant tout nécessaire de comprendre le rôle que les AGE ont au sein des membranes bactériennes et, surtout, comment la composition en AGE (MAGE et/ou DAGE) de ces dernières peut être modulée en réponse à des variations des paramètres environnementaux. Pour cela, il apparaît primordial de cultiver en conditions contrôlées de laboratoire des souches pures de bactéries capables de produire des AGE, afin de caractériser les modifications structurales de ces lipides membranaires engendrées par des variations des conditions de croissance. Ceci devrait ensuite permettre de mieux interpréter les distributions en AGE observées *in-situ* et d'essayer de les relier à des variables environnementales.

C'est dans ce contexte que s'intègrent ces travaux de thèse dont les principaux objectifs sont de :

- Mieux appréhender les modes de formations des AGE bactériens.
- Caractériser l'influence des variations de certains paramètres physico-chimiques (Température, Salinité et pH) sur la composition en AGE des organismes les produisant ; et déterminer le rôle des AGE dans l'adaptation des membranes à des variations de conditions environnementales.
- Préciser l'utilité des AGE en tant que proxys environnementaux.

Chapitre 2 : Procédures expérimentales

Chapitre 2 : Procédures expérimentales

2.1. Cultures bactériennes et analyse du contenu lipidique des cellules (Chapitres 3, 4 et 5)

2.1.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Au cours de cette thèse, nous avons sélectionné et étudié 6 souches pures de bactéries sulfato-réductrices (BSR) Gram-négatives (5 souches mésophiles et 1 souche thermophile ; **Tableau 2.1**). L'ensemble des cultures a été réalisé par l'Equipe Environnement et Microbiologie (UMR CNRS 5254 IPREM) de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour.

Tableau 2.1 : Conditions de croissance des souches pures de bactéries sulfato-réductrices étudiées dans les différents chapitres de la thèse. Les optimums sont indiqués en gras.

Famille	Desulfobacteraceae					Thermodesulfobacteriaceae
Espèce	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>	<i>Desulfatiferula olefinivorans</i>	" <i>Desulfococcus oleovorans</i> "	<i>Desulfococcus multivorans</i>	<i>Thermodesulfobacterium commune</i>
Souche	PF2803	CV2803	LM2801	Hxd3	DSM 2059	DSM 2178
Référence	Cravo-Laureau et al. (2004b)	Cravo-Laureau et al. (2004a)	Cravo-Laureau et al. (2007)	Aeckersberg et al. (1991)	Widdel (1980)	Zeikus et al. (1983)
Synthèse d'AGE	MAGE + DAGE	MAGE + DAGE	MAGE	Non	Non	MAGE + DAGE
Températures testées (°C)	24 - 30 - 35 - 40	20 - 25 - 30 - 35 - 40	30	30	35	54 - 60 - 70 - 80 - 84
Salinités testées [NaCl] (psu)	3 - 10 - 25 - 45 - 60	3 - 24 - 45 - 60	6 - 10	22	8	Non renseigné, 0 étant l'optimum considéré
pH testés	6,4 - 6,8 - 7,8	6,4 - 7,5 - 7,9	7,5	7,1 - 7,4	7,1 - 7,4	7
Chapitres concernés	3, 4 et 5	3, 4 et 5	3	3	3	4

Les trois souches mésophiles, *Desulfatiferula olefinivorans* LM2801^T, « *Desulfococcus oleovorans* » Hxd3^T et *Desulfococcus multivorans* DSM 2059^T, appartenant à la classe des *Deltaproteobacteria* et à la famille des *Desulfobacteraceae*, ont été étudiées uniquement pour tester leur capacité à produire des AGE à partir de différents substrats de croissance (Chapitre 3). Les conditions de croissance (**Tableau 2.1**) de ces souches sont décrites dans le chapitre 3, présenté sous sa forme d'article publié (Vinçon-Laugier et al., 2016), et ne sont donc pas détaillées dans ce chapitre.

Les deux autres souches de BSR mésophiles *Desulfatibacillum alkenivorans* PF2803^T et *D. aliphaticivorans* CV2803^T ont été utilisées comme modèles biologiques pour les études concernant l'influence de la source de carbone (Chapitre 3), de la température (Chapitre 4) et du pH et de la salinité (Chapitre 5) sur la synthèse des éthers de glycérol (Tableau 2.1). Ces deux espèces appartenant à la classe des *Deltaproteobacteria* et à la famille des *Desulfobacteraceae* ont été isolées à partir de sédiments marins contaminés aux hydrocarbures provenant du Golf de Fos (Mer Méditerranée), et ont été décrites par Cravo-Laureau et al. (2004 a, b).

La souche de BSR thermophile *Thermodesulfobacterium commune* DSM 2178^T qui appartient à la classe des *Thermodesulfobacteria* et à la famille des *Thermodesulfobacteriaceae*, a été précédemment décrite pour synthétiser à la fois des MAGE et des DAGE (Langworthy et al., 1983 ; Hamilton-Brehm et al., 2013). Elle a donc été choisie comme modèle de bactérie thermophile pour l'étude de l'influence de la température (Tableau 2.1 ; Chapitre 4). La souche DSM 2178 a été isolée à partir d'une station thermale du parc national de Yellowstone et a été décrite par Zeikus et al. (1983).

Les souches PF2803 et CV2803 ont été cultivées en conditions de sulfato-réduction dans un milieu de culture minimum synthétique (Cravo-Laureau et al., 2004 a, b) avec l'octanoate de sodium (> 99%, Sigma Aldrich) comme seule source de carbone et d'énergie (chapitres 4 et 5). La souche DSM 2178 a été cultivée dans le milieu 206 (DSMZ) avec du lactate (> 99%, Sigma Aldrich) comme seule source de carbone et d'énergie (Langworthy et al., 1983). Dans les chapitres 4 et 5, chaque paramètre environnemental considéré (température, pH et salinité) a été modifié de manière indépendante dans la limite des intervalles de croissance de chaque souche, en maintenant les autres paramètres physico-chimiques à leurs valeurs optimales (Tableau 2.1). Des triplicatas de culture ont été effectués pour chaque condition testée. Chaque culture a subi 3 repiquages successifs dans un milieu de culture neuf, afin de s'affranchir du reliquat de cellules de l'inoculum ayant éventuellement évolué sous d'autres conditions de croissance. Après 8 jours d'incubation pour les souches PF2803 et CV2803 et 2 jours pour la souche DSM 2178 (fin de la phase exponentielle de croissance), des mesures de densité optique ($DO_{450\text{ nm}}$) et de la concentration en protéines [déterminée en utilisant le kit de dosage QuantiPro BCA (Sigma) avec de la sérumalbumine bovine comme étalon] ont été effectuées sur un volume de 1 mL de culture pour chaque triplicata. Les cellules ont ensuite été concentrées par filtration sur microfibrilles de verre (filtres GF/F, Whatman) et les filtres ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'extraction et l'analyse des lipides.

2.1.2. Hydrolyse acide des cellules bactériennes

Les cellules récupérées sur filtres ont été hydrolysées avec de l'acide chlorhydrique 0,5 N dans du méthanol (MeOH) mis à reflux pendant 2 h, afin de libérer les éthers de glycérol de leurs têtes polaires et permettre leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG). Lors de ce traitement, les chaînes acyles des acylglycérols sont également hydrolysées et transestérifiées (formation d'esters

méthyliques d'acides gras). Le pH des hydrolysats a ensuite été ajusté à pH 4 à l'aide d'une solution de potasse méthanolique (2N KOH, MeOH/H₂O, 1:1 v/v). Après addition d'eau pour obtenir un rapport final H₂O-MeOH de 1:1, les lipides hydrolysés ont été extraits par du dichlorométhane (DCM, 4x). Les extraits rassemblés ont été séchés à l'aide de sulfate de sodium anhydre (NaSO₄) et concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif, avant d'être transférés dans un pilulier taré et évaporés à sec sous courant d'azote.

Une quantité connue de *n*-tricosanol (*n*-C₂₃-1-ol), utilisé comme standard interne, a été ajoutée à chaque extrait hydrolysé. Les MAGE et DAGE ont été silylés par réaction avec le N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) dans la pyridine (1:1 v/v, 50°C, 45 minutes) avant analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Les acides gras (AG), transestérifiés lors de l'hydrolyse acide, ont été analysés sous forme d'esters méthyliques d'acides gras (FAME).

2.2. Echantillons naturels et analyse des lipides (Chapitre 6)

Le contexte géologique des séries sédimentaires anciennes et la description des écosystèmes actuels étudiés sont décrits dans le chapitre 6. Cette section ne concerne que l'échantillonnage et les méthodes d'analyse des échantillons sélectionnés.

2.2.1. Sédiments de la section de Punta Piccola (Pliocène supérieur)

L'échantillonnage des sédiments de cette série stratigraphique a été réalisé à une profondeur de 10 à 30 cm de la surface afin d'éviter la couche oxydée et lessivée de surface (Plancq et al., 2015). Le contenu en alcénones, en diols à longues chaînes et en tétraéthers de glycérol isoprénoïdes (GDGT) de ces échantillons a précédemment été déterminé par Plancq et al. (2015). Nous avons sélectionné 32 échantillons le long de la coupe stratigraphique affleurante (de 6,02 à 48,36 m de profondeur), préalablement extraits, séparés en fractions de polarité croissante et analysés par Plancq et al. (2015). Les DAGE ont été quantifiés directement à partir des chromatogrammes des fractions F3 obtenues par Plancq et al. en 2015 [éluées au dichlorométhane (DCM)/acétone (9:1 v/v) sur colonne de silice-NH₂].

Afin d'affiner l'étude de cette série sédimentaire, 7 échantillons supplémentaires (à 22,46 ; 22,66 ; 22,75 ; 26,82 ; 28,08 ; 30,54 et 31,72 m) ont été sélectionnés, extraits, séparés et analysés selon les protocoles décrits ci-après. Parmi ces échantillons, 4 (à 26,82 ; 28,08 ; 30,54 et 31,72 m) avaient été précédemment étudiés par [Plancq et al. \(2015\)](#). Nous avons choisi d'analyser de nouveau ces échantillons afin d'évaluer la reproductibilité des quantifications des DAGE d'une étude à une autre. Approximativement 30 g de sédiment ont été broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon puis transférés dans un tube à centrifugation de 100 mL. La matière organique soluble a été extraite à l'aide d'ultrasons (sonde) avec successivement : du MeOH (40 mL; 5 minutes; 1 x), un mélange DCM/MeOH (3:1 v/v, 40 mL; 5 minutes; 2 x) et du DCM (40 mL; 5 minutes; 3 x). Après chaque passage aux ultrasons, le mélange « sédiment + extrait organique » a été centrifugé (5 min ; 3000 G) puis le surnageant (extrait organique) a été prélevé et transféré dans un même ballon. Les 6 extraits organiques regroupés ont constitué l'extrait lipidique total (ELT); celui-ci a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif puis transféré dans un pilulier taré. Le solvant résiduel a ensuite été évaporé sous un léger courant d'azote.

Les éthers de glycérol bactériens (MAGE et DAGE) présents dans les extraits lipidiques totaux ont été purifiés par chromatographie sur une colonne de gel de silice (4% H₂O, 7 g). Une élution en cinq fractions a été effectuée en utilisant des solvants de polarité croissante: F1 (contenant les hydrocarbures), 70 ml d'hexane (Hex); F2 (contenant les cétones), 70 ml d'Hex / acétate d'éthyle (AE) 19:1 v/v; F3 (contenant les alcools), 70 ml d'Hex / AE 17:3 v/v ; F4 (contenant les diols), 50 ml d'Hex / AE 3:1 v/v + 50 ml d'Hex / AE 1:1 v/v + 40 ml d'AE; F5 (phospholipides), 100 ml de MeOH. Les DAGE et MAGE libres (i.e., ne possédant plus leur tête polaire) ont été récupérés respectivement dans les fractions F3 et F4. Le solvant a alors été évaporé sous un léger sous un léger courant d'azote, puis les fractions séchées sont silylées et analysées par chromatographie en phase gazeuse. Il est intéressant de noter que, bien que les DAGE libres soient quantitativement récupérés en utilisant un mélange Hex / AE 17:3 v/v, l'utilisation de différents mélanges de solvants de polarité croissante est nécessaire pour la récupération complète des MAGE libres. Ce comportement chromatographique particulier des MAGE a été observé par [Oba et al. \(2006\)](#) pour des échantillons naturels contenant des éthers de glycérol isoprénoïdes.

2.2.2. Sédiments du site DSDP 511 (Eocène supérieur – Oligocène inférieur)

Un total de 40 échantillons sédimentaires ont été précédemment extraits et analysés par [Plancq et al. \(2014\)](#). Ces échantillons correspondent à une profondeur de 10 à 180 m sous le plancher océanique et couvrent la période de l'Eocène supérieur à l'Oligocène inférieur (37,5 à 31,4 Ma ; [Ludwig et al., 1983](#); [Wise, 1983](#)). Le contenu en DAGE des échantillons a été déterminé directement à partir des chromatogrammes des fractions F3 obtenues par [Plancq et al. en 2014](#) [éluées au dichlorométhane (DCM)/acétone (9:1 v/v) sur colonne de silice-NH₂]. Aucun échantillon a été de nouveau extrait et analysé pour ce site.

2.2.3. Colonne d'eau du lac Dziani Dzaha (actuel)

Des prélèvements de matériel en suspension dans l'eau ont été effectués dans la zone où le lac atteint une profondeur maximale (fosse de 18 m de profondeur). Ces prélèvements de 100 mL ont été effectués à différentes profondeurs en Octobre 2014 (à 0,5 ; 7 ; 10 ; 14 e 16 m) et Avril 2015 (à 2 ; 6 ; 10 ; 14 et 17,4 m). Les échantillons ont été filtrés puis ont été extraits ([Sala et al., in prep](#)) à l'aide d'une sonde à ultrasons avec successivement : un mélange MeOH/DCM (2:1 v/v ; 20 mL ; 5 minutes ; 2 x), un mélange MeOH/DCM (1:1 v/v, 20 mL ; 5 minutes ; 2 x) et du DCM (20 mL ; 5 minutes ; 1 x). Les ELT ont été séparés purifiés par chromatographie sur une colonne de gel de silice (4% H₂O, 7 g) en quatre fractions de polarité croissante, en utilisant le protocole suivant: F1 (contenant les hydrocarbures), 60 ml d'Hex; F2 (contenant les cétones), 50 ml d'Hex / AE 19:1 v/v; F3 (contenant les alcools), 50 ml d'Hex / AE 4:1 v/v ; F4 (contenant les diols et les phospholipides), 40 mL d'AE + 40 ml de MeOH. Les DAGE présents dans les fractions F3 ont été directement quantifiés à partir des chromatogrammes obtenus par [Sala et al. \(in prep\)](#). Aucun échantillon n'a été extrait selon nos méthodes pour ce lac.

2.2.4. Sédiments des mares salées de Guadeloupe (actuel)

Un échantillon de sédiment de surface (de 0 à 2 cm de profondeur) a été prélevé par carottage en décembre 2009 dans chacune des mares salées de Guadeloupe ([Huguet et al, 2015](#)). Les sédiments lyophilisés ont été extraits puis séparés sur colonne de silice (4% H₂O, 7 g) de la même manière que les 7 sédiments issus de la série ancienne de Punta Piccola (cf. paragraphe 2.2.1). Seuls les volumes et les proportions de solvants ont été adaptés pour les extractions afin d'extraire au mieux les lipides

les plus polaires (phospholipides). Les lipides ont été extraits à l'aide d'une sonde à ultrasons avec successivement : du méthanol (MeOH ; 20 mL ; 5 minutes ; 2 x), un mélange DCM/MeOH (1:1 v/v, 20 mL; 5 minutes; 2 x) et du DCM (20 mL; 5 minutes; 2 x).

Les AGE possédant encore leur tête polaire (AGE intacts, caractéristiques des populations microbiennes vivantes) ont été élués dans la fraction F5. Sous cette forme chimique, les AGE ne peuvent pas être analysés avec nos techniques de chromatographie en phase gazeuse. Une hydrolyse basique a été envisagée afin de libérer les AGE de leur groupement polaire. Les fractions lipidiques F5 ont été placées dans un ballon de 50 mL, et le solvant résiduel a été évaporé à l'évaporateur rotatif. Une solution de 20 mL de potasse méthanolique (1N KOH, MeOH/H₂O, 1:1 v/v) a été ajoutée, et le mélange a été maintenu à reflux durant 1h30. Après refroidissement, les lipides neutres ont été extraits du milieu réactionnel par un mélange Hex/DCM (4:1 v/v ; 4 x 10 mL). La phase méthanolique restante a été ensuite acidifiée (HCL 2N, 10 mL, pH < 2) et les lipides acides ont été extraits avec du DCM (4 x 5 mL). Les extraits 'neutres' contenant les AGE hydrolysés et les extraits 'acides' ont ensuite été séchés avec du Na₂SO₄, puis ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif et transférés dans des piluliers tarés. Après évaporation des solvants sous courant d'azote, les extraits ont été silylés et analysés par CG et CG-SM.

2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG-DIF) et par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM)

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse (CG) ont été réalisées avec un chromatographe Agilent 6890N équipé d'un injecteur froid (Cool On Column, COC) et d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF). La séparation des composés s'est faite sur une colonne capillaire de silice (dimensions 30 m x 0,25 mm) possédant une phase stationnaire apolaire de type HP5MS (0,25 µm d'épaisseur de film). Le COC est programmé avec une rampe de température (maintien pendant 0,5 min à la température d'injection, 60°C, puis montée à 200 °C/min jusqu'à 300°C, température maintenue pendant 1 min). Les échantillons sont injectés à 60°C et la température du four est programmée comme suit : 20 °C/min jusqu'à 130°C, puis 5 °C/min jusqu'à 250°C et enfin à 3 °C/min jusqu'à 300°C, cette température étant maintenue (isotherme) pendant 30 min. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1 mL/min.

Les analyses par CG-SM ont été réalisées avec un chromatographe Agilent 6890N (équipé d'un injecteur COC) connecté à un spectromètre de masse Agilent 5975C. La séparation chromatographique des composés se fait sur le même type de colonne capillaire (HP5MS) que les analyses CG-FID. Les programmations de la température de l'injecteur et du four ainsi que le débit du gaz vecteur (hélium) sont les mêmes que ceux décrits ci-dessus pour la CG. Les températures de la ligne d'interface, de la source et du quadripôle sont respectivement de 280°C, 200°C et 150°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique sont enregistrés à 70 eV avec un intervalle de masses (rapport m/z) allant de 50 à 800. Des analyses SIM (Selected Ion Monitoring) en sélectionnant des ions spécifiques des DAGE ($m/z = 130 + 133$) ont été réalisées afin d'affiner les quantifications de ces lipides dans les échantillons naturels (cf. Chapitre 6).

2.4. Estimation des températures des eaux pour les sites anciens (Punta Piccola et Site 511 ; Chapitre 6)

Les paléo-températures des eaux de surface (SST) des séries sédimentaires anciennes ont été estimées par [Plancq et al. \(2014, 2015\)](#) à partir des valeurs de l'indice $U^{K'}_{37}$ (cf. équation 1 paragraphe 1.3.2.1 Chapitre 1) et des équations de calibration globale de [Conte et al. \(2006\)](#) pour le site DSDP 511 ($SST (^{\circ}C) = 29,876 * U^{K'}_{37} - 1,334$; $N = 592$; $R^2 = 0,97$) ou de [Müller et al. \(1998\)](#) pour la série de Punta Piccola [$SST (^{\circ}C) = (U^{K'}_{37} - 0,044) / 0,033$; $N = 370$; $R^2 = 0,96$]. La déviation standard pour les estimations de SST mesurées avec l' $U^{K'}_{37}$ est de $\pm 1,5^{\circ}C$ (erreur analytique : $0,3^{\circ}C$, erreur de calibration: $1,2^{\circ}C$; [Müller et al., 1998](#) ; [Conte et al., 2006](#)).

Les tétraéthers de glycérol isoprénoïdes (GDGT) contenus dans les extraits organiques des échantillons de la coupe de Punta Piccola ont été analysés par [Plancq et al. \(2015\)](#). Les GDGT ont été analysés en utilisant un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) avec le système ADionex P680 couplé à un spectromètre de masse quadripolaire TSQ Quantum Discovery Max Thermo Finnigan ([Plancq et al., 2015](#)). La quantification des GDGT et du crénarchéol régioisomère a permis de calculer le rapport TEX_{86} selon l'équation établi par [Schouten et al. en 2002](#) (cf. équation 2 paragraphe 1.3.2.2 Chapitre 1).

Les paléo-températures des eaux de sub-surface ont été estimées par [Plancq et al. \(2015\)](#) à partir des

valeurs de l'index TEX_{86} , en utilisant l'équation de calibration globale de [Kim et al. \(2010\)](#) :

$$\text{SST } (^\circ\text{C}) = 68,4 * \text{TEX}_{86} + 38,6$$

Cette calibration est basée sur des données sédimentaires (N = 255) couvrant différents sites océaniques, à l'exclusion des régions sub-polaires.

La déviation standard pour les estimations de SST à partir du TEX_{86} est de $\pm 2,5^\circ\text{C}$ (erreur analytique: $0,5^\circ\text{C}$, erreur de calibration: 2°C ; [Kim et al., 2010](#)).

2.5. Détermination des indices structuraux des AGE (Chapitres 4 et 5).

Pour chaque culture effectuée dans les chapitres 4 et 5, nous avons déterminé la longueur de chaîne moyenne (ACL) des AG et de chaque classe d'AGE (MAGE et DAGE) en utilisant l'équation (6). Les valeurs d'ACL ont été calculées sans prendre en compte le groupe glycérol, ni les groupes méthyles supplémentaires.

$$\text{ACL (i)} = \frac{\sum_n (i \text{ avec } C_n \times C_n)}{\sum_n i \text{ avec } C_n} \quad (6)$$

Avec i = abondance relative des AG, MAGE ou DAGE totaux avec C_n , et C_n = nombre d'atomes de carbone dans la (les) chaîne(s) alkyle(s). Pour les DAGE, C_n a été obtenu en divisant la somme des deux longueurs de chaîne alkyle par 2.

Différents rapports basés sur les AG et les AGE ramifiés ont été calculés et exprimés en logarithme. Les rapports basés sur les DAGE ramifiés excluent les composés dont la structure précise n'est pas connue (c'est-à-dire les DAGE avec deux chaînes alkyles ramifiées).

Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de confiance à 95% (symétrique) associées à chaque mesure de proportion ou de rapport ont été estimées sur la base des écarts-types ($\pm 1,96$) obtenus à partir des mesures de trois expériences indépendantes ayant la même condition de culture. Afin d'estimer la significativité de nos mesures, nous avons effectué des tests de Student (p-value). Des comparaisons statistiques de valeur de pente ont été réalisées via une analyse ANCOVA de la covariance à l'aide du logiciel PAST v. 3.10 ([Hammer et al., 2001](#)).

**Chapitre 3 : The alkyl glycerol ether lipid
composition of heterotrophic sulfate reducing
bacteria strongly depends on growth substrate**

Dans ce chapitre présenté sous sa forme publiée (Vinçon-Laugier et al., 2016*), cinq souches de BSR mésophiles ont été sélectionnées (*Desulfatibacillum aliphaticivorans*, *D. alkenivorans*, « *Desulfatiferula olefinivorans* », *Desulfococcus multivorans* et *Desulfococcus oleovorans*). Ces souches ont été cultivées dans des conditions optimales de croissance en présence de différents composés individuels (de différentes natures et longueurs de chaîne carbonée) comme seule source de carbone et d'énergie. Cette étude avait pour but d'identifier de nouvelles espèces bactériennes capables de former des AGE et de caractériser la diversité des MAGE et DAGE synthétisés, en lien avec la nature du substrat carboné utilisé.

*Vinçon-Laugier, A., Grossi, V., Pacton, M., Escarguel, G., Cravo-Laureau, C., 2016. The alkylglycerol ether lipid composition of heterotrophic sulfate reducing bacteria strongly depends on growth substrate. *Organic Geochemistry* 98, 141–154.



The alkyl glycerol ether lipid composition of heterotrophic sulfate reducing bacteria strongly depends on growth substrate



Arnauld Vinçon-Laugier^{a,*}, Vincent Grossi^{a,*}, Muriel Pacton^a, Gilles Escarguel^b, Cristiana Cravo-Laureau^c

^a Laboratoire de Géologie de Lyon, UMR 5276 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS Lyon, 69622 Villeurbanne, France

^b Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, UMR 5023 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France

^c Equipe Environnement et Microbiologie, MELODY Group, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR 5254 CNRS, BP1155, 64013 Pau, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2016

Received in revised form 13 May 2016

Accepted 26 May 2016

Available online 31 May 2016

Keywords:

Alkyl glycerol ether lipids

Sulfate reducing bacteria

Growth substrate

Membrane ether lipid composition

Desulfatibacillum

ABSTRACT

Bacterial non-isoprenoid alkyl glycerol ether lipids (AGEs) are widespread in the environment but little is known about their biological precursors and mode of formation as a function of varying growth conditions. Here, we searched for the presence of AGEs in five pure strains of mesophilic (growth temperature between 20 and 40 °C) and heterotrophic sulfate reducing bacteria from the family Desulfobacteraceae grown on a wide range of hydrocarbons and organic acids as sole carbon and energy source. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis of hydrolyzed cells revealed the presence of mono-alkyl glycerols (MAGEs) in one *Desulfatiferula* species and of MAGEs and dialkyl glycerols (DAGEs) in two *Desulfatibacillum* species. Species from the genus *Desulfococcus* did not produce AGEs. The ether lipid composition appeared strongly dependent on the nature and the chain length of the carbon substrate, with few to > 50 homologues of AGEs formed from a single substrate. Growth on long chain *n*-alkyl compounds (C₁₄ to C₁₈ alk-1-enes and fatty acids) generated a much lower diversity of MAGEs and DAGEs than short chain substrates (nonanoate, octanoate and pyruvate) or isoprenoid alkenes (phytadienes). Such variation in alkyl glycerol production could be linked to the distinct pathways involved in the metabolism of the different substrates. Despite this substrate-dependent AGE composition, the average chain length and level of branching of each class of ether lipid remained remarkably stable whatever the growth substrate and the number of MAGE and DAGE homologues formed, indicating a compositional control of ether lipids by heterotrophic bacteria to maintain optimal membrane properties.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the last few decades, the analysis of lipid biomarkers from various geological formations and contemporary environments has revealed the existence of a wide variety of non-isoprenoid monoalkyl and dialkyl glycerol ether lipids (MAGEs and DAGEs, respectively; Fig. 1). These lipids have been observed in marine sediments and waters (Orphan et al., 2001; Hernandez-Sanchez et al., 2014), rivers and soils (Oppermann et al., 2010; Wang and Yunping Xu, 2015), geothermal sinters (Zeng et al., 1992; Kaur et al., 2008), mud volcanoes (Pancost et al., 2001; Bouloubassi et al., 2006), microbial carbonates (Baudrand et al., 2010; Guido et al., 2013; Saito et al., 2013), phosphorites (Berndmeyer et al., 2012) and cold seeps (Orphan et al., 2001; Elvert et al., 2005; Bradley et al., 2009a; Chevalier et al.,

2011). This wide environmental distribution of non-isoprenoid alkyl glycerol ether lipids (AGEs) suggests the existence of AGE-producing microorganisms with contrasting ecophysiological preferences, such as psychrophiles (optimal growth temperature from –20 to 10 °C), mesophiles (growth temperature from 20 to 40 °C) and thermophiles (growth temperature > 40 °C). AGEs exhibit intriguing structural features, with non-isoprenoid alkyl chains linked to the *sn*-1 and/or *sn*-2 carbons of a glycerol molecule via ether linkages, instead of the ester linkages classically observed in bacterial and eukaryotic lipids (Goldfine and Langworthy, 1988; Woese et al., 1990; Lombard et al., 2012). The specific structural characteristics of alkyl glycerols give them the possibility of being interesting biomarkers. The presence of ether bonds more resistant to hydrolysis than ester bonds also allows these lipids to be preserved over geological time, the oldest non-isoprenoid glycerol ether lipids identified in sediments dating back to 250 Ma (Saito et al., 2013).

Despite their widespread occurrence, the biological producers of AGEs are incompletely constrained. The biosynthesis of ether

* Corresponding authors. Tel.: +33 472445813; fax: +33 472431526.

E-mail addresses: arnauld.vincon-laugier@univ-lyon1.fr (A. Vinçon-Laugier), vincent.grossi@univ-lyon1.fr (V. Grossi).

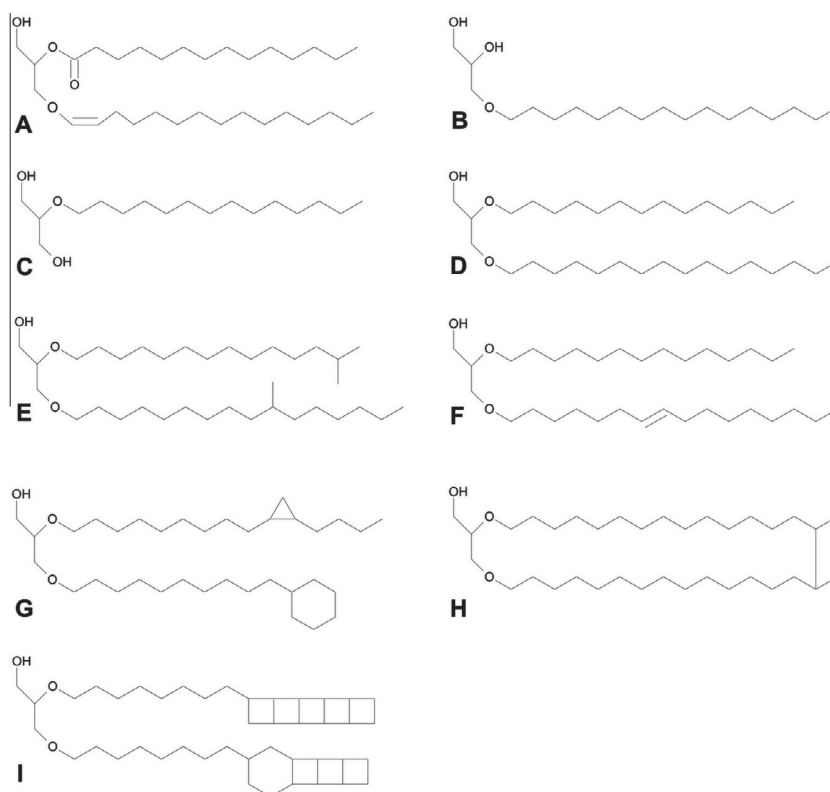


Fig. 1. Structures of ether lipids. Plasmalogen (1-alk-1'-enyl-2-acyl-glycerol), (A); monoalkyl-*sn*-1-glycerol (1-*O*-MAGE), (B); monoalkyl-*sn*-2-glycerol (2-*O*-MAGE), (C); DAGEs with saturated linear (D), branched (E), monounsaturated (F, configuration of double bond unknown) or cyclized (G) alkyl chain(s); macrocylic diether (H); DAGe with linearly concatenated cyclobutane rings in the alkyl chains (ladderane, I).

linkages has often been considered a specificity of thermophilic or other extremophilic bacteria due to the fact that DAGEs were found primarily in (hyper)thermophilic bacteria (Langworthy et al., 1983; Huber et al., 1992, 1996) and that membrane-spanning tetraether lipids have been observed in acidophilic or (hyper)thermophilic bacteria (Sinninghe Damsté et al., 2007, 2011, 2014). However, ether lipids are widespread in non-extreme environments (Pancost et al., 2001; Orphan et al., 2001; Bradley et al., 2009a; Berndmeyer et al., 2012; Guido et al., 2013) and have been found in some aerobic (Caillon et al., 1983; Asselineau and Asselineau, 1990) and anaerobic (Schmid et al., 2003; Sinninghe Damsté et al., 2005, 2011, 2014; Grossi et al., 2015) mesophilic bacteria. Also, 1-alk-1'-enyl glycerols with a potential acyl chain at the *sn*-2 position of the glycerol (so-called plasmalogens; Fig. 1A) are widespread in eukaryotes and non-thermophilic bacteria (Goldfine and Langworthy, 1988; Nagan and Zoeller, 2001; Goldfine, 2010).

A variety of MAGEs and DAGEs of varying alkyl chain length and structure has been described in living cells and/or natural ecosystems (Fig. 1). Besides plasmalogens, the most widespread MAGEs and DAGEs have *n*-alkyl chains ranging from C₁₂ to C₂₀ (Fig. 1B–D; Pancost et al., 2001; Kaur et al., 2008; Bradley et al., 2009a), with a possible methyl branch at the *iso* or *anteiso* positions, or further along the chain (Fig. 1E; Bradley et al., 2009a; Chevalier et al., 2011). Types of unsaturated MAGEs and DAGEs other than plasmalogens have been characterized. The nature of the unsaturation can be a double bond (Fig. 1F; Elvert et al., 2005), a cyclopropyl ring (Fig. 1G; Bouloubassi et al., 2006; Bradley et al., 2009b) or a terminal cyclohexyl ring (Fig. 1G; Pancost et al., 2001; Bradley et al., 2009b). Macrocylic DAGEs (Fig. 1H) have also been reported from the environment (Blumenberg et al., 2007; Baudrand et al., 2010) but such structures have never been reported from living bacterial

cells. Finally, MAGEs and DAGEs exhibiting linearly concatenated cyclobutane rings in the alkyl chains (known as ladderanes; Fig. 1I) have been identified in bacteria performing the anaerobic oxidation of ammonia (Sinninghe Damsté et al., 2005).

The diversity of non-isoprenoid ether lipids observed in situ sharply contrasts between sites, some sites showing a wide variety of MAGE and DAGe structures (Pancost et al., 2001; Blumenberg et al., 2007; Bradley et al., 2009a) compared with others sites (e.g. Chevalier et al., 2011; Hernandez-Sanchez et al., 2014). Such variation in diversity can be attributed to differences in the lipid composition of ether-producing bacterial populations between sites. However, as classically observed for other membrane lipids, including bacterial phospholipid fatty acids (PLFAs; Ascenzi and Vestal, 1979; Doumenq et al., 1999; Denich et al., 2003; Zhang and Rock, 2008) and branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (brGDGTs; Weijers et al., 2006, 2007), or archaeal di- and tetraether lipids (Sprott et al., 1991; Dawson et al., 2012; Cario et al., 2015), the MAGE and DAGe composition of bacterial membranes is likely influenced by growth conditions such as the nature of the carbon substrate and/or environmental parameters (e.g. temperature, salinity, pH). Little is known, however, about the modification of the alkyl glycerol composition of bacterial membranes induced by changing growth conditions.

We recently reported the predominance of MAGEs and DAGEs (1-*O*-alkyl-, 2-*O*-alkyl- and 1,2-*O*-dialkyl glycerols) among the hydrolyzed lipids of the hydrocarbon-degrading member of the sulfate reducing bacteria (SRB), *Desulfatibacillum alkenivorans* strain PF2803^T (Grossi et al., 2015). Here, we report the presence of MAGEs and/or DAGEs in two out of four other mesophilic SRB (*Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803^T, *Desulfatiferula olefinivorans* strain LM2801^T, *Desulfococcus multivorans* strain DSM 2059^T and “*Desulfococcus oleovorans*” strain Hxd3^T), and describe the influence

of growth substrate on the ether lipid composition of the three strains able to produce these lipids (strains PF2803, CV2803 and LM2801). Growth on various hydrocarbon or organic acid substrates demonstrates that the diversity of MAGEs and DAGEs produced by heterotrophic bacteria can be strongly influenced by the nature of the carbon source, but also that the average structural composition (mean level of branching and chain length) of membrane alkyl glycerols is preserved whatever the growth substrate.

2. Material and methods

2.1. Selection, origin and culturing of bacterial strains

Five strains of Gram-negative mesophilic (optimum growth between 20 and 40 °C) SRB belonging to the family Desulfobacteraceae within the class Deltaproteobacteria were investigated (Table 1). They were selected on the basis of different criteria such as metabolic capacity and phylogenetic relationship based on the 16S rRNA gene (Fig. 2). *D. alkenivorans* strain PF2803^T, *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T and *D. olefinivorans* strain LM2801^T were isolated from oil-polluted sediments and described by Cravo-Laureau et al. (2004a,b, 2007). Strain Hxd3 was isolated from precipitates in an oil–water separator (Aeckersberg et al., 1991) and was tentatively named “*D. oleovorans*”. *D. multivorans* strain DSM 2059^T was isolated from a sewage digester and is described by Widdel (1980).

D. alkenivorans strain PF2803^T was recently reported to produce MAGEs and DAGEs when grown on hexadec-1-ene and pentadec-1-ene (Grossi et al., 2015). Since this strain is able to use a much wider range of substrates (Cravo-Laureau et al., 2004b), it was investigated here for its lipid composition after growth on a wide range of linear alkenes as well as isoprenoid alkenes and organic acids (Table 1). The other *Desulfatibacillum* sp., *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T, is phylogenetically close to strain PF2803 (Fig. 2), but exhibits a larger set of metabolic capabilities, such as the possibility of metabolizing *n*-alkanes in addition to *n*-alkenes (Cravo-Laureau et al., 2005). The alkyl glycerol composition of strain CV2803 was determined following growth on 10 different linear or isoprenoid substrates, including those considered for strain PF2803 for comparison, and the alkane, hexadecane (Table 1). *D. olefinivorans* strain LM2801^T is phylogenetically distant from *Desulfatibacillum* spp., but is positioned between two other species, *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigena*, known to biosynthesize monoalkyl glycerol phospholipids (Rütters et al., 2001; Fig. 2). Due to its limited metabolic capacity (Cravo-Laureau et al., 2007), strain LM2801 was grown on a few *n*-alkyl substrates to check for the presence of alkyl glycerols in the membrane lipids (Table 1). “*D. oleovorans*” strain Hxd3^T was chosen because its metabolic ability resembles that of *D. aliphaticivorans*

strain CV2803^T [growth on fatty acids (FAs), *n*-alkenes and *n*-alkanes] and its phylogenetic position between two of the above species, *D. variabilis* and *D. amnigena* (Fig. 2). Contrary to what the genus name *Desulfococcus* would suggest, strain Hxd3 does not seem to belong to the so-called DSS (*Desulfosarcina/Desulfococcus*) group of SRB considered the source of alkyl glycerols in sites where the anaerobic oxidation of methane (AOM) occurs (Kleindienst et al., 2014). However, common characteristics of strain Hxd3 with the SEEP-SRB1a group, included in the DSS group, have been revealed by Schreiber et al. (2010). Finally, *D. multivorans* strain DSM 2059^T was selected because it does belong to the above DSS group and was thus suspected to biosynthesize alkyl glycerols. Contrary to “*D. oleovorans*” strain Hxd3^T, strain DSM 2059 is not able to grow on hydrocarbons (Kuever et al., 2015) and was thus grown only on organic acids (Table 1).

Strains CV2803, PF2803 and LM2801 were grown in a synthetic sulfate reducing medium (Cravo-Laureau et al., 2004a,b, 2007). Strains Hxd3 (DSM 6200) and DSM 2059 were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) and cultivated on medium 517 and medium 193, respectively, as recommended by DSMZ. All cultures were incubated under optimal growth conditions (at 30 °C for PF2803, CV2803, LM2801 and Hxd3, and 35 °C for DSM 2059) over 1–3 weeks, depending on substrate. Pure (>99%) *n*-alkyl substrates (Table 1) were from Sigma–Aldrich Co. A mixture of synthetic phytadienes (isomeric 3,7,11,15-tetramethylhexadecadienes) was produced by acidic dehydration of commercially available phytol (Sigma–Aldrich) using *p*-toluenesulfonic acid in acetone (Grossi et al., 1998), and purified by way of column chromatography over silica gel using hexane (Hex) as eluent. Each culture was subcultured 3× before lipid analysis. By the end of the exponential growth phase, cells were filtered on glass microfiber filters (GF/B; Whatman) and kept frozen until lipid analysis.

2.2. Cell hydrolysis and isolation of alkyl glycerols

Filtered cells were saponified by refluxing for 1.5 h in 1 N KOH in MeOH–water (1:1, v/v). After cooling, non-saponifiable lipids (neutrals) were extracted from the basic solution with Hex/dichloromethane (DCM, 4:1, v/v; ×4). Following addition of 2 N HCl to the MeOH solution to reach pH 2, saponifiable lipids (acids) were extracted using DCM (×4). The extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, concentrated with a rotary evaporator and evaporated to dryness under a gentle stream of N₂. Base hydrolysis was preferred to acid hydrolysis in order to avoid disruption of eventual vinyl ether bonds. Base hydrolysis is generally considered sufficient for removing head groups from bacterial phospholipids. The hydrolysis of the SRB cells using 0.5 N HCl in MeOH was, however, tested but did not yield different lipid profiles.

Table 1
SRB strains tested for capacity of synthesising alkyl glycerols on different growth substrates.

Species	Strain	Reference	Growth temperature (°C)	Substrates tested ^a	Ether production	
					MAGEs	DAGEs
<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>	CV2803 ^T	Cravo-Laureau et al. (2004a)	30	Acids: Pyr, C ₈ , C ₉ , C ₁₆ <i>n</i> -Alk-1-enes: C _{15:1} , C _{16:1} , C _{17:1} , C _{18:1} <i>n</i> -Alkane: C _{16:0} Isoprenoid alkenes: isC _{20:2}	Yes	Yes
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	PF2803 ^T	Cravo-Laureau et al. (2004b)	30	Acids: Pyr, C ₈ , C ₁₆ <i>n</i> -Alk-1-enes: C _{15:1} , C _{16:1} , C _{18:1} Isoprenoid alkenes: isC _{20:2}	Yes	Yes
<i>Desulfatiferula olefinivorans</i>	LM2801 ^T	Cravo-Laureau et al. (2007)	30	Acids: C ₁₆ , C ₁₄ <i>n</i> -Alk-1-enes: C _{15:1} , C _{16:1}	Yes	No
“ <i>Desulfococcus oleovorans</i> ”	Hxd3	Aeckersberg et al. (1991)	30	Acid: C ₁₈ <i>n</i> -Alk-1-ene: C _{16:1} <i>n</i> -Alkane: C _{16:0}	No	No
<i>Desulfococcus multivorans</i>	DSM2059 ^T	Widdel (1980)	35	Acids: Pyr, Benz, C ₈	No	No

^a Pyr, pyruvate; Benz, benzoate; isC_{20:2}, isomeric phytadienes.

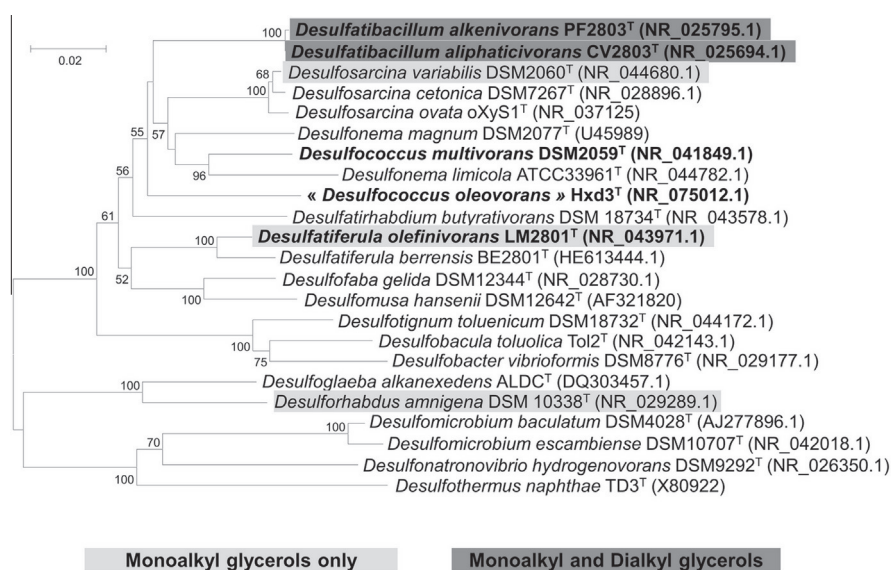


Fig. 2. 16S rRNA gene-based phylogenetic tree (1172 bp) of SRB belonging to the class Deltaproteobacteria. The strains tested appear in bold. Producers of monoalkyl glycerols only are highlighted in light gray and producers of mono- and dialkyl glycerols in dark gray. Only bootstrap supports above 50% are indicated. Scale bar, 0.02 substitution per nucleotide. Sequences were aligned using ClustalW before bootstrap computation (1000 resamplings) of the phylogenetic tree with Mega v6. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) with the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980).

Alkyl glycerols in the neutral lipid extracts were purified using chromatography over a column of silica gel (4% H₂O; 4 g). Four fractions were eluted using solvents of increasing polarity: F1, 50 ml Hex; F2, 40 ml Hex/ethyl acetate (EA) 25:1 v/v; F3, 40 ml Hex/EA 3:1 v/v + 40 ml Hex/EA 1:1 v/v + 40 ml EA; F4, 40 ml MeOH. MAGEs and DAGEs eluted in F3. It is worth noting that, while DAGEs could be quantitatively recovered using 15% EA in Hex, the use of different solvent mixtures of increasing polarity was necessary for the complete recovery of MAGEs in the same fraction. This peculiar chromatographic behavior of MAGEs was observed by Oba et al. (2006) for natural samples containing isoprenoid alkyl glycerols.

A known amount of *n*-tricosanol (*n*-C₂₃-1-ol) used as an internal standard was added to each purified neutral F3 fraction and acid fraction. Alcohols and FAs were silylated by reaction with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) in pyridine (1:1 v/v, 50 °C, 45 min) before GC–MS.

2.3. Ether bond cleavage

In order to determine the position of the methyl branch(es) in branched chain MAGEs and DAGEs, F3 fractions from cultures grown on pyruvate or octanoate were treated with 57% HI (1 h, 120 °C) to cleave ether bonds (Baudrand et al., 2010). After cooling to room temperature, pre-extracted water was added and the solution was extracted 4× with Hex. The total extract was dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent reduced under a gentle stream of N₂. Following addition of anhydrous tetrahydrofuran (THF), alkyl iodides were reduced to the corresponding alkanes by dropwise addition of LiAlH₄ in dry cyclohexane, and leaving the mixture to react at room temperature under magnetic stirring (2 h). Excess hydride was quenched with pre-extracted water and the solution acidified with HCl (pH < 2). Alkane moieties were extracted with Hex (×4) and the total extract was dried over Na₂SO₄ before GC–MS.

2.4. Formation of FA pyrrolidide derivatives

The position of the methyl branch in branched FAs was determined following the formation of pyrrolidides (Grossi et al., 2007). Strains CV2803 and PF2803 grown on pyruvate or octanoate

were hydrolyzed with 0.5 N HCl in MeOH (reflux, 2 h) to transesterify membrane PLFAs. FA methyl esters (FAMES) were purified over a column of silica gel (4% H₂O; 4 g) using 40 ml Hex/EA (13:1 v/v) as eluent. Purified FAMES were resuspended in 0.5 ml pyrrolidine and 50 µl HOAc were added before the mixture was heated at 100 °C for 1 h. After cooling, excess pyrrolidine was evaporated under N₂, and the resulting amides were dissolved with 4 ml Hex/Et₂O (1:1 v/v), washed with 1 N HCl (1×) and water (3×), and dried over Na₂SO₄ before GC–MS analysis.

2.5. GC–MS

GC–MS was performed with an Agilent 6890N gas chromatograph interfaced to an Agilent 5975C mass spectrometer. The GC instrument was equipped with a HP5MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and a cool on column injector. The oven temperature program was: 70 °C–130 °C at 20 °C/min, then to 250 °C at 5 °C/min and finally to 300 °C (held 30 min) at 3 °C/min. He was the carrier gas. A pressure ramp was used as follows: initial pressure 0.69 bar maintained until the isotherm and then increased to 1.5 bar at 0.05 bar/min. The temperature of the interface line, source and quadrupole was 280 °C, 200 °C and 150 °C, respectively. The mass spectrometer was operated at 70 eV over *m/z* 50–800.

2.6. Structural indices

For each culture, we calculated the weighted average chain length (ACL) and level of branching (BRI, branching index) of each class of alkyl glycerol (MAGEs and DAGEs) and of the sum of both classes (AGEs = MAGEs + DAGEs). The ACL of each category of alkyl glycerols (MAGEs, DAGEs and AGEs) was calculated according to Eq. 1, without considering the glycerol moiety and eventual methyl substituents.

$$ACL(i) = \frac{\sum_n (i \text{ with } C_n \times C_n)}{\sum_n i \text{ with } C_n} \quad (1)$$

where *i* = relative abundance of total MAGEs, DAGEs or AGEs with C_n, and C_n = number of carbons in the alkyl chain(s). For DAGEs,

C_n was obtained by dividing the sum of both alkyl chain lengths by 2.

The BRI for each category of alkyl glycerols was calculated according to Eq. 2. Branched compounds were arbitrarily assigned a value of 2 and linear compounds a value of 1, making BRI range between 1 (100% of linear alkylglycerol chains) and 2 (100% branched alkylglycerol chains). In this way, BRI is simply 1 plus the proportion of branched compounds in the culture, as linear and branched alkyl glycerol chains together add up to 100%.

$$\text{BRI}(i) = \frac{\sum_n((\text{branched } i \text{ with } C_n \times 2) + \text{linear } i \text{ with } C_n)}{\sum_n i \text{ with } C_n} \quad (2)$$

where branched i and linear i = relative abundance of branched and linear MAGEs, DAGEs or AGEs, respectively, and i = relative abundance of total MAGEs, DAGEs or AGEs.

To estimate the statistical uncertainty associated with each ACL and BRI value, and therefore to appreciate the extent of observed variation in the two indices as a function of growth substrate, we also determined their 95% confidence intervals (^{95%}CI). The standard error (se) associated with ACL was first computed according to Eq. 3:

$$\text{se}_{\text{ACL}(i)} = \sqrt{\frac{\sum_n(i \text{ with } C_n \times (C_n - \text{ACL})^2)}{N \times n(i \text{ with } C_n)}} \quad (3)$$

where N = number of MAGEs, DAGEs or AGEs.

The lower and upper boundaries of the 95% (symmetric) confidence interval associated with $\text{ACL}(i)$ were computed as $\text{ACL}(i) \pm 1.96 \times \text{se}_{\text{ACL}(i)}$. The 95% (asymmetric) confidence interval associated with BRI was directly obtained from the “exact” (binomial) confidence interval for the proportion of branched compounds computed using the Clopper-Pearson method (Clopper and Pearson, 1934) as implemented in PAST v. 3.10 (Hammer et al., 2001).

3. Results

3.1. Occurrence of alkyl glycerols in selected SRB strains

GC-MS of the purified neutral lipid fractions of the five strains showed the presence of MAGEs in every culture of *Desulfatibacillum* and *Desulfatiferula* strains, whereas DAGEs seemed to be restricted to the genus *Desulfatibacillum* (Tables 1 and 2 and S1). We failed to detect traces of alkyl glycerols in “*D. oleovorans*” and *D. multivorans*, whatever the growth substrate (Table 1). MAGEs and DAGEs in *Desulfatibacillum* and *Desulfatiferula* strains were assigned from their characteristic MS fragmentations. MAGEs with the alkyl chain at sn -1 or sn -2 of the glycerol moiety (1-*O*-alkylglycerols [1-*O*-MAGEs] and 2-*O*-alkylglycerols [2-*O*-MAGEs], respectively) were assigned from the spectra of the silylated derivatives (trimethylsilyl ethers; TMSs), which show major fragments at m/z 205 and m/z 218, respectively (Fig. 3; Myher et al., 1974). DAGE spectra show characteristic major fragments at m/z 130, 131 and 133 (Egge, 1983; Pancost et al., 2001; Bradley et al., 2009a). Fragment ions at M -15, M -90, M -104 and M -147 can be used to determine the molecular weight of MAGEs and therefore the number of carbons in their alkyl chain (Fig. 3A, B and D; Myher et al., 1974). Similar fragments and other diagnostic fragmentations corresponding to cleavage α to *O*-alkyl bonds and cleavage of the bond between the sn -1 and sn -2 carbons allow inferring the structure of both alkyl chains in DAGEs (Fig. 3C; Egge, 1983; Pancost et al., 2001; Bradley et al., 2009a). MAGEs and DAGEs biosynthesized by *Desulfatibacillum* and/or *Desulfatiferula* strains had saturated linear alkyl chains, with a possible methyl branch at C -10, *iso* (i) or *anteiso* (ai) (Tables 2 and S1). The presence of methyl branch(es) was inferred from the retention index values

of MAGEs and DAGEs (Table S1; Pancost et al., 2001). The position of the methyl in branched chains was determined following cleavage with HI of the ether bonds and MS interpretation of the released hydrocarbons (Baudrand et al., 2010; Fig. S1). The position of methyl branches in DAGEs with two branched alkyl chains could not systematically be assessed and thus was sometimes left undetermined (Tables 2 and S1). It is noteworthy that part of the MAGEs after cell hydrolysis were likely present *in vivo* as monoalkyl-/monoacyl glycerols (AAGs; i.e. 1-alkyl-2-acylglycerols or 1-acyl-2-alkylglycerols for 1-*O*-MAGEs and 2-*O*-MAGEs, respectively). Neither 1-*O*-alken-1'-yl glycerols (plasmalogens) nor any other specific type of unsaturated alkyl glycerol (e.g. mid-chain unsaturated, macrocyclic or with cyclopropanyl-, cyclobutyl- or cyclohexyl-containing alkyl chains; Fig. 1) were detected in the hydrolyzed lipids of the three AGE-producing strains.

Among these strains, *D. olefinivorans* strain LM2801^T exhibited the simplest neutral lipid profile irrespective of carbon substrate (Table S1). During growth on *n*-hexadec-1-ene ($C_{16:1}$), palmitate (C_{16}) or myristate (C_{14}), strain LM2801^T biosynthesized two MAGEs assigned as 1-*O*-tetradecylglycerol and 1-*O*-hexadecylglycerol (1-*O*- C_{14} and 1-*O*- C_{16} ; 6 and 18, Table S1). An additional homologue with an odd carbon chain (1-*O*- C_{15} ; 13, Table S1) was formed in similar proportion to MAGE 18 (Table S1) during growth on *n*-pentadec-1-ene ($C_{15:1}$; Table S1). MAGEs produced by strain LM2801 represented only 6–14% of the total lipids after growth on the *n*-alk-1-enes. Neither 2-*O*-MAGEs nor DAGEs were detected in the hydrolyzed lipids of strain LM2801.

The hydrolyzed lipids of *D. alkenivorans* strain PF2803^T and *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T showed a preponderance of diverse MAGEs and DAGEs whatever the growth substrate (Tables 2 and S1). Depending on substrate, AGEs accounted for 14–70% of the total hydrolyzed lipids (alkyl glycerols + FAs) of the strains (data not shown). However, these proportions of AGEs were probably underestimated in many cultures due to an overestimation of the proportions of membrane FA lipids, as explained below (Section 3.3). DAGEs accounted for 29–90% of the total alkyl glycerols (monoalkyl + dialkyl) produced by strains PF2803 and CV2803, except for growth on $C_{15:1}$ which induced a lower proportion of DAGEs (Tables 2 and S1).

3.2. Alkyl glycerol composition of DAGE-producing strains as a function of growth substrate

The diversity of MAGEs and DAGEs produced by *D. alkenivorans* strain PF2803^T and *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T varied strongly depending on growth substrate (Tables 2 and S1; Figs. 4 and 5). Generally, the shorter the substrate in terms of chain length, the higher the number of homologues of alkyl glycerols biosynthesized (Figs. 4 and 5). For substrates that could be used by both strains, the number of homologues of AGEs formed was roughly similar for each strain (Fig. 5). Whatever the substrate, MAGEs and DAGEs with an alkyl chain $<C_{13}$ or $>C_{17}$ were never observed.

3.2.1. Growth on long chain alkyl substrates

Growth on long chain substrates (C_{15} to C_{18} *n*-alk-1-enes [$C_{15:1}$, $C_{16:1}$, $C_{17:1}$, $C_{18:1}$], C_{16} *n*-alkane [$C_{16:0}$] and C_{16} *n*-FA [C_{16}]) yielded 4–11 homologues of MAGEs and 2–10 homologues of DAGEs depending on strain and substrate (Tables 2 and S1; Fig. 5). For both classes of alkyl glycerols, the chain length of the alkyl chain(s) was directly dependent on that of the substrate, with even substrates yielding almost exclusively alkyl glycerols with even alkyl chains, and odd substrates yielding preferentially odd alkyl chains (Tables 2 and S1). Interestingly, growth on even long chain substrates ($C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{16:0}$ or C_{16}) yielded mainly 1-*O*-MAGEs and 2-*O*-MAGEs with a C_{16} or C_{14} alkyl chain with or

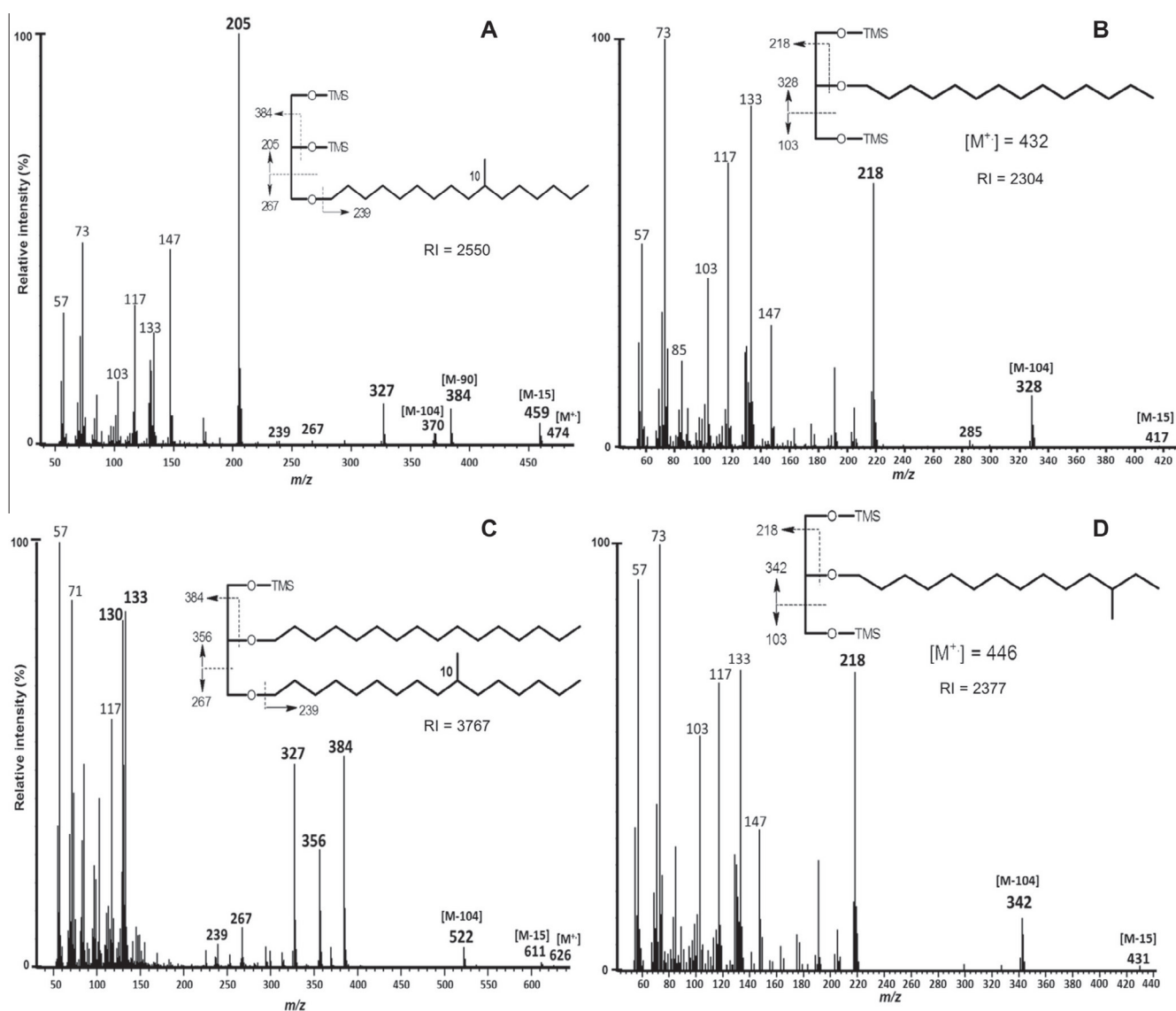


Fig. 3. Mass spectra and structural characteristics of TMS-derivatives of 1-O-10-methylhexadecylglycerol (1-O-10Me-C₁₆; A), 2-O-tetradecylglycerol (2-O-C₁₄; B), 1-O-10-methylhexadecyl-2-O-hexadecylglycerol (1,2-O-10Me-C₁₆/C₁₆; C) and 2-O-12-methyltetradecylglycerol (2-O-ai-C₁₅; D) produced by strains PF2803 and CV2803.

each class of ether lipids, ACL and BRI values appeared very stable whatever the growth substrate and number of homologues formed. The average ACL and BRI values (so-called grand means, and representing the mean of the means) intercept in most cases with the 95% confidence interval calculated for each ACL and BRI value, pointing towards no significant difference from one substrate to another with respect to these grand mean values.

3.3. FA composition of alkyl glycerol-producing strains

Analysis of the acidic lipid fractions of the hydrolyzed cells of the three alkyl glycerol-producing strains revealed the presence of significant proportions of FAs (30–94% of total hydrolyzed lipids; data not shown). The proportions of FAs may in some cases (growth on *n*-alkane and *n*-alkenes) be considered with caution or could not be determined (growth on palmitate), since FAs likely derived from the hydrolysis of FA coenzyme A thioesters constituting *in vivo* metabolites of the growth substrate (or the growth substrate itself for palmitate), in addition to the hydrolysis of monoalkyl/monoacyl glycerol (AAG) and diacyl glycerol (DAG)

membrane lipids. In such cases, the proportion of membrane FAs was probably overestimated, and thus the proportion of alkyl glycerols underestimated.

Assignment of linear FAs was based on characteristic MS fragmentation of the silylated derivatives, whereas assignment of the methyl branched FAs was based on relative retention times and interpretation of the spectra of the pyrrolidide derivatives (Grossi et al., 2007; Fig. S1). For each culture of each strain, FAs exhibited a chain length distribution and methyl branching pattern similar to that of MAGEs and DAGEs. Examples of correspondence between the distributions/structures of FAs and MAGEs biosynthesized by strains CV2803 and PF2803 during growth on octanoate and pyruvate are shown in Figs. 7 and S4. This supports the biosynthetic link between the different classes of compounds proposed by Grossi et al. (2015) based on the lipid composition of strain PF2803 and previously evoked by Hinrichs et al. (2000) and Elvert et al. (2005), following the study of natural environments. Interestingly, C₁₈ FAs were systematically present in the hydrolyzed lipids of both strains but C₁₈ alkyl chains were never observed in MAGEs and DAGEs.

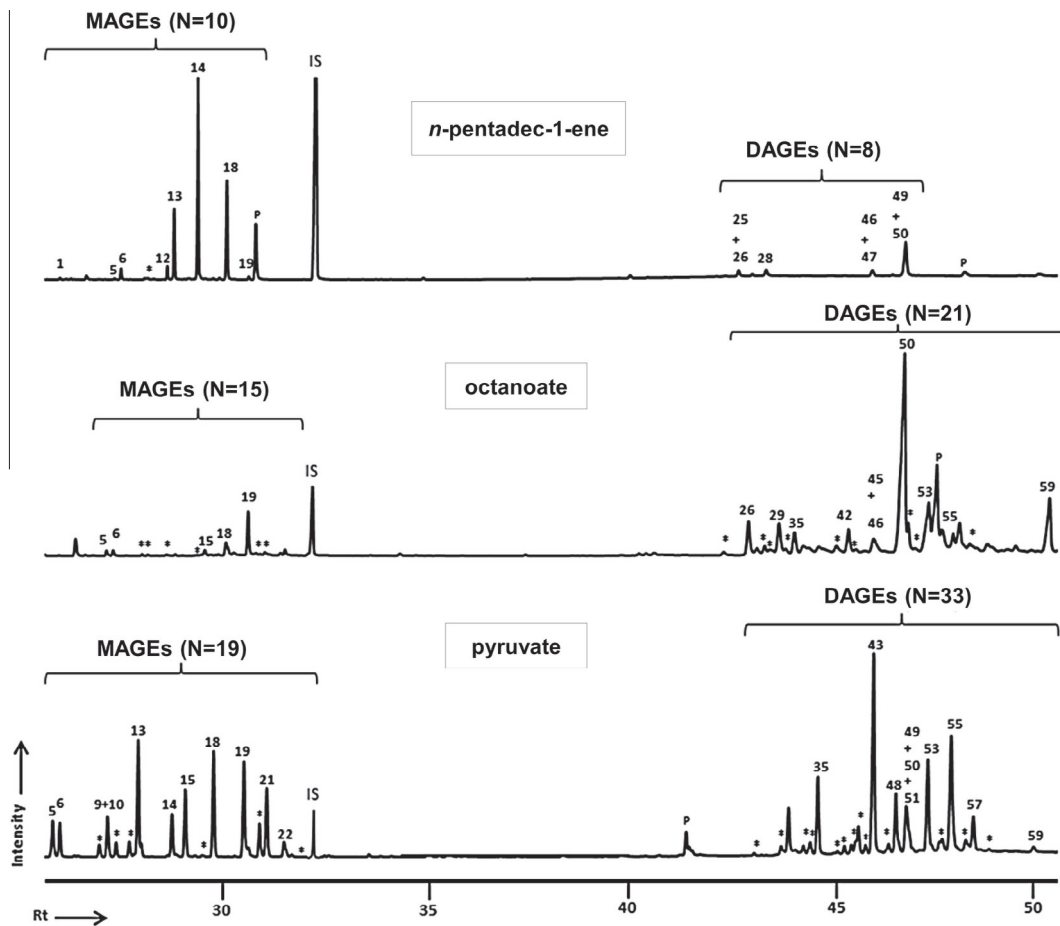


Fig. 4. Partial total-ion chromatograms (TICs) of neutral (saponified) lipids (as TMS derivatives) of *D. alkenivorans* strain PF2803^T grown on *n*-pentadec-1-ene, octanoate and pyruvate. The numbers relate to compounds listed in Table 2; *, co-elution, P, contaminant; IS, internal standard.

4. Discussion

4.1. Substrate-dependent alkyl glycerol composition of SRB membranes

Various studies have shown that a simple change in the structure of the carbon source (e.g. chain length, presence/absence of

functionalities) used by heterotrophic bacteria for growth can significantly influence the PLFA composition of their membranes (e.g. Ascenzi and Vestal, 1979; Doumenq et al., 1999; Cravo-Laureau et al., 2005; Grossi et al., 2007; Rinnan and Baath, 2009). We demonstrate here that this is also the case for alkyl glycerol-containing bacterial membranes. A first indication that changes in the carbon source could influence the ether lipid composition

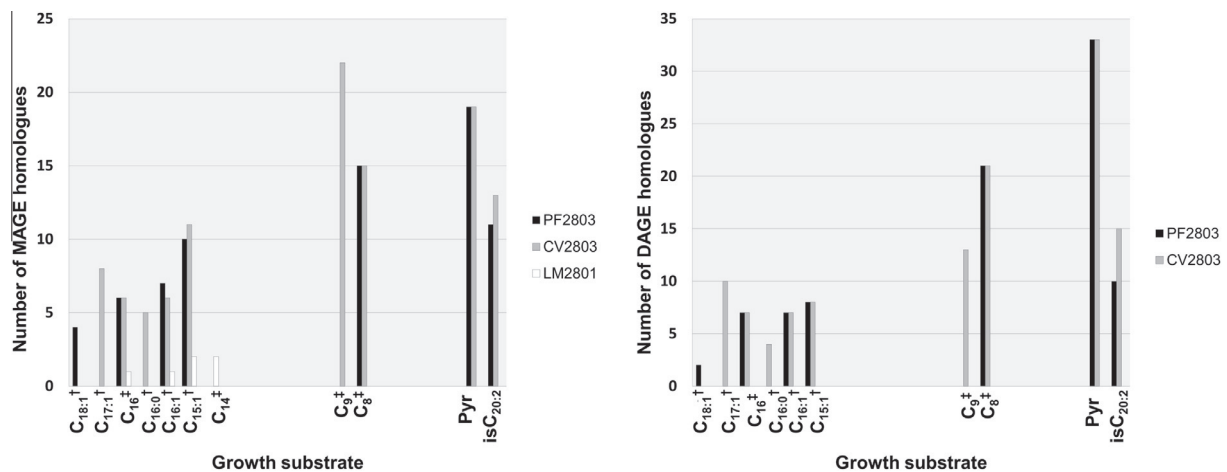


Fig. 5. Number of monoalkyl glycerol (A) and dialkyl glycerol (B) homologues formed by strains PF2803 (black), CV2803 (gray) and LM2801 (white) during growth on different substrates. Linear hydrocarbon and acid substrates are indicated with “+” and “+”, respectively; Pyr, pyruvate; isC_{20:2}, isomeric phytadienes.

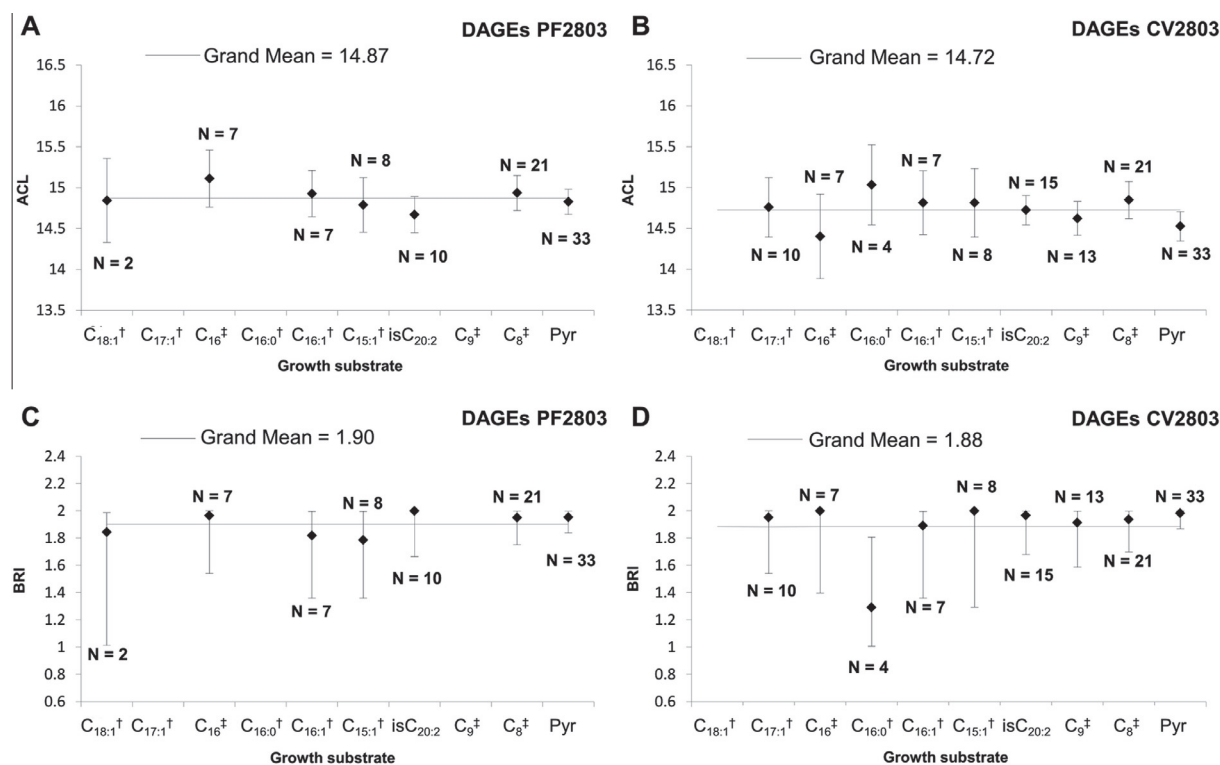


Fig. 6. Weighted ACL (mean and 95% confidence interval) and BRI (mean and 95% confidence interval) of DAGEs formed by strains PF2803 (A and C) and CV2803 (B and D) during growth on different substrates. ACL was calculated without considering the glycerol moiety and eventual methyl substituents, and by dividing the sum of both alkyl chain lengths by 2. *N* indicates number of DAGE homologues synthesized from growth substrate. The continuous line shows the grand mean (weighted average of all means from all growth substrates). Hydrocarbon and acid substrates are indicated with † and ‡, respectively; Pyr, pyruvate; isC_{20:2}, isomeric phytadienes.

of heterotrophic SRB was observed during growth of *D. alkenivorans* strain PF2803^T on C₁₅ and C₁₆ *n*-alkyl substrates (Grossi et al., 2015). The present data obtained with a much wider set of substrates and strains clearly highlight the idea that the production of AGEs by heterotrophic bacteria strongly depends on carbon source.

Except for phytadienes, the use of long chain carbon substrates (i.e. *n*-C₁₅ to *n*-C₁₈ alkenes and FAs) induces the formation of a rather low diversity of AGEs vs. growth on short carbon substrates (i.e. pyruvate to *n*-C₉ FAs; Fig. 5). These strong substrate-dependent variations in alkyl glycerol composition of SRB can be explained to some extent by the distinct metabolic pathways involved in the transformation of the different carbon substrates. Indeed, since MAGEs and DAGEs are formed via the corresponding acyl glycerols (i.e. monoacyl glycerols and monoalkyl/monoacyl glycerols, respectively; Grossi et al., 2015), the number of homologues of AGEs synthesized during growth on a defined substrate depends on the diversity of FAs formed from that substrate, indicating that these FAs fit within the range of chain length required for phospholipid biosynthesis. The anaerobic oxidation of C₁₅–C₁₈ *n*-alk-1-enes by strains PF2803, CV2803 and LM2801 leads to the formation of the corresponding *n*-FAs, which can be incorporated into phospholipids either directly or following one or two β-oxidation sequences and eventual methylation at C-10 (Cravo-Laureau et al., 2005; Grossi et al., 2007, 2015). The few catabolic reactions needed to produce FAs in the C₁₄–C₁₆ range (i.e. those incorporated mainly into phospholipids of the strains here) during growth on C₁₅–C₁₈ substrates thus limits the structural diversity of the acyl, and subsequently alkyl, phospholipid chains produced. Additionally, part of the substrate-derived FAs can be degraded via β-oxidation, yielding C₂ subunits during growth on even

numbered substrates, or C₂ and C₃ subunits during growth on odd numbered substrates. As a consequence, growth on even substrates gives rise to even numbered FAs, MAGEs and DAGEs, whereas growth on odd chain length substrates yields a mixture of even and odd carbon numbered FAs, MAGEs and DAGEs. The diversity of AGEs is thus generally slightly wider after growth on odd *n*-alkyl substrates.

The wider diversity from growth on nonanoate, octanoate and pyruvate reflects the wider diversity of catabolic and anabolic reactions involved in phospholipid FA biosynthesis from these short chain substrates, leading to more diverse sets of cellular FAs and consequently of 1-*O*-MAGE, 2-*O*-MAGE and DAGE lipids. A striking example is the increased production of *anteiso* (and to a lesser extent *iso*) acyl and alkyl chains during growth on these three substrates and especially on pyruvate (Table 2; Figs. 6 and S2). Such branched FAs are formed from α-keto-acid primers which are intermediates in the metabolism of valine, leucine and isoleucine, and whose metabolic pools may be enhanced when pyruvate is exogenously provided to the cells (Kaneda, 1991; Fuchs, 1999). *Anteiso* and *iso* FAs were not observed during growth on long chain *n*-alkyl substrates from which only 10-methyl branched acyl and alkyl chains were formed (Table 2); 10-methyl-FAs have been shown to be formed through the direct methylation of the corresponding linear FAs (Cravo-Laureau et al., 2005; Grossi et al., 2007), a mechanism far different from that involved in *anteiso* and *iso* FA biosynthesis.

Although isomeric phytadienes contain a regularly branched C₁₆ chain, the absence of formation of isoprenoid alkyl glycerols during growth on these isoprenoid alkenes indicates that isoprenoid substrates cannot be incorporated into membrane phospholipids following their initial oxidation. This may be due to

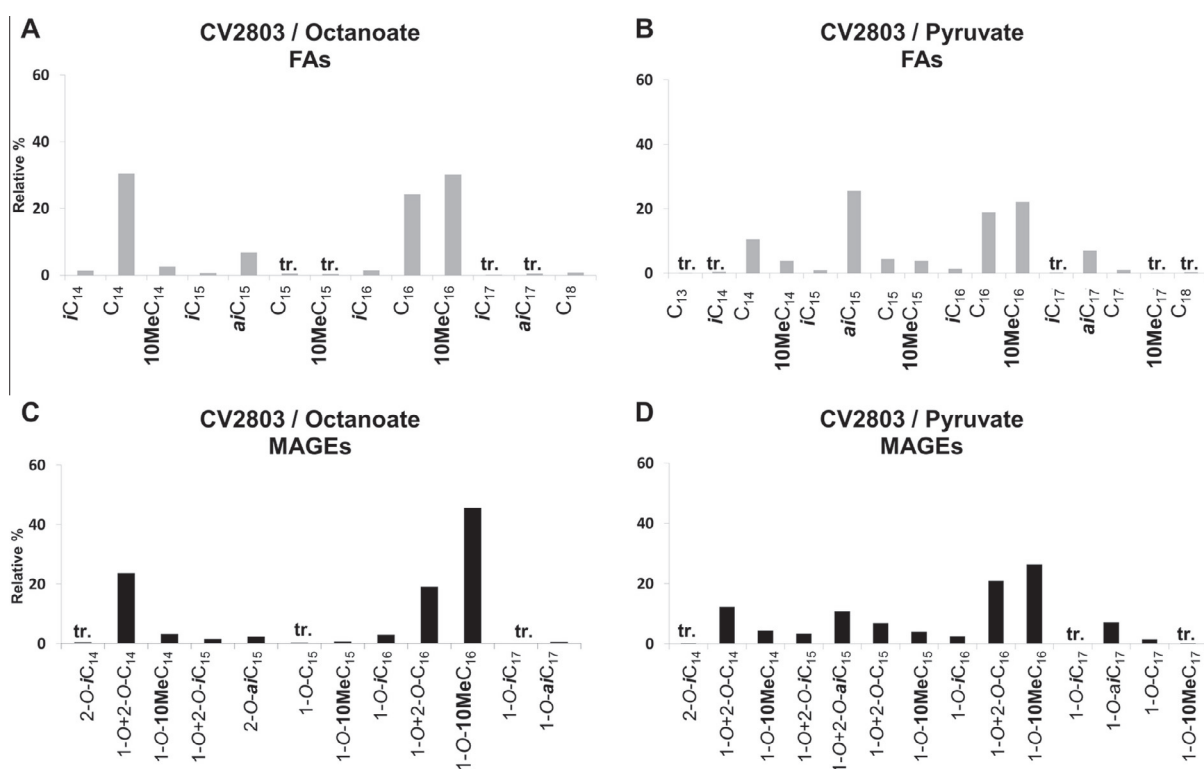


Fig. 7. Relative abundance (%) of FAs and MAGEs released by hydrolysis of cells of *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T grown on octanoate (A and C) and pyruvate (B and D). MAGEs with similar *sn*-1 and *sn*-2 alkyl chains were combined; tr, <0.5% of total MAGEs.

steric hindrance linked to the multi branched nature of the substrate, and especially to the presence of a methyl at C-3. Likewise, 2-Me-C_{16:0} and 4-Me-C_{18:0} FAs formed during the anaerobic oxidation of hexadecane by *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T (Cravo-Laureau et al., 2005) were not incorporated into AGEs (Table 2), likely due to the presence of a methyl too close to the carboxyl group. The enzymes involved in the formation of the ether bonds in bacterial alkyl glycerols are not known but may differ from those responsible for the incorporation of isoprenoid chains into archaeal alkyl glycerols. The diversity in AGEs formed from growth on phytadienes (Fig. 5) can thus be explained by the biosynthesis of linear and methyl branched even and odd numbered FAs (and in turn MAGEs and DAGEs) in the C₁₄ to C₁₇ range from C₁, C₂ and branched C₃ subunits formed during the anaerobic biodegradation of phytadienes.

4.2. Bacterial control of alkyl glycerol-containing membrane composition as a function of growth substrate

Despite the strong substrate-dependent production of AGEs, five homologues (2-O-C₁₄; 1-O-C₁₄; 1-O-C₁₆; 1-O-10MeC₁₆ and 1,2-O-10MeC₁₆/C₁₄) were systematically synthesized by PF2803 and CV2803 (Tables 2 and S1). These MAGEs (likely present as monoalkyl/monoacyl glycerol lipids in non-hydrolyzed cells) and DAGEs account for >10–100% of the total AGEs and appear as essential membrane constituents of both strains. Nonetheless, the wide variation in AGE composition from one substrate to another might have induced changes in the physicochemical properties of the cell membranes. Variation in the structure of PLFAs (methyl branching, unsaturation and chain length) are known to change the lateral and rotational diffusion of membrane lipids and to regulate membrane viscosity (Denich et al., 2003; Zhang and Rock, 2008); this is undoubtedly also the case for bacterial monoalkyl/monoacyl and dialkyl glycerol lipids. However, the

stable ACL and BRI of each class of alkyl glycerols, observed independently of growth substrate used and the number of homologues formed (Figs. 6, S2, and S3), indicate control by the cell of the alkyl glycerol composition of the membrane, and thus the maintenance of optimal membrane properties irrespective of growth substrate. The higher 95% confidence intervals generally observed for MAGEs (and thus for total AGEs) than with DAGEs might be due to the fact that MAGEs were originally present in the cells as monoalkyl/monoacyl glycerol lipids (AAGs) which were hydrolyzed during our experimental procedure, inducing slightly biased ACL and BRI values for MAGEs (and thus increased value scattering) relative to the original AAGs. Likewise, the number of MAGE (and thus of total AGE) homologues formed from each substrate determined after cell hydrolysis was probably underestimated (considering that various acyl chains could be present originally in each AAG), suggesting that >50 homologues of alkyl glycerols can be produced by a single strain from a single substrate.

4.3. Occurrence of alkyl glycerols in the Bacteria domain

Although the membrane lipids of most bacteria contain phospholipids with ester-linked FA side chains, some bacteria also synthesize non-isoprenoid glycerol ether lipids. The biosynthesis of ether lipids within the Bacteria domain was first considered a specificity of thermophilic species due the initial identification of mono- and diether lipids in (hyper)thermophilic bacteria from the genera *Thermodesulfotobacterium* (Langworthy et al., 1983), *Aquifex* (Huber et al., 1992) and *Ammonifex* (Huber et al., 1996). At the time, however, diether lipids were also reported in mesophilic species of myxobacteria (Caillon et al., 1983; Asselineau and Asselineau, 1990) and the presence of plasmalogens (1-alken-1'-yl-2-acylglycerols) in anaerobic bacteria had been known for a long time (Goldfine and Hagen, 1972). Since then, ether lipids have been described in an increasing number of bacterial isolates of varying physiological capacity and

belonging to diverse phyla. For instance, non-isoprenoid MAGEs have been identified in aerobic or anaerobic members of *Proteobacteria* (Wagner et al., 2000; Rütters et al., 2001; Ring et al., 2006; Grossi et al., 2015), *Planctomycetes* (Sinninghe Damsté et al., 2005), *Acidobacteria* (Sinninghe Damsté et al., 2011, 2014), *Actinobacteria* (Paściak et al., 2003), *Firmicutes* (Huber et al., 1996), *Thermotogae* (Sinninghe Damsté et al., 2007) and *Thermodesulfobacteria* (Sturt et al., 2004; Hamilton-Brehm et al., 2013). Non-isoprenoid DAGEs are not systematically biosynthesized by MAGE-producing species and are more restricted to (hyper)thermophilic species including the anaerobes *Thermodesulfotobacterium commune* (Langworthy et al., 1983), *Thermodesulfobacterium hveragerdense* (Sturt et al., 2004), *Thermodesulfobacterium geofontis* (Hamilton-Brehm et al., 2013), *Ammonifex degensii* (Huber et al., 1996) and the aerobe *Aquifex pyrophilus* (Huber et al., 1992). DAGEs have also been reported in mesophilic *Planctomycetes* involved in the anaerobic oxidation of NH_4^+ (Sinninghe Damsté et al., 2005) and, more recently, in the mesophilic sulfate reducing proteobacterium *D. alkenivorans* strain PF2803^T investigated here (Grossi et al., 2015). Glycerol ether lipids further appear in some members of *Thermotogae* (Sinninghe Damsté et al., 2007) and *Acidobacteria* (Sinninghe Damsté et al., 2011, 2014) as membrane-spanning tetraethers (brGDGTs) or mixed ester/ether lipids.

The occurrence of MAGEs and/or DAGEs in LM2801 and CV2803 extends the number of known mesophilic strains able of producing ether lipids. The ether lipid composition of *D. olefinivorans* strain LM2801^T (Table S1) resembles that of the SRB *D. variabilis* and *D. amnigena* (Rütters et al., 2001), which produce only 1-O-MAGEs with a *sn*-1 alkyl chain in the C₁₅–C₁₇ range. The phylogenetic position of these three strains (Fig. 2) suggests that other genera and/or species of mesophilic SRB may also produce MAGEs. However, this physiological trait is not systematic, as shown by the apparent absence of ether lipids from “*D. oleovorans*” strain Hxd3^T and *D. multivorans* strain DSM 2059^T (Table 1; Fig. 2). The predominance and distribution of MAGEs and DAGEs in *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T fits the lipid composition of the phylogenetically close species *D. alkenivorans* strain PF2803^T (Tables 2 and S1; Figs. 2 and 5; Grossi et al., 2015). Due to its widespread occurrence in aquatic settings (e.g. Miralles et al., 2007; Acosta-Gonzalez et al., 2013), the genus *Desulfatibacillum* can thus be envisaged as a good source of MAGEs and DAGEs in anoxic environments. Moreover, the presence of ether lipids in aerobic and anaerobic species of mesophilic and thermophilic bacteria from phylogenetically distinct phyla (Grossi et al., 2015) and their widespread occurrence in all kinds of environments suggest that these lipids may be more prevalent among the bacterial domain than previously envisaged.

The presence of AGEs in bacterial membranes may constitute an advantage to cope with adverse environmental conditions, as evidenced by the preponderance of MAGEs and DAGEs in (hyper)thermophilic bacteria (Langworthy et al., 1983; Huber et al., 1992, 1996; Sturt et al., 2004; Hamilton-Brehm et al., 2013). The advantages of ether lipid membranes have been clearly demonstrated for extremophilic archaea, supporting the idea that ether lipids are well suited for life in extreme environments (Boucher, 2007; Valentine, 2007 and references therein). Alkyl glycerols are known to confer better stability and lower permeability to membranes than acyl glycerols. Plasmalogens and MAGEs also potentially play a role in cell resistance to lysis in aggregating myxobacteria (Ring et al., 2006). The reasons why bacteria synthesize ether lipids and especially how they acquired this capacity remain poorly understood (Nauhaus et al., 2007). The study of the membrane lipids of different (hyper)thermophilic species of *Thermotogae* (Sinninghe Damsté et al., 2007) and *Acidobacteria* (Sinninghe Damsté et al., 2014) showed that the presence of ether bonds is not systematic, and thus cannot be envisaged as an adaptation to “extremophily” alone. The presence of ether lipids in some

bacterial species might be the result of horizontal gene transfer and/or evolutionary convergence from distinct non-thermophilic (Brochier and Philippe, 2002; Glansdorff et al., 2008) or thermophilic (Nelson et al., 1999) ancestors. However, the existence of distinct biosynthetic pathways in different classes of ether lipids in bacteria (Grossi et al., 2015) suggests that (i) the capacity to biosynthesize ether bonds evolved independently in different groups of bacteria and (ii) ether lipids might have provided an evolutionary advantage.

5. Conclusions

We report the presence of alkyl glycerol ether lipids in three of five strains of mesophilic heterotrophic SRB from the *Desulfobacteraceae* family. Within the family, species from the genus *Desulfatibacillum* can be envisaged as a good source of both MAGEs and DAGEs in marine environments, whereas species from the genus *Desulfococcus* do not appear to produce such lipids. The alkyl glycerol composition of SRB was found to be extremely sensitive to the type of carbon substrate used for growth. Few to more than 50 homologues of MAGEs and DAGEs were synthesized from a single substrate, depending on the nature and especially the chain length of the latter. The tremendous diversity of carbon substrates present in the environment may thus be (at least partly) responsible for the structural diversity of alkyl glycerols observed within the geosphere, in addition to the species-dependent production of alkyl glycerols.

AGE-producing bacteria were shown to control the average structural composition (i.e. ACL and BRI) of their lipid membranes in response to varying growth substrate, suggesting the maintenance of proper cell membrane fluidity whatever the carbon source and the related diversity of MAGEs and/or DAGEs produced. On the basis of the present data, it is obvious that additional growth factors, such as environmental parameters (e.g. temperature, pH, salinity, nutrient concentration), also exert a significant influence on the alkyl glycerol composition of bacterial membranes, as commonly reported for other bacterial and archaeal lipids involved in membrane homeoviscous adaptation. Such assumptions are currently being investigated in our laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-12-BSV7-0003) and the European Commission (FP7-PEOPLE-2012-IEF n°326597) through the project BAGEL (Bacterial production of Glycerol Ether Lipids). F. Hakil and I. Mitteau are gratefully acknowledged for help with growing the cultures. We thank D. Rush and M. Elvert for helpful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.05.015>.

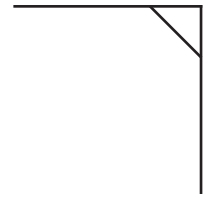
Associate Editor—P. Schaeffer

References

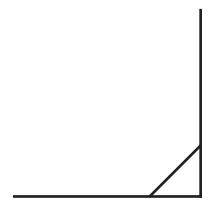
- Acosta-Gonzalez, A., Rossello-Mora, R., Marques, S., 2013. Diversity of benzylosuccinate synthase-like (bssA) genes in hydrocarbon-polluted marine sediments suggests substrate-dependent clustering. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3667–3676.
- Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F., 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 156, 5–14.

- Ascenzi, J.M., Vestal, J.R., 1979. Regulation of fatty acid biosynthesis by hydrocarbon substrates in *Mycobacterium convolutum*. *Journal of Bacteriology* 137, 384–390.
- Asselineau, C., Asselineau, J., 1990. Analyse lipidique en taxonomie bactérienne: proposition d'une méthode standardisée. *Biochemistry and Cell Biology* 68, 379–386.
- Baudrand, M., Grossi, V., Pancost, R., Aloisi, G., 2010. Non-isoprenoid macrocyclic glycerol diethers associated with authigenic carbonates. *Organic Geochemistry* 41, 1341–1344.
- Berndmeyer, C., Birgel, D., Brunner, B., Wehrmann, L.M., Jöns, N., Bach, W., Arning, E. T., Föllmi, K.B., Peckmann, J., 2012. The influence of bacterial activity on phosphorite formation in the Miocene Monterey Formation, California. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 317 (318), 171–181.
- Blumenberg, M., Seifert, R., Petersen, S., Michaelis, W., 2007. Biosignatures present in a hydrothermal massive sulfide from the Mid-Atlantic Ridge. *Geobiology* 5, 435–450.
- Boucher, Y., 2007. Lipids: biosynthesis, function, and evolution. *Archaea. Molecular and Cellular Biology*, 341–353.
- Bouloubassi, I., Aloisi, G., Pancost, R.D., Hopmans, E., Pierre, C., Sinninghe Damsté, J. S., 2006. Archaeal and bacterial lipids in authigenic carbonate crusts from eastern Mediterranean mud volcanoes. *Organic Geochemistry* 37, 484–500.
- Bradley, A.S., Fredricks, H., Hinrichs, K.-U., Summons, R.E., 2009a. Structural diversity of diether lipids in carbonate chimneys at the Lost City Hydrothermal Field. *Organic Geochemistry* 40, 1169–1178.
- Bradley, A.S., Hayes, J.M., Summons, R.E., 2009b. Extraordinary ¹³C enrichment of diether lipids at the Lost City Hydrothermal Field indicates a carbon-limited ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 102–118.
- Brochier, C., Philippe, H., 2002. A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature* 417, 244.
- Caillon, E., Lubochinsky, B., Rigomier, D., 1983. Occurrence of dialkyl ether phospholipids in *Stigmatella aurantiaca* DW4. *Journal of Bacteriology* 153, 1348–1351.
- Cario, A., Grossi, V., Schaeffer, P., Oger, P.M., 2015. Membrane homeoviscous adaptation in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Frontiers in Microbiology* 6, 1–12.
- Chevalier, N., Bouloubassi, I., Birgel, D., Crémère, A., Taphanel, M.-H., Pierre, C., 2011. Authigenic carbonates at cold seeps in the Marmara Sea (Turkey): a lipid biomarker and stable carbon and oxygen isotope investigation. *Marine Geology* 288, 112–121.
- Clopper, C., Pearson, E.S., 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 26, 404–413.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Jouliau, C., Cayol, J.L., Hirschler-Réa, A., 2004a. *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an *n*-alkane- and *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 77–83.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Jouliau, C., Cayol, J.L., Hirschler-Réa, A., 2004b. *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1639–1642.
- Cravo-Laureau, C., Grossi, V., Raphel, D., Matheron, R., Hirschler-Rea, A., 2005. Anaerobic *n*-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* Strain CV2803^T. *Applied and Environment Microbiology* 71, 3458–3467.
- Cravo-Laureau, C., Labat, C., Jouliau, C., Matheron, R., Hirschler-Rea, A., 2007. *Desulfatiferula olefinivorans* gen. nov., sp. nov., a long-chain *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2699–2702.
- Dawson, K.S., Freeman, K.H., Macalady, J.L., 2012. Molecular characterization of core lipids from halophilic archaea grown under different salinity conditions. *Organic Geochemistry* 48, 1–8.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T., 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiol Methods* 52, 149–182.
- Doumenq, P., Acquaviva, M., Asia, L., Durbec, J.P., Le Dréau, Y., Mille, G., Bertrand, J. C., 1999. Changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in response to *n*-eicosane as carbon source and various culture conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 151–161.
- Egge, H., 1983. Mass spectrometry of ether lipids. In: Mangold, H.K., Paltauf, F. (Eds.), *Ether Lipids. Biochemical and Biomedical Aspects*. Academic Press, New York, pp. 17–47.
- Elvert, M., Hopmans, E.C., Treude, T., Boetius, A., Suess, E., 2005. Spatial variations of methanotrophic consortia at cold methane seeps: implications from a high-resolution molecular and isotopic approach. *Geobiology* 3, 195–209.
- Fuchs, G., 1999. Biosynthesis of building blocks. In: Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G. (Eds.), *Biology of the Prokaryotes*. Blackwell Science, Oxford, pp. 110–162.
- Glansdorff, N., Xu, Y., Labedan, B., 2008. The last universal common ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biology Direct* 3, 29.
- Goldfine, H., 2010. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Progress in Lipid Research* 49, 493–498.
- Goldfine, H., Hagen, P.O., 1972. Bacterial Plasmalogens. *Ether lipids: Chemistry and Biology*. Academic Press, New York, pp. 329–350.
- Goldfine, H., Langworthy, T.A., 1988. A growing interest in bacterial ether lipids. *Trends in Biochemical Sciences* 13, 217–221.
- Grossi, V., Hirschler, A., Raphel, D., Rontani, J.-F., De Leeuw, J.W., Bertrand, J.-C., 1998. Biotransformation pathways of phytol in recent anoxic sediments. *Organic Geochemistry* 29, 845–861.
- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Meou, A., Raphel, D., Garzino, F., Hirschler-Rea, A., 2007. Anaerobic 1-alkene metabolism by the alkane- and alkene-degrading sulfate reducer *Desulfatibacillum aliphaticivorans* Strain CV2803^T. *Applied and Environment Microbiology* 73, 7882–7890.
- Grossi, V., Mollex, D., Vinçon-Laugier, A., Hakil, F., Pacton, M., Cravo-Laureau, C., 2015. Mono- and dialkyl glycerol ether lipids in anaerobic Bacteria: biosynthetic insights from the mesophilic sulfate reducer *Desulfatibacillum alkenivorans* PF2803^T. *Applied and Environment Microbiology* 81, 3157–3168.
- Guido, A., Heindel, K., Birgel, D., Rosso, A., Mastandrea, A., Sanfilippo, R., Russo, F., Peckmann, J., 2013. Pendant bioconstructions cemented by microbial carbonate in submerged marine caves (Holocene, SE Sicily). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 388, 166–180.
- Hamilton-Brehm, S.D., Gibson, R.A., Green, S.J., Hopmans, E.C., Schouten, S., Meer, M. T.J., Shields, J.P., Sinninghe Damsté, J.S., Elkins, J.G., 2013. *Thermodesulfobacterium geofontis* sp. nov., a hyperthermophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Extremophiles* 17, 251–263.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.
- Hernandez-Sanchez, M.T., Homoky, W.B., Pancost, R.D., 2014. Occurrence of 1-O-monoalkyl glycerol ether lipids in ocean waters and sediments. *Organic Geochemistry* 66, 1–13.
- Hinrichs, K.U., Summons, R.E., Orphan, V., Sylva, S.P., Hayes, J.M., 2000. Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane oxidizing communities in marine sediments. *Organic Geochemistry* 31, 1685–1701.
- Huber, R., Wilharm, T., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H.O., Stetter, K., 1992. *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 340–351.
- Huber, R., Rossnagel, P., Woese, C.R., Rachel, R., Langworthy, T.A., Stetter, K.O., 1996. Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov. sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 40–49.
- Kaneda, T., 1991. *Iso-* and *anteiso-*fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews* 55, 288–302.
- Kaur, G., Mountain, B.W., Pancost, R.D., 2008. Microbial membrane lipids in active and inactive sinters from Champagne Pool, New Zealand: elucidating past geothermal chemistry and microbiology. *Organic Geochemistry* 39, 1024–1028.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 16, 111–120.
- Kleindienst, S., Herbst, F.A., Stagars, M., von Netzer, F., von Bergen, M., Seifert, J., Peplies, J., Amann, R., Musat, F., Lueders, T., Knittel, K., 2014. Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *The ISME Journal* 8, 2029–2044.
- Kuever, J., Rainey, F.A., Widdel, F., 2015. *Desulfococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–5. doi:<http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01016>.
- Langworthy, T.A., Holzer, G., Zeikus, J.G., Tornabene, T.G., 1983. *Iso-* and *Anteiso-*branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfobacterium commune*. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 1–17.
- Lombard, J., López-García, P., Moreira, D., 2012. The early evolution of lipid membranes and the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology* 10, 507–515.
- Miralles, G., Grossi, V., Acquaviva, M., Duran, R., Bertrand, J.C., Cuny, P., 2007. Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. *Chemosphere* 68, 1327–1334.
- Myher, J.J., Marai, L., Kuksis, A., 1974. Identification of monoacyl- and monoalkylglycerols by gas-liquid chromatography-mass spectrometry using polar siloxane liquid phases. *Journal of Lipid Research* 15, 586–592.
- Nagan, N., Zoeller, R.A., 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research* 40, 199–229.
- Nauhaus, K., Albrecht, M., Elvert, M., Boetius, A., Widdel, F., 2007. In vitro cell growth of marine archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environmental Microbiology* 9, 187–196.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C., Fraser, C.M., 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323–329.
- Oba, M., Sakata, S., Tsunogai, U., 2006. Polar and neutral isopranyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry* 37, 1643–1654.
- Oppermann, B.I., Michaelis, W., Blumenberg, M., Frerichs, J., Schulz, H.M., Schippers, A., Beaubien, S.E., Krüger, M., 2010. Soil microbial community changes as a result of long-term exposure to a natural CO₂ vent. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 2697–2716.

- Orphan, V.J., Hinrichs, K.-U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M., Delong, E.F., 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing Bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environment Microbiology* 67, 1922–1934.
- Pancost, R.D., Bouloubassi, I., Aloisi, G., Sinninghe Damsté, J.S., 2001. Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry* 32, 695–707.
- Paściak, M., Holst, O., Lindner, B., Mordarska, H., Gamian, A., 2003. Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157^T). *Journal of Biological Chemistry* 278, 3948–3956.
- Ring, M.W., Schwar, G., Thiel, V., Dickschat, J.S., Kroppenstedt, R.M., Schulz, S., Bode, H.B., 2006. Novel iso-branched ether lipids as specific markers of developmental sporulation in the *Myxobacterium Myxococcus xanthus*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36691–36700.
- Rinnan, R., Baath, E., 2009. Differential utilization of carbon substrates by Bacteria and Fungi in tundra soil. *Applied and Environment Microbiology* 75, 3611–3620.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J., 2001. Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Archives of Microbiology* 176, 435–442.
- Saito, R., Oba, M., Kaiho, K., Maruo, C., Fujibayashi, M., Chen, J., Chen, Z.Q., Tong, J., 2013. Ether lipids from the Lower and Middle Triassic at Qingyan, Guizhou Province, Southern China. *Organic Geochemistry* 58, 27–42.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., 2003. Two new species of anaerobic ammonium oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 529–538.
- Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A., Amann, R., 2010. Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environmental Microbiology* 12, 2327–2340.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Geenevasen, J.A.J., Strous, M., Jetten, M.S.M., 2005. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of *Planctomycetes* capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox): membrane lipids of anammox Bacteria. *FEBS Journal* 272, 4270–4283.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Schouten, S., Balk, M., Stams, A.J.M., 2007. Structural characterization of diabolic acid-based tetraester, tetraether and mixed ether/ester, membrane-spanning lipids of bacteria from the order *Thermotogales*. *Archives of Microbiology* 188, 629–641.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Foesel, B.U., Overmann, J., Dedysh, S.N., 2011. 13,16-Dimethyl octacosanedioic acid (iso-diabolic acid), a common membrane-spanning lipid of *Acidobacteria* Subdivisions 1 and 3. *Applied and Environment Microbiology* 77, 4147–4154.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Foesel, B.U., Wust, P.K., Overmann, J., Tank, M., Bryant, D.A., Dunfield, P.F., Houghton, K., Stott, M.B., 2014. Ether- and ester-bound iso-diabolic acid and other lipids in members of *Acidobacteria* Subdivision 4. *Applied and Environment Microbiology* 80, 5207–5218.
- Sprott, G.D., Meloche, M., Richards, J.C., 1991. Proportions of diether, macrocyclic diether, and tetraether lipids in *Methanococcus jannaschii* grown at different temperatures. *Journal of Bacteriology* 173, 3907–3910.
- Sturt, H.F., Summons, R.E., Smith, K., Elvert, M., Hinrichs, K.-U., 2004. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry—new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 617–628.
- Valentine, D.L., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 5, 316–323.
- Wagner, F., Rottem, S., Held, H.-D., Uhlig, S., Zähringer, U., 2000. Ether lipids in the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. *European Journal of Biochemistry* 267, 6276–6286.
- Wang, Y., Yunping Xu, Y., 2015. Distribution and source of 1-O-monoalkyl glycerol ethers in the Yellow River and Bohai Sea. *Organic Geochemistry* 91, 81–88.
- Weijers, J.W.H., Schouten, S., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., David, O.R.P., Coleman, J.M., Pancost, R.D., Sinninghe Damsté, J.S., 2006. Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits. *Environmental Microbiology* 8, 648–657.
- Weijers, J.W.H., Schouten, S., van den Donker, J.C., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., 2007. Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 703–713.
- Widdel, F., 1980. Anaerobier Abbau von Fettsäuren und Benzoessäuredurchneuisolierte Artensulfatreduzierender Bakterien (PhD Thesis). University of Göttingen, Germany.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579.
- Zeng, Y.B., Ward, D.M., Brassell, S.C., Eglinton, G., 1992. Biogeochemistry of hot spring environments: 2. Lipid compositions of Yellowstone (Wyoming, USA) cyanobacterial and *Chloroflexus* mats. *Chemical Geology* 95, 327–345.
- Zhang, Y.-M., Rock, C.O., 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6, 222–233.



Supplementary data



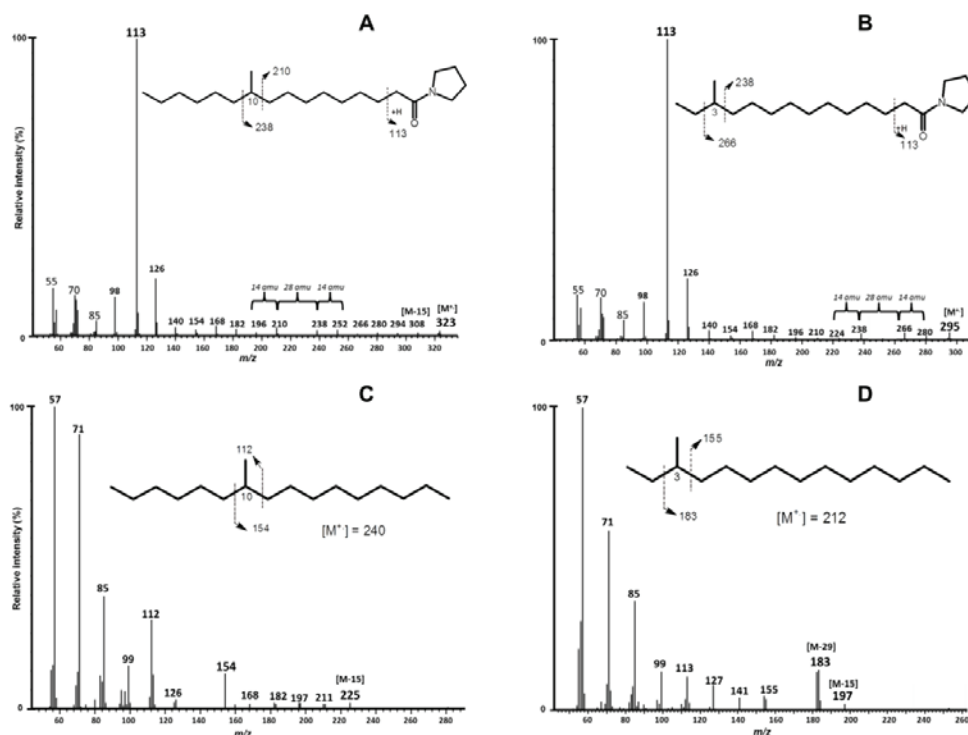


Figure S1: Mass spectra and structural characteristics of 10-methylhexadecanoyl pyrrolidide (**A**) and 12-methyltetradecanoyl pyrrolidide (**B**) from derivatization of 10-methylhexadecanoic acid and 12-methyltetradecanoic acid, respectively; 10-methylhexadecane (**C**) and 3-methyltetradecane (**D**) released after HI/LiAlH₄ treatment of MAGEs and DAGEs.

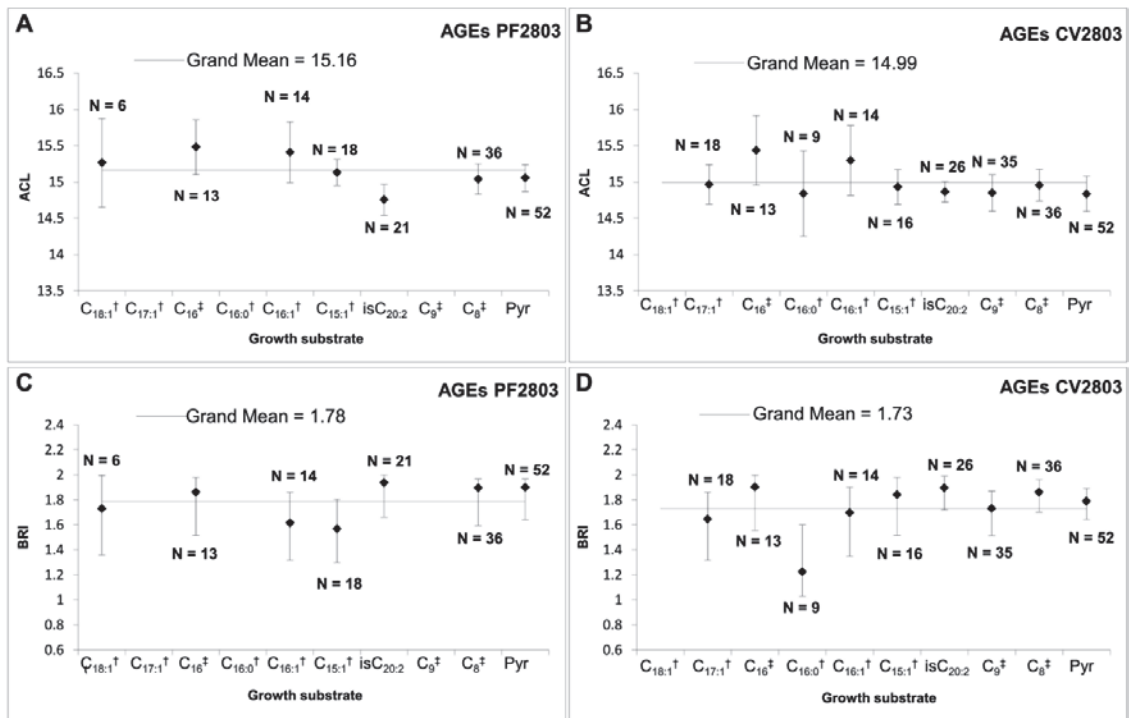


Figure S2: Weighted ACL (mean and 95% confidence interval) and BRI (mean and 95% confidence interval) of total AGEs formed by strains PF2803 (A and C) and CV2803 (B and D) during growth on different substrates. ACL was calculated without considering the glycerol moiety and eventual methyl substituents, and by dividing the sum of both alkyl chain lengths by 2. N indicates number of AGEs synthesized from the growth substrate. The continuous line materializes the grand mean (weighted average of all means from all growth substrates).

Hydrocarbon and acid substrates are indicated with † and ‡, respectively; Pyr, pyruvate; isC_{20:2} isomeric phytadienes.

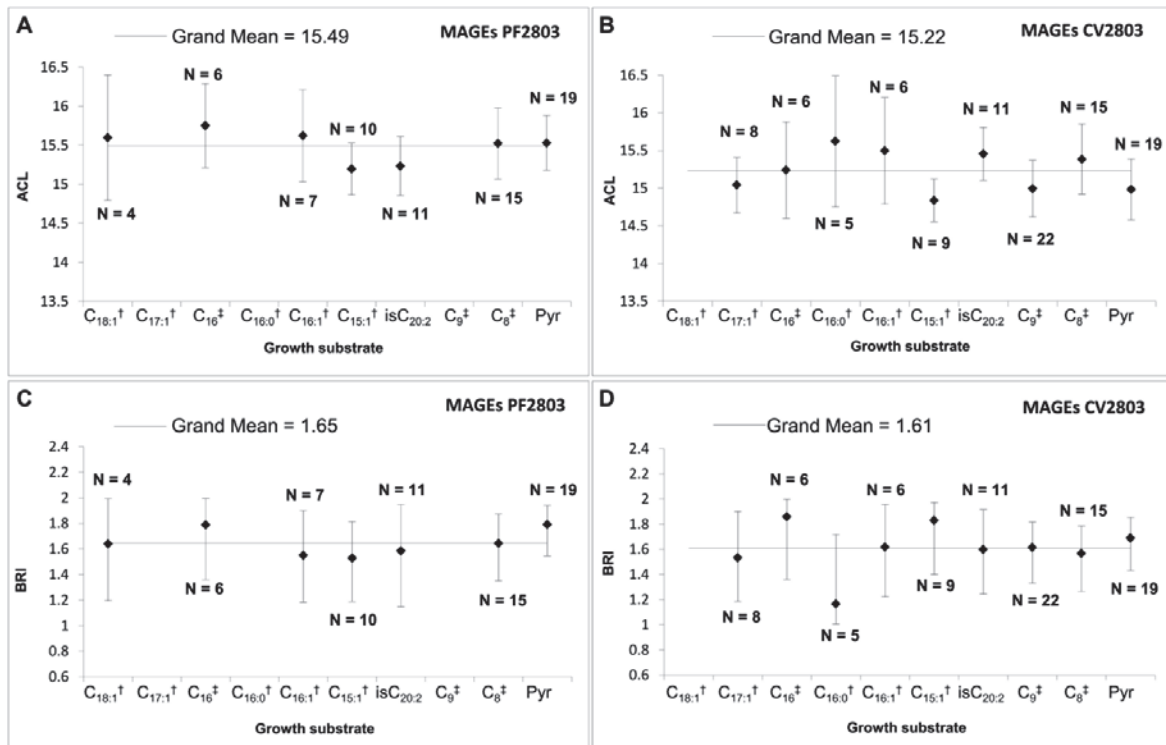


Figure S3: Weighted ACL (mean and 95% confidence interval) and BRI (mean and 95% confidence interval) of total MAGEs formed by strains PF2803 (A and C) and CV2803 (B and D) during growth on different substrates. ACL was calculated without considering the glycerol moiety and eventual methyl substituents, and by dividing the sum of both alkyl chain lengths by 2. N indicates number of MAGEs synthesized from the growth substrate. The continuous line materializes the grand mean (weighted average of all means from all growth substrates). Hydrocarbon and acid substrates are indicated with † and ‡, respectively; Pyr, pyruvate; isC_{20:2}, isomeric phytadienes.

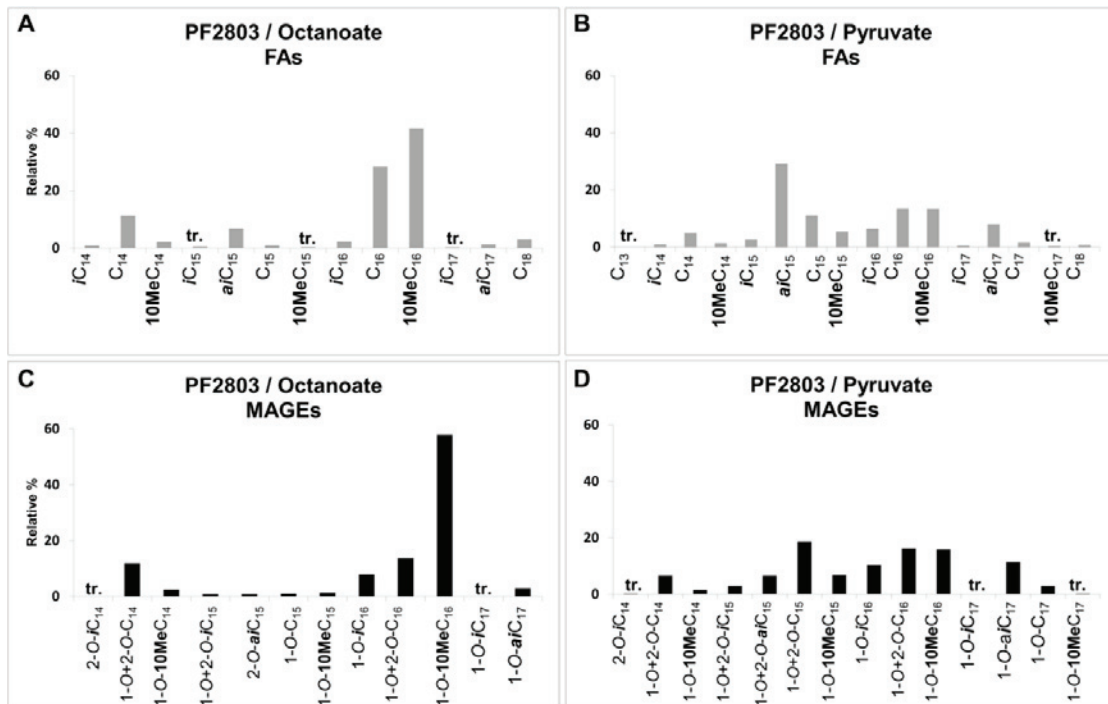


Figure S4: Relative abundance of FA, and MAGEs released by hydrolysis of cells of *D. alkenivorans* strain PF2803 grown on octanoate (A and C) and pyruvate (B and D). MAGEs with similar *sn*-1 and *sn*-2 alkyl chains were combined; tr. < 0.5% of total MAGEs.

**Chapitre 4 : Temperature-dependent alkyl
glycerol ether lipid composition of mesophilic
and thermophilic sulfate-reducing bacteria**

Dans le Chapitre 3, nous avons démontré que la diversité en AGE des BSR capables de synthétiser ces lipides est variable d'un substrat de croissance à un autre, et que le nombre d'homologues de MAGE et de DAGE formés est d'autant plus important (jusqu'à plus de 50 homologues d'AGE synthétisés à partir d'un substrat) lorsque la chaîne carbonée du substrat utilisé est courte ou de nature isoprénoïde. Toutefois, quel que soit le substrat utilisé et le nombre d'homologues formés, la longueur de chaîne moyenne (ACL) ainsi que le degré de ramification (proportions des structures ramifiées vs linéaires) de l'ensemble des AGE restent stables, suggérant un contrôle de la composition en AGE des cellules afin de maintenir des propriétés membranaires optimales. Ces résultats ont donc démontré que la source de carbone ne modifie pas la composition structurale moyenne comme sont susceptibles de le faire d'autres facteurs environnementaux tels que la température, le pH et/ou la salinité.

Dans ce chapitre, trois souches pures de BSR (deux mésophiles : *D. aliphaticivorans* et *D. alkenivorans* ; et une thermophile : *Thermodesulfobacterium commune*) capables de synthétiser des MAGE et des DAGE ont été cultivées à différentes températures afin d'observer si des variations de ce paramètre physique influencent la composition en AGE des membranes bactériennes. Ce chapitre a récemment été publié dans le journal *Frontiers in Microbiology* (Vinçon-Laugier et al., 2017*). Cependant, par souci de clarté, nous avons choisi de ne pas présenter ici les procédures expérimentales, qui sont précisément décrites dans le Chapitre 2.

*Vinçon-Laugier, A., Cravo-Laureau, C., Mitteau, I., Grossi, V., 2017. Temperature-dependent alkyl glycerol ether lipid composition of mesophilic and thermophilic sulfate-reducing Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.01532

Chapter 4: Temperature-dependent alkyl glycerol ether lipid composition of mesophilic and thermophilic sulfate-reducing bacteria

Arnauld Vinçon-Laugier¹, Cristiana Cravo-Laureau², Isabelle Mitteau² and Vincent Grossi^{1*}

¹*Laboratoire de Géologie de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Villeurbanne, France.*

²*Equipe Environnement et Microbiologie – CNRS / UNIV PAU & PAYS ADOUR, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux - IPREM, UMR5254, Pau, France.*

**For correspondence. E-mail vincent.grossi@univ-lyon1.fr; Tel. +33-4-7244 5813; Fax. +33-4-7243 1526.*

Running title: Temperature control on bacterial ether lipids

Abstract

The occurrence of non-isoprenoid alkyl glycerol ether lipids (AGEs) in Bacteria and natural environments is increasingly being documented but the environmental controls on the biosynthesis of these peculiar membrane lipids remain poorly understood. Here, the lipid content of two mesophilic and one thermophilic sulfate reducing bacteria was lower at sub- or supra-optimal growth temperature, but the relative proportions of dialkyl-glycerols (DAGEs) and monoalkyl-glycerols (MAGEs) in each strain remained stable whatever the growth temperature. Strains adapted to temperature changes by modifying the average structural composition (especially the level and pattern of methyl branching) of the alkyl and acyl chains constitutive of their membrane lipids. Specifically, mesophilic strains adapted to increasing temperature by producing less dimethyl branched DAGEs and 10-methyl branched lipids relative to linear structures, whereas the thermophilic strain decreased the proportion

of *anteiso* relative to *iso* compounds. These modifications were in agreement with a regulation of the membrane fluidity. An increase in temperature further induced a preferential production of *sn*-1 vs. *sn*-2 MAGEs in some strains, suggesting an unprecedented mechanism of homeoviscous adaptation in Bacteria. Linear correlations observed between different rapports of AGEs and temperature suggest the potential usefulness of these lipids as indicators of temperature changes in the environment.

4.1. Introduction

The physiological functions of cellular membranes may be strongly influenced by fluctuations of environmental parameters such as temperature, salinity, pH, or hydrostatic pressure (Russell et al., 1995). In response to changing environmental conditions, prokaryotes modify the composition of their membrane to maintain optimal membrane properties (Zhang and Rock, 2008). Pioneer studies devoted to the adaptation of bacterial membranes were performed using *Escherichia coli* grown at different temperatures. The strain was shown to modify its lipid composition according to growth temperature without changing the physical properties of its membrane (Marr and Ingraham, 1962; Sinensky, 1971). These observations gave rise to the theory of homeoviscous adaptation (Sinensky, 1974). Since then, the influence of temperature on bacterial membranes has been intensively studied and is now relatively well constrained in terms of physiological and physico-chemical adaptation (Ersnt et al., 2016 and references therein). Temperature is known to influence the membrane fluidity by altering the lipid ordering, the lateral and rotational diffusion of proteins and the resistance of the membrane to shear forces (Sperotto et al., 1989). Bacteria grow at a temperature corresponding to or just above the phase transition temperature at which membrane lipids are in a crystalline state. This phase transition temperature strongly depends on the chemical structure of membrane lipids.

Bacterial membrane lipids generally consist of fatty acids (FAs) linked via ester bonds to the *sn*-1 and *sn*-2 carbons of a *sn*-glycerol-3 backbone (so-called acyl glycerols), the third carbon of this latter being attached to a phospho- or glyco- polar head group (Lechevalier and Moss 1977; Zhang and Rock, 2008). To control the phase transition temperature of membrane lipids and maintain adequate membrane properties in response to changes in temperature, bacteria adjust the FA composition and, to a lesser extent, the nature of the head group of their phospholipids (Russell, 1984; Ernst et al., 2016). The main adaptive mechanisms concern modifications of the chain length and degree of

unsaturation (adding/removal of double bonds or rings) of the acyl chains and of the proportion of branched (classically *iso/anteiso*) FAs (Russell, 1984; Denich et al., 2003; Koga, 2012).

In addition to acyl glycerols, some bacteria also synthesize alkyl glycerol ether lipids (AGEs; Grossi et al., 2015 and references therein). These less common membrane lipids consist of non-isoprenoid alkyl chains linked to the *sn*-1 and *sn*-2 carbons of a *sn*-3 glycerol by ether bridges instead of the ester bounds found in acyl glycerols. AGEs have first been considered as a specificity of (hyper) thermophilic bacteria due to their chemical resistance relative to ester linkages and their systematic occurrence in deep-branching thermophilic bacterial lineages (De Rosa et al., 1974; Langworthy et al., 1983; Pond and Langworthy, 1986; Huber et al., 1992; Zeng et al., 1992). But the presence of such lipids in diverse mesophilic bacteria (Caillon et al., 1983; Asselineau and Asselineau, 1990; Sinninghe Damsté et al., 2011; Grossi et al., 2015; Vinçon-Laugier et al., 2016) and non-extreme environments (Schouten et al., 2000; Sinninghe Damsté et al., 2000; Pancost et al., 2001) later argued against this conceptual view. In fact, since their discovery, an increasing variety of AGEs has been reported from pure strains of Bacteria and diverse natural settings covering a large range of environmental conditions (Grossi et al., 2015; Vinçon-Laugier et al., 2016 and references therein). The main structures of AGEs reported so far are 1-*O*-monoalkyl (1-*O*-MAGEs) and 2-*O*-monoalkyl (2-*O*-MAGEs) glycerol ethers (containing an eventual acyl chain at the *sn*-2 or *sn*-1 position of the glycerol, respectively), 1,2-*O*-dialkyl glycerol diethers (DAGEs), branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (brGDGTs) and plasmalogens (1-alk-1'-enyl glycerols with an acyl chain at the *sn*-2 position of the glycerol). Except plasmalogens which are widespread in Eukarya and Bacteria, non-isoprenoid ether lipids appear specific to Bacteria. MAGEs are the most common structures and, until now, have been reported in 16 families of Bacteria from 8 different phyla (Grossi et al., 2015; Vinçon-Laugier et al., 2016 and references therein). DAGEs have been reported from a more restricted number of bacterial families including the *Cystobacteraceae* (Caillon et al., 1983; Asselineau and Asselineau, 1990), the *Desulfobacteraceae* (Grossi et al., 2015, Vinçon-Laugier et al., 2016), the *Planctomycetaceae* (Sinninghe Damsté et al., 2005), the *Thermoanaerobacteraceae* (Huber et al., 1996), the *Aquificaceae* (Huber et al., 1992) and the *Thermodesulfobacteriaceae* (Langworthy et al., 1983; Sturt et al., 2004; Hamilton-Brehm et al., 2013). To date, brGDGTs have only been observed in some *Thermotogaceae* (Sinninghe Damsté et al., 2007) and in two species of *Acidobacteriaceae* (Sinninghe Damsté et al., 2011). Logically, MAGEs are systematically present in bacteria able to

synthesize DAGEs or brGDGTs.

Due to their widespread occurrence in the environment and their diagenetic stability, bacterial ether lipids are often considered as powerful biomarkers. During the last decade, different empirical studies based on terrestrial settings have shown that the structural distribution of brGDGTs varies with the mean annual air temperature (MAAT) and the pH of soils (Schouten et al., 2000; Weijers et al., 2007). Consequently, based on extensive surface soil calibrations (Weijers et al., 2007; Peterse et al., 2012), brGDGTs have been intensively used as molecular proxies to reconstruct past MAAT and soil pH, although uncertainties remain on their biological source and the physiological parameters controlling their distribution (Schouten et al., 2013 and references therein). Some attempts have also been made to link variations in AGE structural distribution to environmental variables such as temperature and pH (Hernandez-Sanchez et al., 2014; Kaur et al., 2015; Yang et al., 2015). The usefulness of AGEs as environmental proxies appears, however, strongly limited by the lack of information available on the physiological response of AGE-containing membranes (and especially on the precise structural modification of AGEs) in response to changing environmental conditions. Indeed, few studies have been dedicated to the modification of the ether lipid composition of isolated bacterial strains in response to modifications of their growth conditions (Sinninghe Damsté et al., 2014). Such studies, performed under controlled laboratory conditions, should allow for a better understanding of the mechanisms involved in homeoviscous adaptation of ether-containing bacterial membranes and, in turn, may improve the use or allow the development of environmental molecular indicators based on these peculiar membrane lipids.

We recently reported that the alkyl glycerol ether lipid composition of mesophilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria (SRB) strongly depends on the nature and the chain length of the carbon substrate used for growth (Vinçon-Laugier et al., 2016). However, whereas the number of MAGE and DAGE homologues synthesized from a single substrate may vary from few to more than 50, the average chain length and level of branching of MAGEs and DAGEs were shown to remain remarkably stable for all substrates, illustrating a compositional control of ether lipids to maintain optimal membrane properties in response to changing growth substrate (Vinçon-Laugier et al., 2016). Here, we investigated the influence of growth temperature on the qualitative and quantitative ether lipid composition of these mesophilic SRB grown (on a single substrate) between 20 and 40°C. Comparison with a thermophilic strain growing between 54 and 84°C allowed characterizing typical

changes in the chemical composition of ether-containing bacterial membranes in relation (or not) to temperature physiological preferences.

4.2. Experimental procedures

The SRB strains *D. alkenivorans* PF2803, *D. aliphaticivorans* CV2803 and *T. Commune* DSM 2178 were used as biological models in this study (Chapter 2). Cultures conditions of these strains, as well as methods of extractions and analyses of the cellular lipids content are described in Chapter 2. The determination of structural indices and statistical analysis methods are also described in Chapter 2.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Lipid composition of SRB under optimal growth conditions

The ether lipid composition of *D. aliphaticivorans* strain CV2803^T and *D. alkenivorans* strain PF2803^T grown under optimal conditions of temperature, salinity, pH and nutrient concentration depends on their carbon source (Vinçon-Laugier et al., 2016). In this study, octanoate was chosen as sole source of carbon and energy since it allows a rapid growth of both strains and it is commonly found in natural environments. The hydrolysed lipids of *Desulfatibacillum* strains grown on octanoate under optimal conditions mainly consist of 13 FAs, 15 MAGEs and 21 DAGEs with chain length ranging from C₁₃ to C₁₆ (C₁₃-C₁₈ for FAs) and with a possible methyl branch at C-10 (10Me), *iso* (*i*) or *anteiso* (*ai*) position. The position of methyl branching in MAGEs and monomethyl branched DAGEs could be inferred from the retention order of the compounds (Vinçon-Laugier et al., 2016), but the assignment of the position of the branched alkyl chain(s) on the glycerol moiety (*sn*-1 vs *sn*-2) in DAGEs remained tentative. In both strains, FAs, MAGEs and DAGEs accounted for *ca.* 40, 10 and 50% of total hydrolysed lipids, respectively. It is noteworthy, however, that FAs were present in living cells as monoalkyl/monacyl glycerols (AAGs) and diacyl glycerols (DAGs) leading, after hydrolysis, to an overestimation of the FA-based lipid pool relative to ether lipids.

Lipids of *Thermodesulfobacterium commune* strain DSM 2178^T grown on lactate under optimal conditions were composed of *ca.* 30% of FAs, 10% of MAGEs and 60% of DAGEs although, as

mentioned for the mesophilic strains, the proportion of FA-based lipids relative to ether lipids is likely to be overestimated. 16 FAs ranging from C₁₃ to C₂₀, and 21 MAGEs and 31 DAGEs ranging from C₁₄ to C₂₀ were identified (Table 4.S1). The three classes of compounds contained linear, *iso*- or *anteiso*-branched alkyl chains. The position of methyl branching in branched MAGEs, monomethyl branched DAGEs and DAGEs with two identical branched chains (*ai/ai*, *i/i*) could be inferred from the retention order of the compounds. The assignment of the position on the glycerol moiety (*sn*-1 vs *sn*-2) of the branched alkyl chain(s) in monomethyl branched DAGEs and DAGEs with two different alkyl chains (*ai/i*, *i/ai*) remained tentative (Table 4.S1). The present lipid composition of *T. commune* strain DSM 2178^T partly differs from that reported originally for the same strain by Langworthy et al. (1983). In addition to the identification of a higher diversity of MAGEs and DAGEs in our cultures (e.g., *iso* and *anteiso* lipids with chain lengths >C₁₈; Table 4.S1), the relative distribution of the main homologues was significantly different between both studies. Such differences in the lipid composition of strain DSM 2178^T observed between its original description and the present work performed more than 30 years later can be attributed to improved gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of the various AGE isomers synthesized by the strain, different culture conditions and/or a physiological evolution of the strain over time. Although, under optimal growth conditions, *T. commune* appeared to contain a slightly higher proportion of DAGEs than the two mesophiles, the resemblance in lipid composition between the three strains investigated indicates that the thermal stability of lipids synthesized by bacteria is not directly related to the heat tolerance of the strain (Koga, 2012).

4.3.2. Influence of growth temperature on the lipid composition of SRB

4.3.2.1. Total lipids and lipid classes

The cellular lipid content of the three studied strains appeared maximum at or around the optimal growth temperature, but showed slight changes in response to changing growth temperature (Figs. 4.1A, 4.1B and 4.1C). In most cases, an increase or decrease in temperature induced a decrease in the cell lipid content (Figs. 4.1A-C). The physiological response to temperature changes may vary from species to species but generally leads to two main types of modification of the lipid content. An enhanced cellular lipid production can be observed under (stressing) sub- and supra-

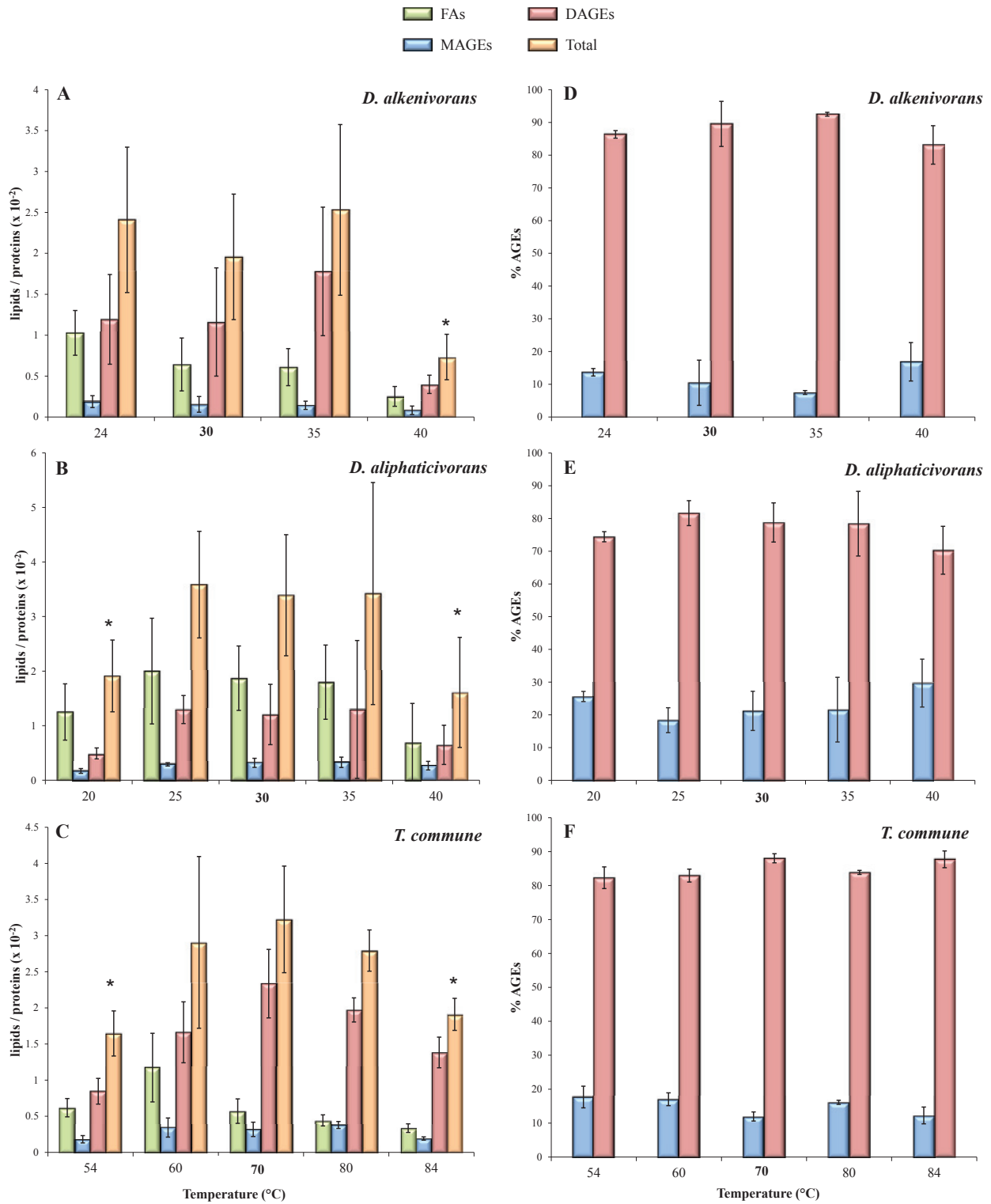


Figure 4.1: Hydrolysed lipid content (A, B and C) and relative abundances of MAGEs and DAGEs (D, E and F) in strains PF2803, CV2803 and DSM 2178 grown at different temperatures. Data are means of three independent cultures. Optimal growth temperatures are bolded. The stars indicate significant differences compared to optimal temperature as determined by the Student test (p-value < 0.05).

optimal temperature conditions (Converti et al., 2009), whereas a decrease or increase in growth temperature may reduce the activity of certain enzymes involved in lipid biosynthesis, thus limiting lipid production (Renaud et al., 1995). The mechanism involved in the present three strains remains unexplored but a modification of the enzymatic activity and/or gene regulation under sub- and supra-optimal growth temperature conditions is likely.

Despite these variations in the amount of cellular lipids, the relative proportion of each lipid class remained relatively stable in each strain, none being preferentially affected by shifts in temperature (Figs 4.1A-C). Remarkably, MAGEs and DAGEs accounted for *ca.* 20 and 80% of total AGEs respectively, whatever the strain and the growth temperature tested (Figs. 4.1D-F). The slight decrease in DAGE and related increase in MAGE proportions observed for strains PF2803 and CV2803 under sub- and supra-optimal conditions (Figs. 4.1D-E) were not significant (p -value > 0.05). Due to the thermal stability of ether bonds relative to ester bonds and to the quasi systematic occurrence of non-isoprenoid alkyl glycerol lipids in thermophilic strains, the occurrence of such compounds has often been regarded as an adaptation of Bacteria to cope with high temperatures (Spratt et al., 1991; Koga, 2012). However, not all of the ether-producing bacteria are themselves thermophilic (Grossi et al., 2015) and some thermophilic bacteria do not synthesize ether lipids (Sinninghe Damsté et al., 2007). The constant ether lipid content of the three strains investigated across their full ranges of growth temperature further argues against ether lipids constituting a direct phylogenetic adaptive strategy to thermophily (Boucher, 2007; Valentine, 2007, Koga, 2012). This, however, does not rule out an implication of these peculiar lipids in bacterial membrane adaptation to changing temperature as shown below.

4.3.2.2. Structural modifications of alkyl and acyl chains

Rather than changing the proportions of the different lipid classes, the three strains were observed to modify the average structural composition of their membrane lipids in response to changing growth temperature. These changes specifically concerned the chain length and branching pattern of the alkyl and acyl chains constitutive of the membrane lipids, as well as the position of the alkyl chain on the glycerol backbone of MAGEs (1-*O*-MAGEs vs 2-*O*-MAGEs). Because we did not analyse phospholipids under their intact form, we could not determine potential modifications of the polar head groups that might have appeared in addition to those observed for the core lipids.

Carbon chain length. The modification of the carbon chain length of phospholipid fatty acids (PLFAs) is a classical way for bacterial membranes to adapt to changing growth conditions. Generally, the average chain length (ACL) of PLFAs increased when the temperature increased, and *vice versa* (Russel, 1984). FAs with longer carbon chains have higher melting points and allow PLFAs to pack more tidily, reducing the membrane fluidity and making the membrane more gel-like in response to an increase in temperature (Quinn, 1981; Russell, 1989; Denich et al., 2003; Mykytczuk et al., 2007). Conversely, a decrease of the growth temperature leads to an increased proportion of FAs with shorter chains whose lower melting-points increase the membrane fluidity and keep the membrane phase transition temperature above ambient temperature (Suutari and Laakso, 1994; Denich et al., 2003; Mansilla et al., 2004; Mykytczuk et al., 2007).

Contrary to this general pattern, the ACL of MAGEs, DAGEs and FAs produced by the mesophilic strains PF2803 and CV2803 slightly decreased with increasing temperature (Figs. 4.2A-B and 4.S1A), whereas *T. commune* did not seem to significantly modify the chain length of its membrane lipids in response to changing growth temperature (Figs. 4.2C and 4.S1A). ACL values of AGEs produced by the two mesophiles even appeared linearly correlated with temperature ($0.60 < R^2 < 0.92$), with comparable linear regression slopes observed for a given class of compounds in both strains. Such trends in the ACL modification of membrane acyl and alkyl lipids are not consistent with the aforementioned mechanisms classically involved in homeoviscous adaptation and, therefore, suggest the existence of alternative and compensatory mechanisms in the present three strains. It should be noted, however, that the ACL of the alkyl and acyl chains synthesized by the thermophilic strain DSM 2178 (~16-17) was systematically higher than that of lipids synthesized by the two mesophilic strains (~15) (Fig. 4.2). This agrees with the fact that thermophilic bacteria generally have to cope with higher temperatures and thus synthesize lipids with longer carbon chains and higher melting points (Shen et al., 1970; Chan et al., 1971; Russell and Fukunaga, 1990). In line with this theory, cultures of *Aquificales* grown at 85°C (Jahnke et al., 2001) synthesized AGEs with a higher ACL (~18-19) than that of *T. commune*.

Freese et al. (2008) previously reported that temperature-induced changes in the FA composition of 24 bacterial strains varied from one strain to another. In this case, the ACL of PLFAs showed no systematic behavior in response to changes in temperature from 10 to 50°C, sometimes being positively or negatively correlated, but most of the time remaining unchanged (Freese et al., 2008).

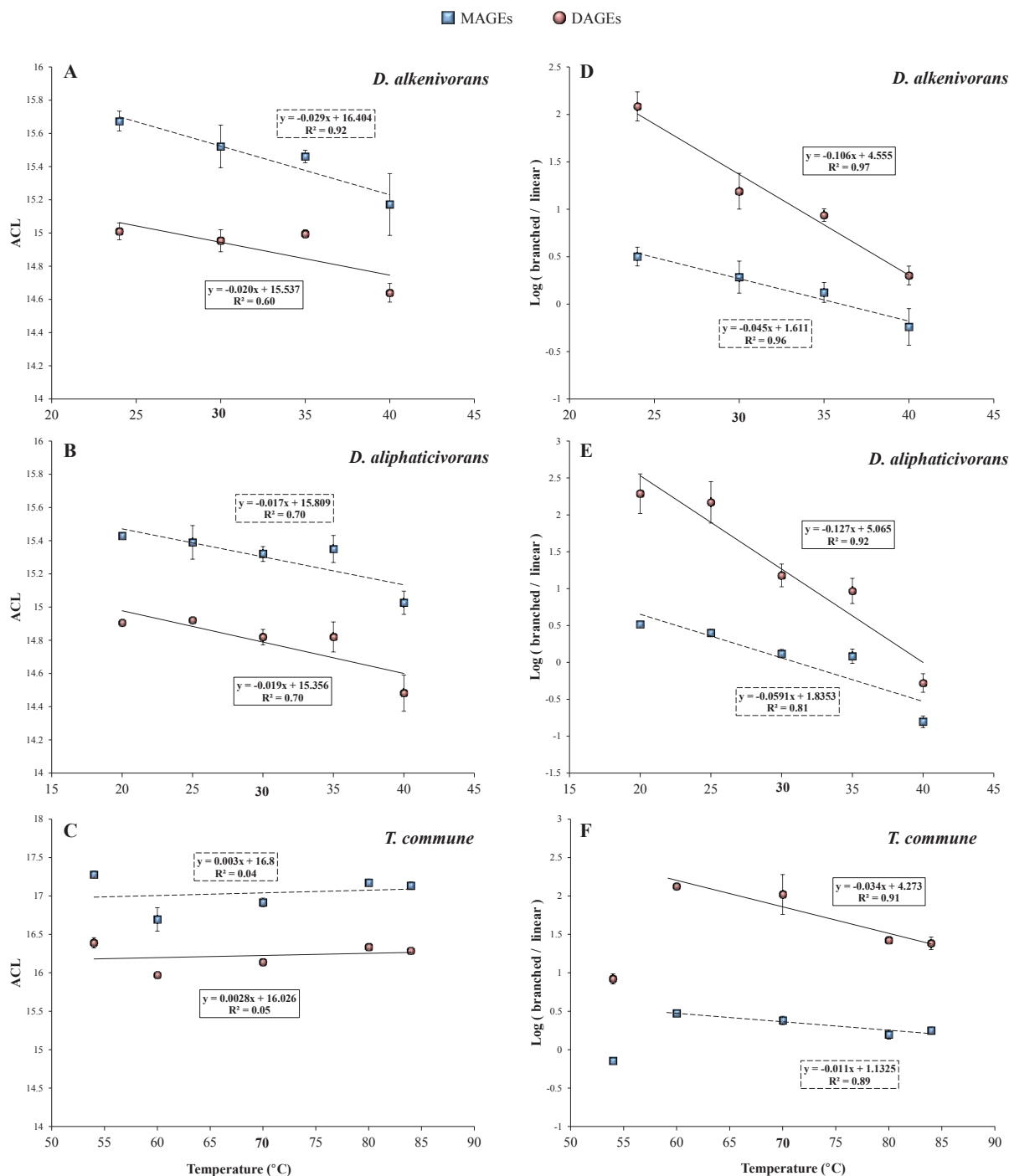


Figure 4.2: Weighted average chain length (ACL, **A**, **B** and **C**) and logarithm of the ratio of branched to linear structures (**D**, **E** and **F**) of MAGEs and DAGEs formed by strains PF2803, CV2803 and DSM 2178 as a function of growth temperature. Branched DAGEs correspond to all compounds with one or two branched alkyl chain(s) whereas linear DAGEs correspond to unbranched compounds (see [Tables 4.S1](#) and [4.S2](#)). Each data point is the mean of three independent cultures. Optimal growth temperatures are bolded.

Another study conducted with the thermophilic bacterium *Bacillus acidocaldarius* also demonstrated constant ACL values (~ 15.9) of PLFAs across a higher (50-70 °C) temperature range (De Rosa et al., 1974). Thus, for both mesophilic and thermophilic bacteria, other structural changes of PLFAs than modification of their carbon chain length are likely to be involved in thermal adaptation. These generally consist in modifications of the degree of unsaturation (addition/removal of double bonds) and/or the level (proportion) and pattern (position) of methyl branching or cyclization (e.g., cyclopropyl rings) which have greater fluidizing effect than chain length modifications (De Rosa et al., 1974; Russell and Fukunaga, 1990; Freese et al., 2008; Knothe and Dunn, 2009). None of the present strains synthesized unsaturated or cyclic FAs and AGEs but all three produced different types of methyl-branched alkyl and acyl chains which were thus further investigated.

Methyl branching. Changes in the proportions of methyl branched PLFAs are known to affect the fluidity of bacterial cytoplasmic membranes (Denich et al., 2003). Branched PLFAs restrict the ability to slide past acyl chains and form crystalline structures, thus increasing the fluidity of the membrane (Russell and Fukunaga, 1990). The proportions of branched MAGEs, DAGEs and FAs synthesized by the present SRB strains were indeed observed to vary as a function of growth temperature. For the two mesophiles, the ratio of total branched vs total linear homologues appeared negatively correlated to temperature for any class of compounds ($0.81 < R^2 < 0.99$; Figs. 4.2D-E and 4.S1B), supporting a direct implication of branched lipids in the regulation of the membrane fluidity throughout the whole growth temperature interval. Remarkably, the linear relationship observed for a given class of compounds was comparable in both strains suggesting similar adaptive mechanisms to changes in temperature. The slopes of the linear relationships appeared, however, 2 to 4 times higher for DAGEs compared to MAGEs and FAs (averaged slopes ~ -0.116 , ~ -0.052 and ~ -0.032 for DAGEs, MAGEs and FAs, respectively). These differences may be explained by the fact that DAGEs were the dominant lipids in both strains and, thus, those preferentially involved in membrane adaptation. It should also be considered that the acyl chains of AAGs present in living cells were hydrolysed during our analytical procedure, thus probably biasing the value of the branched/linear ratio determined for MAGEs (and FAs as well).

The relative proportions of branched MAGEs and DAGEs synthesized by the thermophilic

strain DSM 2178 also appeared negatively correlated to growth temperature between 60 and 84°C ($R^2 \sim 0.90$; Fig. 4.2F), but the linear relationship stopped below 60°C (Fig. 4.2F). This suggests that different mechanisms of thermo-adaptation occur below 60°C to compensate changes in the physical state of membrane lipids induced by a lowering of the temperature. Similar abrupt changes in the adaptive response to temperature have been previously observed for bacterial PLFAs (Aerts et al., 1985; Reizer et al., 1985) or other cellular lipids (Grossi et al., 2000). For both mesophilic and thermophilic organisms, growth at the (inferior or superior) borders of the temperature interval likely induces significant changes in enzymatic production/activity and leads to the formation of different protein and lipid assemblages (Hasegawa et al., 1980; Lauwers and Heinen, 1983; Aerts et al., 1985).

The fluidity of bacterial membranes can be further influenced by the location of the methyl branch(es) along the carbon chains of membrane lipids. The most central the position, the highest the membrane fluidity due to an increase of the lipid area and bilayer thickness, and a decrease of chain ordering and melting point (Knothe and Dunn, 2009; Poger et al., 2014). Methyl branches in bacterial PLFAs most commonly appear in *anteiso* and *iso* positions (Russell, 1984; Russell and Fukunaga, 1990; Denich et al., 2003; Koga, 2012) and, consequently, the relative proportions of *iso*- vs *anteiso*-PLFAs often varies with temperature. The ratio *i/a* generally increases with a rise in temperature and vice-versa (Denich et al., 2003; Mansilla et al., 2004; Koga, 2012). However, branching at more central positions (e.g., C-10) is also regularly encountered (Doumenq et al., 1999; Grossi et al., 2007), and likely plays a significant role in membrane fluidity. This was actually the case for the two investigated *Desulfatibacillum* strains which biosynthesize 10Me-, *anteiso*- and *iso*- alkyl and acyl chain(s). AGEs with a methyl branch at C-10 generally dominated the lipid composition of both strains (representing between 65 and 85% of the total hydrolysed lipids) but were formed in lower proportion when temperature increased (Fig. 4.3 and Table 4.S2). The relative proportions of 10Me-branched MAGEs (Fig. 4.3A-B) and DAGEs (Fig. 4.3D-E) decreased progressively with increasing temperature and this was compensated by an increase of the relative proportions of unbranched (linear) homologues (Fig. 4.3 and Table 4.S2). The proportions of *iso*- and *anteiso*-AGEs did not seem significantly affected by temperature, being eventually slightly lower at either sides of the growth temperature interval. This is in agreement with the fact that methyl branches placed at the end of the acyl chains of PLFAs (i.e., in *anteiso* and *iso* positions) have a lower fluidizing

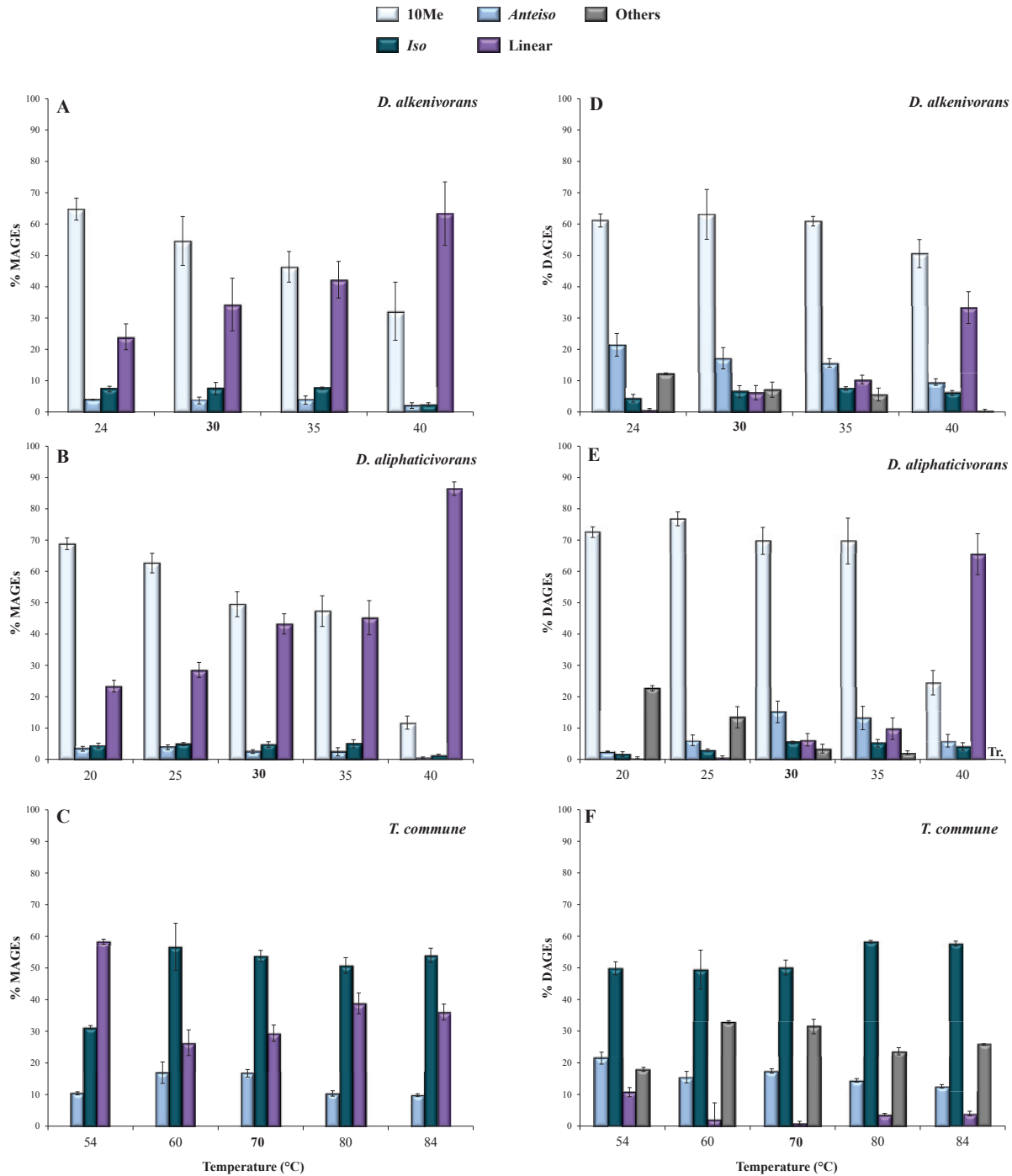


Figure 4.3: Relative abundances (% of total) of 10-Me, anteiso, iso and linear MAGEs (A, B and C) and DAGEs (D, E and F) released by cell hydrolysis of strains PF2803, CV2803 and DSM 2178 grown at different temperatures. For strains PF2803 and CV2803, ‘others’ correspond to (tentatively identified) DAGEs with two branched alkyl chains. For the thermophilic strain DSM 2178, ‘others’ correspond to (tentatively identified) DAGEs with two different branched alkyl chains. Each data point is the mean of three independent cultures. Optimal growth temperatures are bolded.

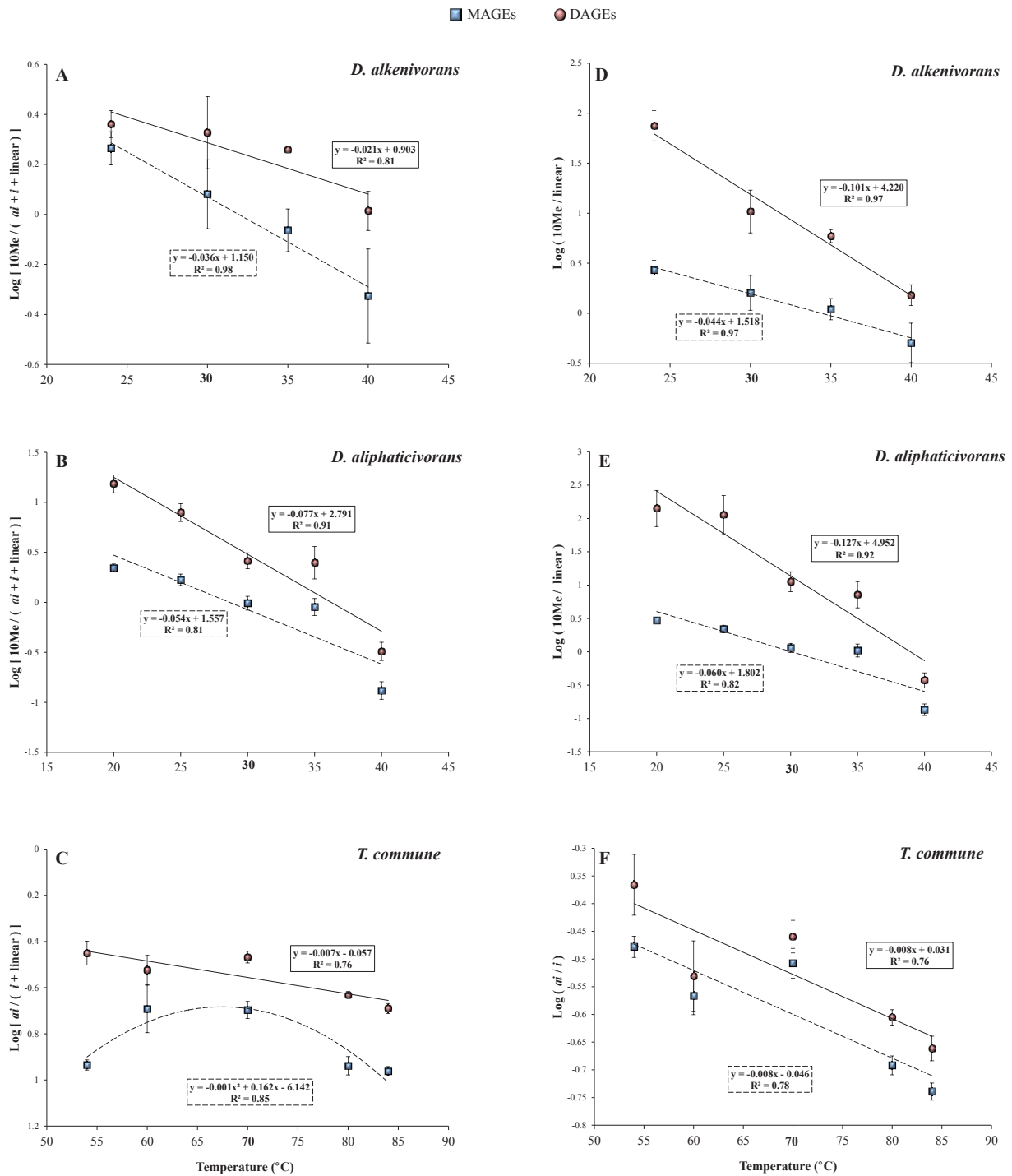


Figure 4.4: A and B) Logarithm of the ratios of 10-Me to *anteiso*+*iso*+linear MAGEs (squares) and monomethyl branched DAGEs (circles) in strains PF2803 and CV2803 versus growth temperature. C) Logarithm of the ratio of *anteiso* to *iso*+linear MAGEs (squares) and DAGEs (circles) in strain DSM 2178 versus growth temperature. D and E) Logarithm of the ratio of 10-Me branched to linear MAGEs (squares) and monomethyl branched DAGEs (circles) in strains PF2803 and CV2803 versus growth temperature. F) Logarithm of the ratio of *anteiso* to *iso* MAGEs (squares) and DAGEs (circles) in strain DSM 2178 versus growth temperature. Each data point is the mean of three independent cultures. For strains DSM 2178, the ratios do not include (tentatively identified) DAGEs with two different branched alkyl chains (see Table 4.S1). Optimal growth temperatures are bolded.

effect than mid-chain branched carbon chains, with *iso*-PLFAs exhibiting physical properties close to unbranched-PLFAs (Poger et al., 2014). Interestingly, in both strains, the proportions of 10Me-branched MAGEs, DAGEs and FAs relative to the sum of all other linear and branched (*anteiso*+ *iso*) homologues appeared strongly correlated to temperature ($R^2 \geq 0.81$; Figs. 4.4A-B and 4.S1C). The linear correlations were even stronger when considering only 10Me-branched and linear structures (Figs. 4.4D-E and 4.S1D). This attested for a major implication of 10Me and linear alkyl (and acyl) chains in the regulation of membrane fluidity by the two investigated mesophilic strains in response to changing temperature.

Unlike *Desulfatibacillum* strains, *T. commune* did not synthesize 10Me-branched lipids and only produced *iso*- and *anteiso*-structures in addition to unbranched alkyl and acyl chains. As commonly observed in thermophilic bacteria (Koga, 2012), *iso*-alkyl chains were dominant in *T. commune*, representing *ca.* 50-60% of total hydrolysed lipids (Figs. 4.3C and 4.3F) and 71% of the total AGEs. This proportion remained relatively constant between 84 and 60°C, but dropped to *ca.* 55% at 54°C where it was compensated by a doubling (from <10% to *ca.* 20%) of linear alkyl chains (Figs. 4.3C and 4.3F and Table 4.S2). *Anteiso*-alkyl chains represented *ca.* one fourth of total alkyl chains under optimal and sub-optimal conditions of temperature (i.e., between 50 and 70°C) but were less present (*ca.* 15%) at supra-optimal growth temperatures (Fig. 4.3C) in accordance with their fluidizing properties and probable involvement in membrane homeoviscous adaptation. The proportion of *anteiso*-DAGEs relative to *iso*- and linear homologues [i.e., *ai/(i+linear)* DAGEs] appeared linearly correlated with temperature across the full range of temperature tested (Fig. 4.4C). This relationship was not systematically verified for the least abundant lipid compounds, MAGEs and FAs, for which *anteiso*-structures were less represented under both sub- and supra-optimal conditions of temperature (Figs 4.4C and 4.4F; 4.S1E and 4.S1F).

Position of the alkyl chain in MAGEs. In addition to modifications of the chain length and branching pattern of the alkyl and acyl chains of membrane phospholipids, changes of the growth temperature also affected the relative proportions of *sn*-1 and *sn*-2 MAGEs synthesized by the three strains (Table S2). In the mesophile CV2803 and the thermophile DSM 2178, the proportion of 2-*O*-MAGEs relative to 1-*O*-MAGEs gradually decreased with increasing temperature, showing a strong linear correlation

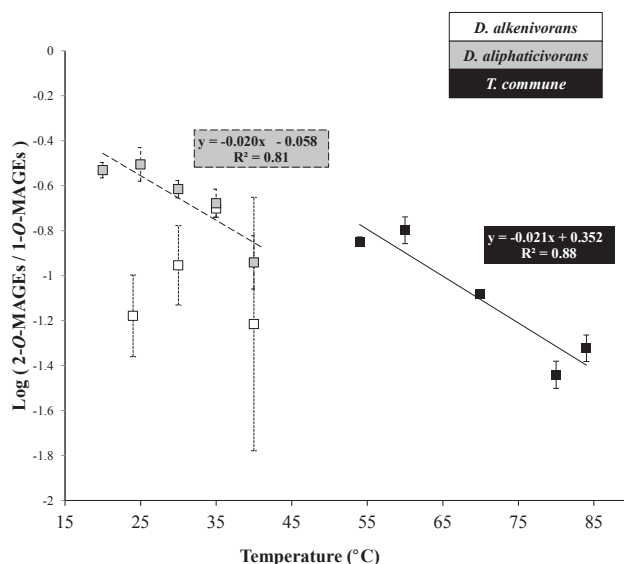


Figure 4.5: Logarithm of the ratio of 2-*O*- to 1-*O*-MAGEs produced by strains PF2803, CV2803 and DSM 2178 as a function of growth temperature. Each data point is the mean of three independent cultures.

with growth temperature (Fig. 4.5). Remarkably, the slope of the linear regression describing the correlation was comparable for both strains, suggesting a similar mechanism of regulation of the proportions of *sn*-2 vs *sn*-1 MAGEs regardless of temperature growth preferences. It should be noted, however, that a similar correlation was not observed for the second mesophilic strain PF2803 for which no clear trend was observed (Fig. 4.5). To our knowledge, the report of a modification of the relative proportions of *sn*-1/*sn*-2 MAGEs in response to changing environmental conditions is unprecedented. The possibility that changes in temperature partially inhibited the (yet unknown) enzymes responsible for the formation of one either ether linkage is unlikely since the proportion of DAGEs relative to MAGEs appeared unchanged across the full range of temperature tested (Fig. 4.1D-F). Differences in the physico-chemical properties of 1-*O*- vs 2-*O*-MAGES are poorly known but, based on the present observations, it seems obvious that *sn*-1 ether lipids have a greater fluidizing effect than *sn*-2 homologues. The regulation of the proportion of 2-*O*-/1-*O*- ether lipids likely constitutes an additional regulatory mechanism employed by some alkylglycerol-synthesizing bacteria to control the fluidity (phase transition temperature) of their membranes and cope with shifts in growth temperature.

4.3.3. Potential usefulness of alkyl glycerols as environmental indicators

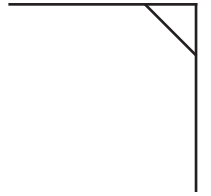
Recent studies have investigated the possibility that distinct distributions of MAGEs or DAGEs in natural settings may reflect an adaptive behaviour of microorganisms to varying environmental conditions. The DAGE composition of diverse geothermal sinters in New Zealand was shown to depend on the pH (from 2.1 to 9.0) and temperature (from 68 to 98°C) of the site in addition to being influenced by differences in the microbial community (Kaur et al., 2015). Disentangling the individual effect of one either physicochemical parameter in such complex geothermal settings appeared however difficult, and correlations between the ACL of DAGEs and temperature or pH could only be obtained by removing the extreme pH or temperature samples. The chain length and the degree of unsaturation of 1-*O*-MAGEs present in suspended particulate organic matter from the eastern South Atlantic and the Southern Ocean were also suspected to be linked to seawater temperature (Hernandez-Sanchez et al., 2014), but no clear correlation between MAGE structures and temperature was highlighted. Difficulties in using modifications of the ACL of AGEs as an indicator of temperature changes further relies on the non-systematic (and sometimes paradoxical) response observed from one bacterial strain to another (e.g., Figs. 4.2A-C and discussion above). However, the ACL of AGEs in bacteria appears related to the optimal growth temperature, possibly allowing the psychrophilic, mesophilic, thermophilic or hyperthermophilic character of bacteria to be distinguished based on this averaged structural characteristic. On another hand, the use of the degree of unsaturation of AGEs to trace temperature changes in the environment seems complicated because unsaturated AGEs are less common and less resistant to diagenesis than their saturated counterparts.

The strong correlations observed between modifications of the level of methyl branching and/or of the specific methylation pattern of AGEs and temperature (Figs. 4.2, 4.4 and 4.S2) allow envisaging the use of AGEs as potential indicators of temperature changes in natural environments. Indeed, such modifications are in good agreement with a regulation of the membrane fluidity regardless of the growth temperature optimum/range, and with previous observations made with PLFAs and brGDGTs (Denich et al., 2003; Weijers et al., 2007; Peterse et al., 2012; Poger et al., 2014). Moreover, several ratios of branched to linear structures of MAGEs and DAGEs appear correlated to temperature (Figs. 4.2, 4.4 and 4.S2), which may facilitate the choice of an adequate ratio to use depending on the type of environment considered and diversity of AGE encountered. The ratios of (total) branched to linear MAGEs or DAGEs (Fig. 4.2D-F) and of (total) dimethyl branched to linear DAGEs (Fig. 4.S2) are

likely the easiest ratios to determine in a given sample, as they do not imply the precise structural identification of the compounds. Those latter can simply be distinguished based on their molecular weight and chromatographic retention time. Whenever possible, subtler and specific distributional variations in methyl branched MAGEs and DAGEs can also be investigated. Specifically, the ratios of 10-Me to linear and of *anteiso* to *iso* MAGEs and DAGEs (Fig. 4.4D-F) may constitute powerful indicators of temperature changes in temperate and (hyper)thermophilic environments, respectively. Noteworthy is the fact that adaptation to changes in pH also potentially influences the methylation pattern of AGEs. A significant negative correlation between the *iso* to *anteiso* ratio of 1-*O*-MAGEs and soil pH was observed during the study of Chinese soils, but no relationship between the two parameters was evidenced for lake sediments (Yang et al., 2015). An effect of pH on branching of MAGEs and DAGEs may thus be restricted to environments characterized by large intervals of pH, such as soils (Yang et al., 2015) or extreme environments (Kaur et al., 2015), and eventually be used to distinguish different type of paleoenvironments (Wang and Xu, 2016). Additional culture experiments focusing on the possible effect of pH on the AGE composition of bacteria would anyway deserve investigation.

The significant ($R^2 > 0.81$) correlation observed between growth temperature and the proportion of 2-*O*- to 1-*O*-MAGEs in strains CV2803 and DSM 2178 (Fig. 4.5) also suggests a potential usefulness of this ratio as an indicator of temperature changes across a large temperature interval (20-85°C). However, this unprecedented mechanism of homeoviscous adaptation does not seem to occur in all AGE-synthesizing strains (Fig. 4.5), supporting the need for further studies with other AGE-producers to determine its degree of representativeness in Bacteria.

Conclusively, the strong correlations observed between specific structural features of MAGEs and DAGEs and the growth temperature of marine bacteria might allow the use of these thermostable lipids as a new tool for tracing temperature changes in aquatic ecosystems back in time, in a way comparable to other molecular proxies (Eglinton and Eglinton, 2008). Studies on the distributional variations in AGEs in (ancient) marine sedimentary settings characterized by contrasting temperatures should help supporting this latter hypothesis.



Supplementary data

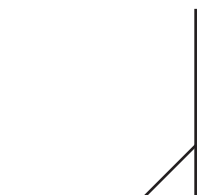


Table 4.S1: Relative proportions (% of total lipids) of individual fatty acids (FAs), monoalkyl glycerols (MAGEs) and dialkyl glycerols (DAGEs) released by acid hydrolysis of cells of *T. commune* DSM 2178 grown at 70°C (optimal growth temperature). Relative abundances and standard deviations were calculated on the basis of three independent cultures. tr., traces (< 0.1%). Major compounds (> 3%) are highlighted in bold.

FAs		MAGEs		DAGEs	
<i>iC</i> ₁₄	tr	1- <i>O-iC</i> ₁₅	tr	1,2- <i>O-iC</i> ₁₅ / <i>iC</i> ₁₆	tr
<i>nC</i> ₁₄	tr	1- <i>O-aiC</i> ₁₅	tr	1,2- <i>O-aiC</i> ₁₅ / <i>iC</i> ₁₆ *	0.1 ± 0.0
<i>iC</i> ₁₅	tr	2- <i>O-iC</i> ₁₆	0.3 ± 0.0	1,2-<i>O-iC</i>₁₆/<i>iC</i>₁₆	3.8 ± 0.2
<i>aiC</i> ₁₅	tr	1- <i>O-iC</i> ₁₆	0.6 ± 0.0	1,2- <i>O-iC</i> ₁₅ / <i>aiC</i> ₁₇ *	0.2 ± 0.0
<i>iC</i>₁₆	5.0 ± 0.4	2- <i>O-nC</i> ₁₆	tr	1,2- <i>O-aiC</i> ₁₅ / <i>aiC</i> ₁₇	0.1 ± 0.0
<i>nC</i> ₁₆	0.7 ± 0.0	1- <i>O-nC</i> ₁₆	0.3 ± 0.0	1,2- <i>O-nC</i> ₁₆ / <i>iC</i> ₁₆ *	1.5 ± 0.0
<i>iC</i> ₁₇	1.0 ± 0.1	2- <i>O-iC</i> ₁₇	tr	1,2- <i>O-nC</i> ₁₆ / <i>nC</i> ₁₆	0.1 ± 0.0
<i>aiC</i>₁₇	5.8 ± 0.3	1- <i>O-iC</i> ₁₇	0.5 ± 0.0	1,2- <i>O-iC</i> ₁₇ / <i>iC</i> ₁₆	1.6 ± 0.1
<i>nC</i> ₁₇	tr	2- <i>O-aiC</i> ₁₇	0.3 ± 0.0	1,2- <i>O-iC</i> ₁₆ / <i>iC</i> ₁₇	0.7 ± 0.1
<i>iC</i> ₁₈	2.7 ± 0.2	1- <i>O-aiC</i> ₁₇	1.0 ± 0.1	1,2-<i>O-iC</i>₁₆/<i>aiC</i>₁₇ *	3.8 ± 0.5
<i>nC</i> ₁₈	1.8 ± 0.3	1- <i>O-nC</i> ₁₇	tr	1,2-<i>O-aiC</i>₁₇/<i>iC</i>₁₆ *	3.8 ± 0.5
<i>iC</i> ₁₉	tr	2- <i>O-iC</i> ₁₈	tr	1,2- <i>O-nC</i> ₁₆ / <i>iC</i> ₁₇ *	0.1 ± 0.1
<i>aiC</i> ₁₉	0.2 ± 0.0	1-<i>O-iC</i>₁₈	3.8 ± 0.3	1,2- <i>O-iC</i> ₁₇ / <i>nC</i> ₁₆ *	0.1 ± 0.1
<i>nC</i> ₁₉	tr	2- <i>O-nC</i> ₁₈	tr	1,2- <i>O-nC</i> ₁₆ / <i>aiC</i> ₁₇ *	1.5 ± 0.4
<i>iC</i> ₂₀	tr	1- <i>O-nC</i> ₁₈	2.6 ± 0.5	1,2-<i>O-iC</i>₁₈/<i>iC</i>₁₆	15.9 ± 1.0
<i>nC</i> ₂₀	tr	2- <i>O-iC</i> ₁₉	tr	1,2- <i>O-iC</i> ₁₇ / <i>iC</i> ₁₇	0.3 ± 0.0
		1- <i>O-iC</i> ₁₉	tr	1,2-<i>O-aiC</i>₁₇/<i>iC</i>₁₇ *	3.2 ± 0.1
		1- <i>O-aiC</i> ₁₉	0.3 ± 0.1	1,2-<i>O-aiC</i>₁₇/<i>aiC</i>₁₇	4.3 ± 0.7
		1- <i>O-nC</i> ₁₉	tr	1,2-<i>O-nC</i>₁₈/<i>iC</i>₁₆ *	8.7 ± 0.7
		1- <i>O-iC</i> ₂₀	tr	1,2- <i>O-nC</i> ₁₈ / <i>nC</i> ₁₆	0.6 ± 0.4
		1- <i>O-nC</i> ₂₀	tr	1,2- <i>O-iC</i> ₁₈ / <i>iC</i> ₁₇	1.4 ± 0.4
				1,2- <i>O-iC</i> ₁₇ / <i>iC</i> ₁₈	0.1 ± 0.0
				1,2-<i>O-iC</i>₁₈/<i>aiC</i>₁₇ *	11.6 ± 1.1
				1,2- <i>O-nC</i> ₁₈ / <i>iC</i> ₁₇ *	0.9 ± 0.0
				1,2-<i>O-nC</i>₁₈/<i>aiC</i>₁₇ *	6.3 ± 0.3
				1,2- <i>O-nC</i> ₁₈ / <i>nC</i> ₁₇	tr
				1,2- <i>O-iC</i> ₁₈ / <i>iC</i> ₁₈	0.8 ± 0.1
				1,2- <i>O-iC</i> ₁₉ / <i>aiC</i> ₁₇ *	0.3 ± 0.1
				1,2- <i>O-aiC</i> ₁₉ / <i>aiC</i> ₁₇	0.4 ± 0.0
				1,2- <i>O-nC</i> ₁₈ / <i>iC</i> ₁₈ *	0.5 ± 0.2
				1,2- <i>O-nC</i> ₁₈ / <i>nC</i> ₁₈	0.1 ± 0.0

* Tentative assignment of the position of the branched alkyl chain(s) on the glycerol moiety (1-*O*- vs 2-*O*-)

Table 4.S2: Relative proportions (mean of three independent cultures) of linear and methyl branched MAGEs and DAGEs (% of total AGEs) and of 1-*O*-MAGEs and 2-*O*-MAGEs (% of total MAGEs) in strains PF2803, CV2803 and DSM 2178 grown at different temperatures. Optimal growth temperatures are bolded.

Strain	T° (°C)	MAGEs		DAGEs			1- <i>O</i> -MAGEs	2- <i>O</i> -MAGEs
		Linear	Monomethyl br.	Linear	Monomethyl br.	Dimethyl br.		
PF2803	24	3.3 ± 0.8	10.4 ± 0.3	0.7 ± 0.3	75.1 ± 0.7	10.5 ± 0.4	93.7 ± 2.3	6.3 ± 2.3
	30	4.3 ± 4.4	8.2 ± 7.8	5.4 ± 2.1	75.9 ± 12.1	6.2 ± 1.9	89.9 ± 3.7	10.1 ± 3.7
	35	3 ± 0.6	4.2 ± 0.4	9.6 ± 1.3	78 ± 2.9	5.2 ± 1.9	83.4 ± 1.2	16.6 ± 1.2
	40	10.8 ± 5.5	6.1 ± 0.6	27.6 ± 2.2	55.1 ± 8	0.4 ± 0.3	93.5 ± 8.5	6.5 ± 8.5
CV2803	20	6 ± 0.7	19.6 ± 1.1	0.4 ± 0.2	57.1 ± 0.6	16.9 ± 1	77.3 ± 1.4	22.7 ± 1.4
	25	5.2 ± 0.7	13.1 ± 3.1	0.6 ± 0.3	70.1 ± 6	11 ± 2.3	76.2 ± 3.1	23.8 ± 3.1
	30	9.2 ± 3.3	12 ± 2.7	5 ± 1.9	71.1 ± 3.8	2.7 ± 1.2	80.5 ± 1.4	19.5 ± 1.4
	35	9.8 ± 5.4	11.7 ± 4.6	7.7 ± 2.1	69.1 ± 11	1.7 ± 0.5	82.6 ± 2.1	17.4 ± 2.1
	40	25.6 ± 6.9	4.2 ± 0.6	46 ± 8	24.2 ± 4.3	Tr.	89.7 ± 2.6	10.3 ± 2.6
DSM 2178	54	10.3 ± 2	7.4 ± 1.3	8.8 ± 1.3	40.4 ± 3	33.1 ± 3	87.6 ± 0.5	12.4 ± 0.5
	60	6 ± 6	16.3 ± 12.5	1.6 ± 3.2	19.4 ± 5.4	56.7 ± 16	86.3 ± 1.6	13.7 ± 1.6
	70	3.5 ± 0.7	8.4 ± 0.7	0.9 ± 0.5	24 ± 1.9	63.2 ± 3.3	92.3 ± 0.3	7.7 ± 0.3
	80	6.3 ± 0.8	9.9 ± 0.2	3 ± 2	31.4 ± 2	49.4 ± 2.9	96.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5
	84	4.4 ± 0.6	7.8 ± 1.9	3.5 ± 0.6	27 ± 2.2	57.3 ± 0.5	95.5 ± 0.6	4.5 ± 0.6

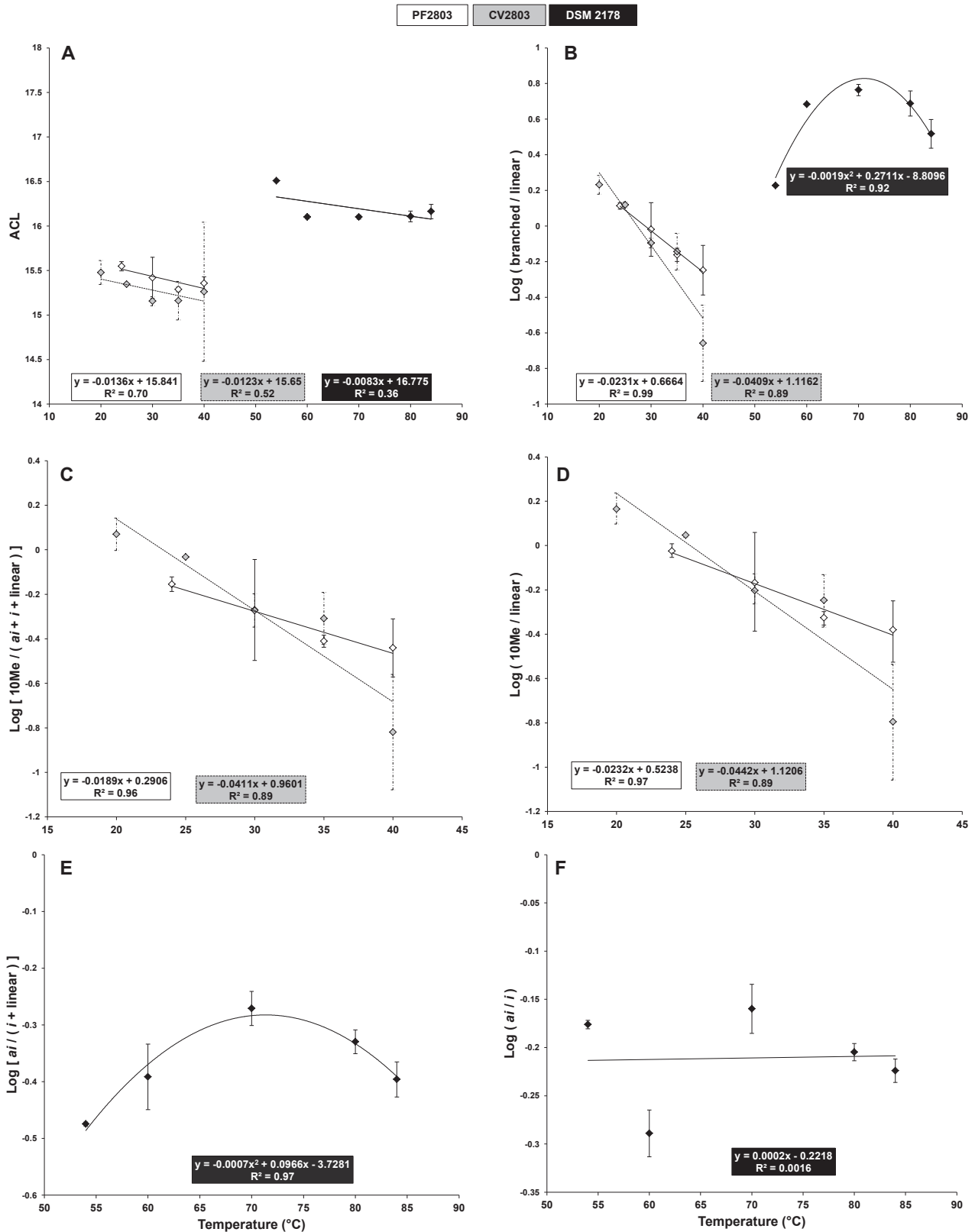


Figure 4.S1: Weighted ACL (A) and logarithm of the ratio of branched to linear structures (B) of FAs produced by strains PF2803, CV2803 and DSM 2178 as a function of growth temperature. Logarithm of the ratios of 10-Me to *anteiso*+*iso*+linear FAs (C) and of 10-Me to linear FAs (D) in strains PF2803 and CV2803 versus growth temperature. Logarithm of the ratios of *anteiso* to *iso*+linear FAs (E) of *anteiso* to *iso* FAs (F) in strain DSM 2178 versus growth temperature. Each data point is the mean of three independent cultures.

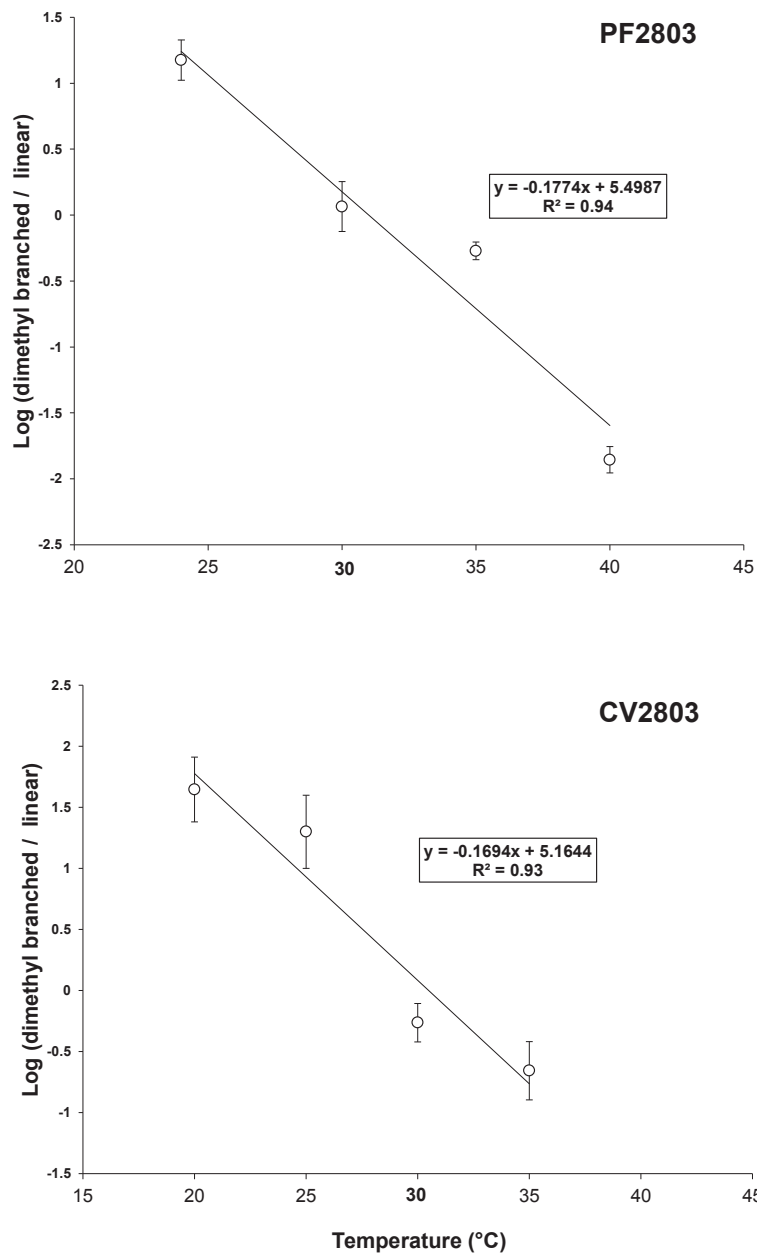


Figure 4.S2: Logarithm of the ratio of DAGs with two branched alkyl chains to linear DAGs in strains PF2803 and CV2803 versus growth temperature. Each data point is the mean of three independent cultures. Optimal growth temperatures are bolded.

**Chapitre 5 : Influence de la salinité et du pH
sur la composition lipidique de BSR mésophiles
synthétisant des éthers de glycérol**

Chapitre 5 :

Influence de la salinité et du pH sur la composition lipidique de BSR mésophiles synthétisant des éthers de glycérol

5.1. Introduction

Des variations de la salinité et du pH sont connues pour influencer la composition en lipides des membranes bactériennes (Bender et al., 1978 ; Russell, 1989, 1993). En conditions acides, les bactéries sont par exemple capables d'augmenter les proportions de leur glycérophospholipides (GPL) possédant des chaînes saturées ou présentant des motifs cyclopropaniques (Drici-Cachon et al., 1996 ; Beales et al., 2004). De même, lorsque la salinité du milieu de vie devient trop élevée, les bactéries augmentent les proportions des GPL linéaires (Russell, 1989). Les bactéries sont également capables de modifier la nature du groupement polaire de leur GPL dans des conditions de stress osmotique (Russell, 1989 ; Russell et al., 1995). Ainsi, les proportions des GPL avec un groupement polaire anionique (chargé négativement) vont augmenter par rapport au GPL zwitterioniques (électriquement neutre) dans des environnements fortement ionique et protonique, afin d'attirer les cations (Na^+ et H^+) et stabiliser la structure de la membrane (Russell, 1989 ; van de Vossenberg et al., 1999a ; Denich et al., 2003). Ces mécanismes d'adaptation des cellules bactériennes par modification du contenu des lipides membranaires (appelée adaptation homéovisqueuse) sont importants pour maintenir la fluidité, l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane en présence de perturbations externes, mais jouent également un rôle de contrôle des échanges d'ions ou de protons au travers de la membrane (perméabilité membranaire ; Sinensky et al., 1974 ; Ohno et al., 1979 ; Russell, 1984 ; Hazel and Williams, 1990 ; Sajbidor, 1997).

Ces mécanismes adaptatifs sont bien référencés chez les bactéries synthétisant des phospholipides constitués d'acides gras (AG) liés au glycérol par l'intermédiaire de liaisons esters (acylglycérols). Très peu d'informations sont en revanche disponibles concernant le rôle des éthers de glycérol (monoalkylglycérols/MAGE et dialkylglycérols/DAGE) dans l'adaptation des membranes bactériennes à des stress environnementaux comme des variations de salinité et du pH. Il est souvent considéré que les GPL étherifiés rendent la membrane moins perméable que les GPL estérifiés, et que la capacité

à synthétiser ce type de lipide reflète une adaptation à des environnements à forte charge ionique ou protonique (van de Vossenberg et al., 1998 ; Dawson et al., 2012). Une étude récente de la matière organique contenue dans divers échantillons de sols a démontré une relation entre les proportions de MAGE ramifiés en position *antéiso* et *iso* et le pH mesuré dans ces sols, suggérant une adaptation des populations bactériennes aux variations de pH par modification de leur composition en éthers de glycérol (Yang et al., 2015). Nous avons précédemment démontré que cette dernière peut être influencée par des modifications de la source de carbone et de la température (cf. Chapitres 3 et 4). Bien que le nombre de MAGE et de DAGE homologues biosynthétisés puisse varier de moins de 10 à plus de 50 selon la nature du substrat de croissance, il existe cependant un contrôle de la structure des éthers de glycérol [longueur moyenne des chaînes carbonées (ACL) et taux global de ramification] permettant de maintenir des propriétés membranaires optimales en réponse aux conditions de croissance changeantes (cf. Chapitre 3). De même, l'analyse des lipides hydrolysés de deux souches mésophiles ainsi que ceux d'une souche thermophile après croissance à différentes températures a démontré des modifications structurales des AGE (ACL, degré et type de ramification) en réponse à des variations de la température du milieu (cf. Chapitre 4). Les modifications du degré et de la position de ramification des AGE en fonction de la température de croissance étaient en accord avec les mécanismes d'adaptation à la température (par régulation de la fluidité membranaire) classiquement observés chez des bactéries synthétisant des acylglycérols. Ces résultats prometteurs ont suggéré un rôle des AGE similaire à celui des acylglycérols dans l'adaptation homéovisqueuse des membranes bactériennes en réponse aux stress environnementaux (cf. Chapitre 4).

Il est cependant connu que, chez les bactéries, différents paramètres physico-chimiques peuvent modifier de manière identique la composition en acylglycérols (Denich et al., 2003). Afin de mieux appréhender l'influence des variations des paramètres environnementaux sur la composition en AGE et le rôle de ces derniers dans l'adaptation membranaire, nous avons dans ce chapitre étudié les conséquences des variations de la salinité et du pH de croissance sur la composition qualitative et quantitative en AGE de deux bactéries sulfato-réductrice mésophiles.

5.2. Matériel et méthodes

Les souches de BSR Gram-négatives *D. alkenivorans* PF2803^T et *D. aliphaticivorans* CV2803^T ont été utilisées comme souches modèles pour étudier l'influence de la salinité et du pH sur la production en AG et en AGE. Les conditions de croissance de ces souches, ainsi que les techniques d'extraction et d'analyse des lipides cellulaires sont décrites dans le Chapitre 2. Les méthodes de calcul des indices structuraux ainsi que les tests statistiques appliqués sont également décrits dans le Chapitre 2. La quantité de chaque classe de lipide (AG, MAGE et DAGE) après hydrolyse acide des cultures a été rapportée à la densité optique (DO) en fin de phase exponentielle de croissance. Pour quantifier les lipides, nous avons préféré utiliser les mesures de DO par rapport aux concentrations en protéines qui sont susceptibles d'être influencées par des modifications de la salinité ou du pH (cf. Chapitre 1).

5.3. Résultats

5.3.1. Composition lipidique des souches PF2803 et CV2803 en condition optimale de croissance

La composition lipidique des souches *D. alkenivorans* PF2803 et *D. aliphaticivorans* CV2803 cultivées dans les conditions optimales de croissance a été décrite dans le Chapitre 4. Les proportions relatives des trois classes de lipides sont autour de 50% d'AG, 10% de MAGE et 40% de DAGE. A partir de l'octanoate comme seule source de carbone et d'énergie, les souches PF2803 et CV2803 biosynthétisent des AG, des MAGE et des DAGE avec des ramifications en position C-10 (10Me), *antéiso* et *iso* (Vinçon-Laugier et al., 2016 ; cf. Chapitres 3 et 4). Les deux souches forment entre 62-70% d'AGE ramifiés en position C-10, 11-12% d'*antéiso*, 6-7% d'*iso*, 10-16% de linéaires et 2-3% de di-ramifiés (cf. Chapitre 4).

5.3.2. Influence de la salinité et du pH sur la teneur en lipides totaux et la distribution des classes de lipides des souches PF2803 et CV2803

Dans cette section, nous avons évalué les modifications du contenu en lipides hydrolysés (AG, MAGE et DAGE) des souches PF2803 et CV2803 en fonction de la salinité et du pH.

Lorsque la concentration en sel du milieu varie, la quantité de lipides synthétisés par la souche

CV2803 n'est pas significativement modifiée et se maintient autour de 2,9 µg de lipides par unité de DO (Figure 5.1A). En revanche, pour la souche PF2803, une production significativement plus importante de lipides est observée dans certaines concentrations supra-optimales de NaCl (25 g/L et 45 g/L ; $p < 0,05$; Figure 5.1B). Pour les autres conditions sub- et supra-optimales, les modifications du contenu cellulaire de la souche PF2803 ne sont pas significatives ($p > 0,05$; Figure 5.1B). Par ailleurs, des variations du pH du milieu de culture ne semblent pas influencer de manière significative les teneurs en AG, MAGE et DAGE des deux souches ($p > 0,05$; Figures 5.1C-D).

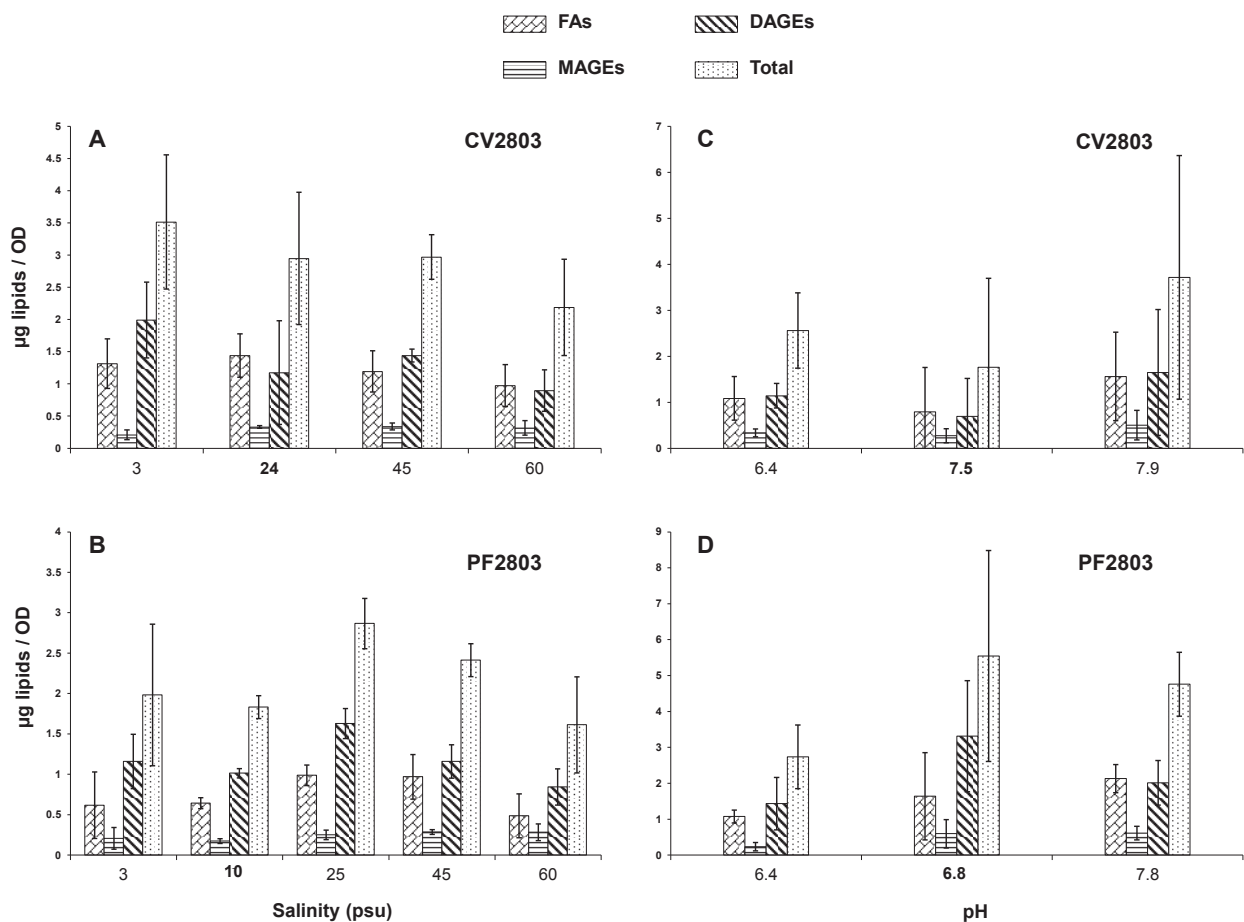


Figure 5.1 : Composition lipidique des souches PF2803 et CV2803 après croissance à différentes concentrations en NaCl (A et B) et différents pH (C et D). A, B, C et D représentent la quantité de lipides (µg) rapportée à une mesure de densité optique (DO) pour 1mL de culture en fin de phase exponentielle. Les conditions optimales de croissance sont en gras. Les données représentent la moyenne de trois réplicats ± écart-type.

Quelle que soit la concentration en NaCl ou le pH du milieu de croissance, les proportions relatives des trois classes de lipides dans les cellules restent similaires aux proportions observées pour les conditions optimales de croissance. Il est cependant important de considérer que ces proportions de lipides hydrolysés sont légèrement biaisées par une surestimation des proportions en AG membranaires,

qui sont présents dans les cellules non hydrolysées sous la forme de monoalkyl/monoacylglycérols (AAG), de diacylglycérols (DAG) et éventuellement d'AG libres. Ce biais dû au protocole analytique envisagé (analyse des lipides hydrolysés et non pas sous leur forme intacte) induit donc certainement une sous-estimation des proportions de MAGE et de DAGE dans les cellules.

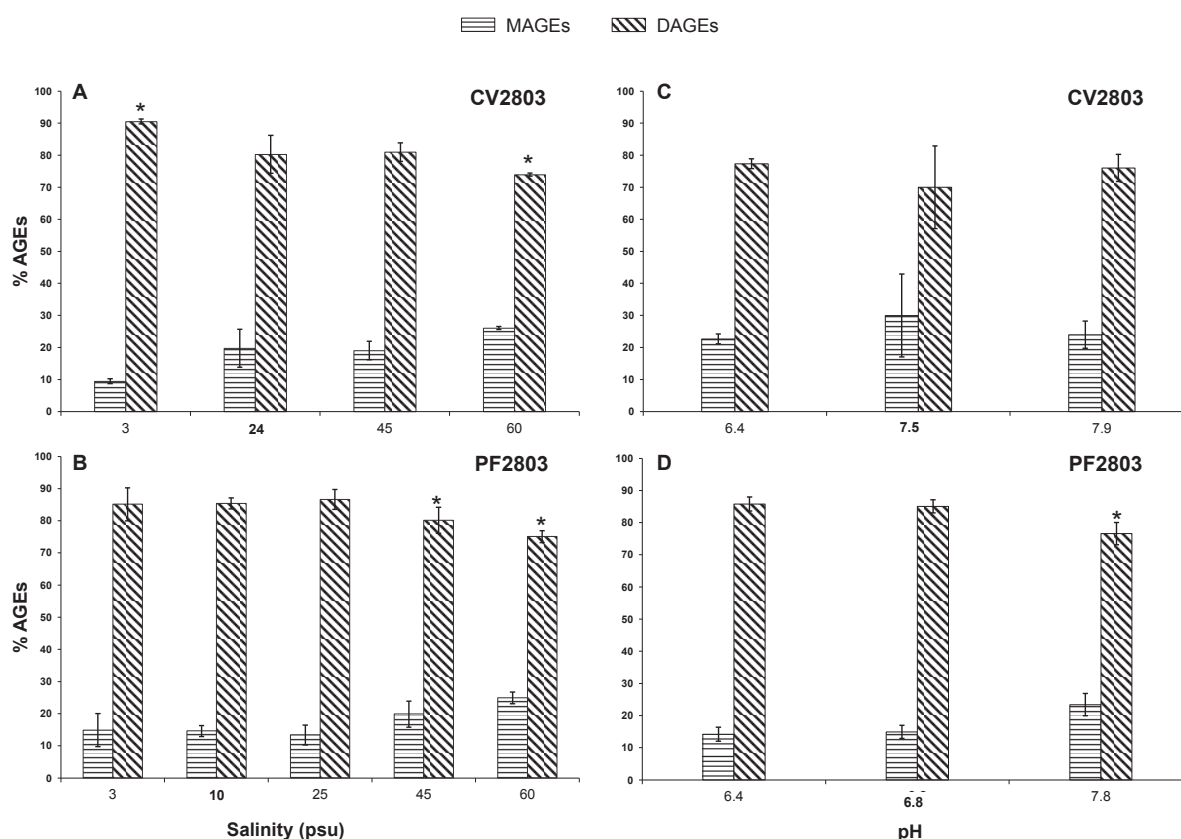


Figure 5.2 : Abondance relative (%) des MAGE et DAGE libérés après hydrolyse acide des cellules des souches CV2803 (A et C) et PF2803 (B et D) cultivées dans différentes conditions de concentration en NaCl et de pH. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport aux optimums de croissance sont marquées d'une *. Les valeurs en gras représentent les conditions optimales de croissance.

Concernant les éthers de lipides, les proportions relatives entre MAGE et DAGE dans les souches PF2803 et CV2803 ne varient pas de manière significative avec la concentration en NaCl et le pH du milieu de croissance (Figure 5.2). Pour les deux souches étudiées et pour l'ensemble des conditions de croissance testées, les proportions entre les deux classes d'éthers s'élèvent en moyenne à 20 % de MAGE et à 80% de DAGE (Figure 5.2). Cependant, des différences significatives entre les conditions optimales et certaines conditions sub- ou supra-optimales de croissance sont parfois observées (Figure 5.2). Ainsi, la souche CV2803 semble légèrement augmenter ou diminuer sa proportion de DAGE respectivement à 3 et 60 g/L de NaCl (Figure 5.2A), alors que chez la souche PF2803, les proportions en DAGE diminuent de 85 à environ 77% à 45 et 60 g/L de NaCl (Figure 5.2B). Pour cette même souche, une faible mais significative diminution de la proportion des DAGE apparait à pH supra-

optimal 7,8 (~76% ; **Figure 5.2D**). Enfin, au sein des MAGE, les proportions relatives des monoéthers avec une chaîne alkyle en position centrale *sn*-2 (2-*O*-MAGE) par rapport aux monoéthers en position externe *sn*-1 (1-*O*-MAGE) chez la souche PF2803 ne sont pas significativement modifiées par des variations de salinité (**Table 5.S1**). En revanche, une légère diminution de ce rapport est observée chez la souche CV2803 lorsque la salinité augmente (**Table 5.S1**). Enfin, le pH n'influence pas les proportions relatives des 2-*O*-MAGE par rapport au 1-*O*-MAGE (résultats non montrés).

5.3.3. Modifications structurales des lipides en fonction de la salinité et du pH

Il a été démontré dans le chapitre précédent que des variations de température entraînent des modifications structurales de l'ensemble des AG, MAGE et DAGE (longueur moyenne des chaînes, taux et type de ramification ; cf. Chapitre 4). Dans cette section, nous avons donc évalué si des variations de pH ou de salinité du milieu de croissance des souches PF2803 et CV2803 peuvent influencer la composition structurale de ces mêmes classes de lipides (AG, MAGE et DAGE).

5.3.3.1. Modifications de la longueur de chaîne et du taux de ramification des lipides en fonction de la salinité

L'ACL des AG, MAGE et DAGE a été déterminée pour les deux souches modèles cultivées à différentes concentrations de NaCl (**Figures 5.3A-B** et **5.S1A**). Les valeurs d'ACL des MAGE et des DAGE de la souche CV2803 ne sont pas significativement modifiées entre 3 et 45 g/L de NaCl ($p > 0,05$; **Figure 5.3A**), mais elles diminuent entre 45 et 60 g/L ($p < 0,05$; **Figure 5.3A**). En revanche, chez la souche PF2803, les valeurs d'ACL calculées pour les MAGE ou les DAGE sont négativement et linéairement corrélées avec la salinité ($R^2 \sim 0,95$; **Figure 5.3B**). Bien que les pentes des régressions linéaires obtenues pour les deux classes d'AGE chez cette même souche présentent des valeurs assez proches (~ -0.0073 pour les MAGE; ~ -0.0056 pour les DAGE ; **Figure 5.3B**) elles sont significativement différentes (analyse ANCOVA, $p < 0,05$). Enfin, les valeurs d'ACL des AG sont stables autour de 15,3 et 15,1 respectivement pour les souches PF2803 et CV2803 (**Figure 5.S1A**) ; une modification de la salinité n'engendre donc pas de modification significative de la longueur moyenne des AG (**Figure 5.S1A**).

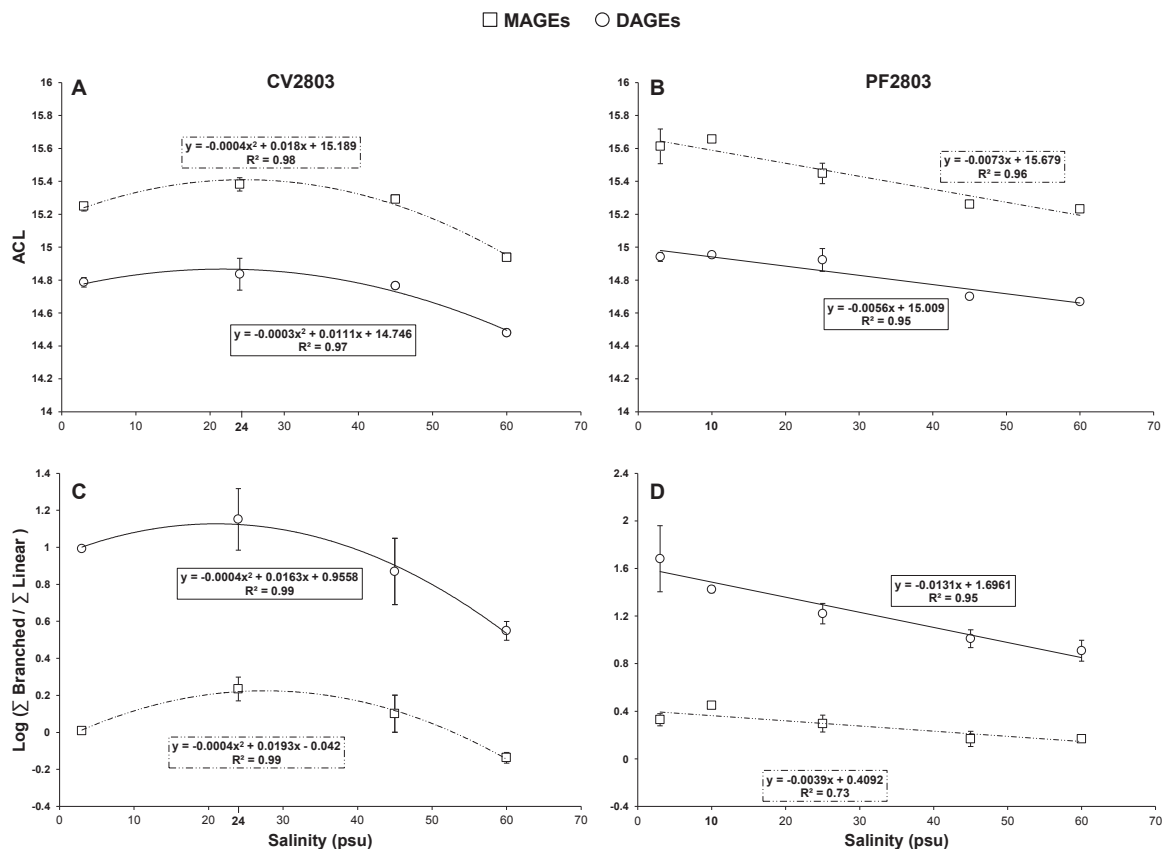


Figure 5.3 : Moyennes pondérées d'ACL (A et B) et logarithme des ratios ramifiés/linéaires (C et D) déterminés pour les MAGE et les DAGE synthétisés par les souches CV2803 et PF2803 après croissance à différentes concentrations en NaCl. Les concentrations en gras représentent les conditions optimales de croissance.

Le taux global de ramification (rapport de tous les composés ramifiés par rapport à tous les composés linéaires) des trois classes de lipides a été déterminé pour chacune des souches et chaque condition de salinité (Figures 5.3C-D et 5.S1B). Pour la souche CV2803, le taux de ramification des MAGE et DAGE n'est pas significativement modifié entre 3 et 45 g/L ($p > 0,05$; Figure 5.3C) mais il diminue entre 45 et 60 g/L pour les deux classes d'AGE, évoluant de 0,1 à -0,14 et de 0,87 à 0,55 respectivement pour les MAGE et DAGE ($p > 0,05$; Figure 5.3C). En revanche, comme pour l'ACL, le taux de ramification des MAGE et des DAGE de la souche PF2803 est négativement et linéairement corrélé avec la concentration en NaCl du milieu ($0,73 < R^2 < 0,95$; Figure 5.3D). Les pentes des régressions linéaires observées pour les MAGE et les DAGE sont significativement différentes (test ANCOVA, $p < 0,05$; Figure 5.3D). Pour les deux souches, une corrélation du taux de ramification des AG avec la salinité du milieu de culture a également été observée (Figure 5.S1B).

5.3.3.2. Modifications de la longueur de chaîne et du taux de ramification des lipides en fonction du pH

L'ACL ainsi que le taux de ramification des AGE totaux (MAGE + DAGE) et des AG ont été déterminés pour les souches PF2803 et CV2803 après croissance à différents pH (Figures 5.4, 5.S1 et 5.S2). Pour les deux souches, aucune modification structurale des AGE n'a été observée quel que soit le pH considéré (Figure 5.4). Ce même constat a été fait en différenciant les MAGE et les DAGE (Figure 5.S2). Les légères différences de valeurs des deux indices structuraux mesurés dans les différentes conditions ne sont pas significatives ($p > 0,05$; Figures 5.4 et 5.S2).

Ces mêmes observations ont été faites pour les AG (Figures 5.S1E-F) dont les valeurs d'ACL et de taux de ramification sont restées stables pour tous les pH testés ($p > 0,05$; Figures 5.S1E-F).

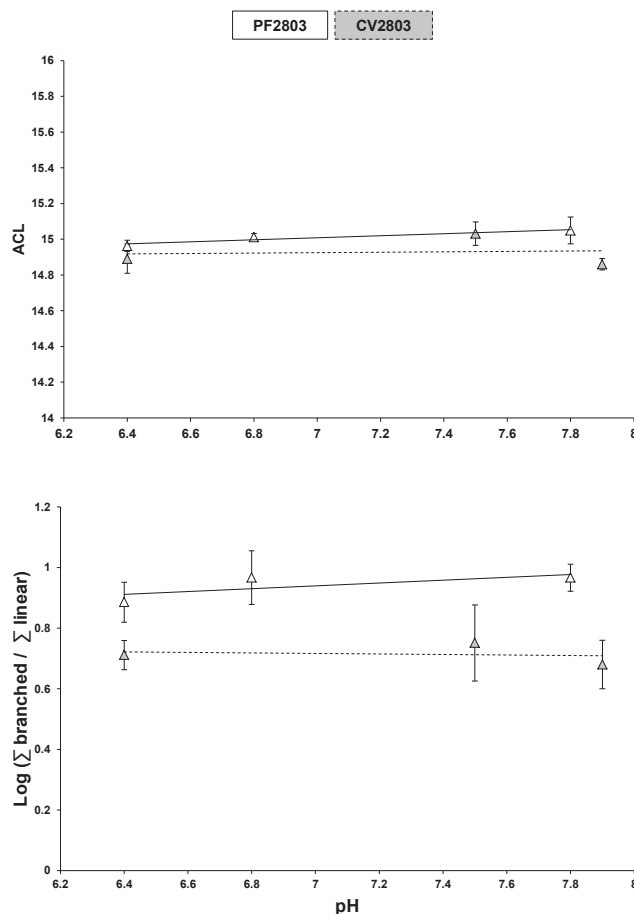


Figure 5.4 : Moyennes pondérées d'ACL (A) et logarithme des ratios ramifiés/linéaires (B) mesurés pour les AGE (MAGE + DAGE) synthétisés par les souches CV2803 et PF2803 après croissance à différents pH.

5.3.3.3. Variations des proportions de certains composés ramifiés avec la salinité

Les homologues majoritaires d'AGE synthétisés par les souches CV2803 et PF2803 possèdent une ramification en position C-10 (~ 68% des AGE totaux ; **Figure 5.5**). Pour les deux souches, une diminution significative des proportions de MAGE ramifiés en C-10 est observée à 3 et à 60 g/L de NaCl (**Figures 5.5A-B**). En revanche, les proportions de DAGE mono-ramifiés en C-10 diminuent uniquement à 3 g/L (**Figures 5.5C-D**). En parallèle, une diminution progressive des proportions d'AGE (MAGE + DAGE) mono-ramifiés en position *antéiso* est observée entre 3 et 60 g/L de NaCl, passant respectivement de 20 à 5% et de 43 à 7% pour les souches CV2803 et PF2803 (**Figure 5.5**). Cette diminution semble être compensée par l'augmentation progressive des proportions en AGE linéaires qui passent respectivement de 14 à 32 % et de 7 à 19 % (**Figure 5.5**).

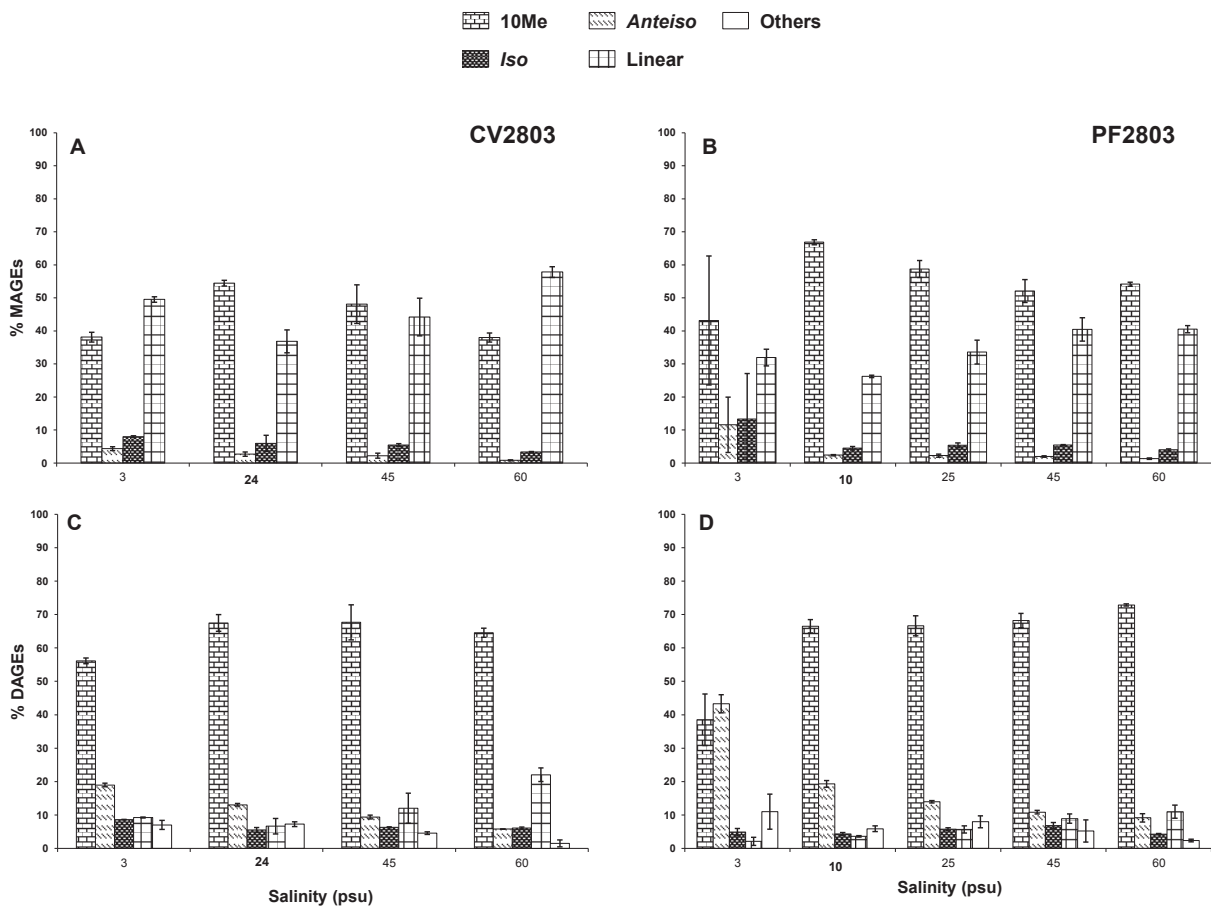


Figure 5.5 : Abondance relative (%) des MAGE linéaires et mono-ramifiés en position 10Me, *antéiso* ou *iso* (A et B) et des DAGE linéaires, di-ramifiés (others) et mono-ramifiés en position 10Me, *antéiso* ou *iso* (C et D), libérés par hydrolyse acide des cellules des souches CV2803 et PF2803 en fonction de la concentration en NaCl. Les concentrations en gras indiquent les conditions optimales de croissance.

Cette augmentation des proportions des structures linéaires avec la salinité concerne particulièrement les DAGE (Figures 5.5C-D), et n'est pas observée pour les MAGE (Figures 5.5A-B). La proportion des AGE ramifiés en position *iso* se maintient autour d'une valeur moyenne de 6% pour les deux souches et quelle que soit la salinité considérée (Figure 5.5). Enfin, une légère diminution de la proportion des DAGE di-ramifiés (i.e., possédant un groupement méthyle sur chacune des chaînes alkyles) est observée quand la salinité augmente ('Others' dans les Figures 5.5C-D ; Tableau 5.S1). Le rapport des DAGE di-ramifiés / DAGE linéaires apparaît négativement corrélé avec la concentration en NaCl ($R^2 = 0,70$ et $0,94$ respectivement pour les souches CV2803 et PF2803 ; Figure 5.S3).

Les proportions relatives de MAGE et de DAGE mono-ramifiés en position *antéiso* par rapport aux autres structures synthétisées (linéaires ou ramifiés en positions C-10 et *iso*, en excluant les DAGE di-ramifiés) mettent en évidence des corrélations linéaires avec la salinité du milieu pour les deux souches ($0,60 < R^2 < 0,98$; Figures 5.6A-B). Pour chaque souche, les pentes de ces régressions linéaires sont statistiquement identiques entre les MAGE et les DAGE (test ANCOVA, $p > 0,57$ et $p > 0,61$ respectivement pour les souches CV2803 et PF2803 ; $p_{\text{same}} < 0,05$). Ce type de corrélation est également observé pour les AG ($0,68 < R^2 < 0,99$; Figure 5.S1C). Les proportions des AG, MAGE et DAGE mono-ramifiés en position *antéiso* apparaissent particulièrement anti-corrélées aux homologues mono-ramifiés en position *iso* comme en témoignent la qualité des régressions linéaires obtenues entre le rapport *anteiso/iso* et la salinité du milieu pour les deux souches ($0,72 < R^2 < 0,97$; Figures 5.6C-D et 5.S1D). Dans ce cas, les valeurs de pentes des régressions linéaires obtenues pour chaque classe d'AGE sont statistiquement identiques entre les MAGE et les DAGE (test ANCOVA, $p > 0,44$ et $p > 0,06$ respectivement pour les souches CV2803 et PF2803 ; $p_{\text{same}} < 0,05$). En revanche, les proportions relatives des MAGE et DAGE mono-ramifiés en position C-10 par rapport aux autres structures synthétisées par les deux souches ne sont pas significativement différentes d'une salinité de croissance à une autre ($p > 0,05$; Figures 5.6E-F).

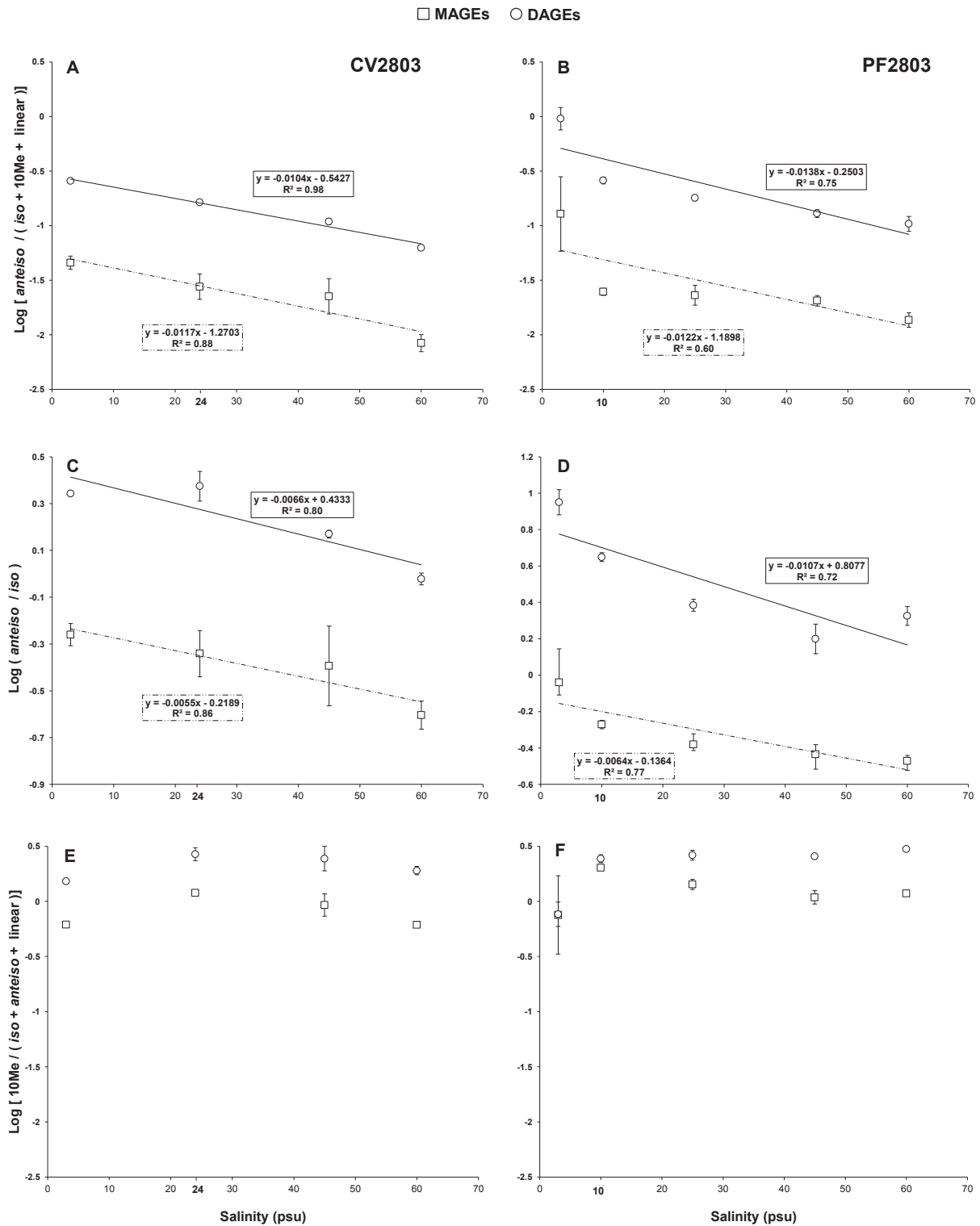


Figure 5.6 : A et B) Logarithme du ratio *anteiso* / (linéaires + 10Me + *iso*) des MAGE et DAGE (mono-ramifiés) dans les souches PF2803 et CV2803 en fonction de la salinité. C et D) Logarithme du ratio *anteiso* / *iso* des MAGE et DAGE (mono-ramifiés) des souches PF2803 et CV2803 en fonction de la salinité. E et F) Logarithme du ratio 10Me / (linéaires + *anteiso* + *iso*) des MAGE et DAGE (mono-ramifiés) des souches PF2803 et CV2803 en fonction de la salinité. Les concentrations en NaCl en gras représentent les conditions optimales de croissance.

5.3.3.4. Absence de variations des proportions des composés ramifiés en fonction du pH

Pour les deux souches, les proportions relatives des différents AGE ramifiés et linéaires sont restées similaires aux conditions optimales de croissance pour tous les pH testés (Figure 5.7). De même, les proportions des AG ramifiés en position *antéiso* par rapport aux autres structures synthétisées n'ont pas montré de différence significative d'une condition de pH à une autre ($p > 0,05$; Figures 5.S1G-H).

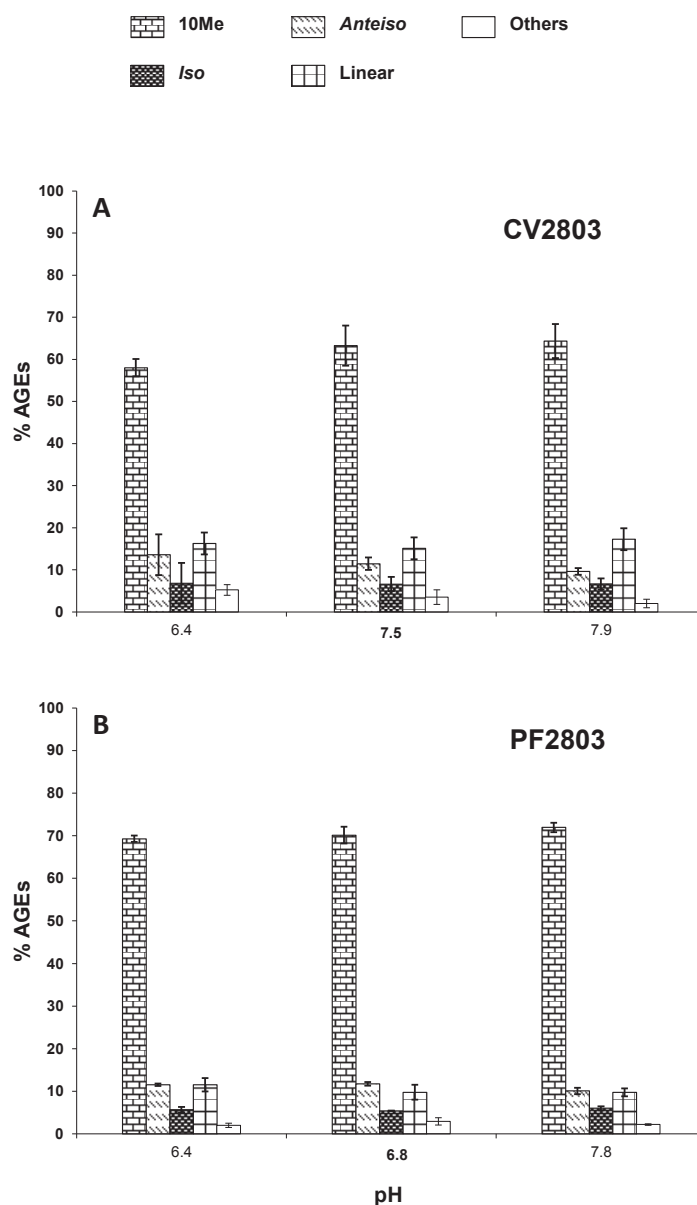


Figure 5.7 : Abondance relative (%) des AGE (MAGE+DAGE) linéaires et mono-ramifiés en position C-10, *antéiso* ou *iso*, et des DAGE di-ramifiés (others = DAGE avec deux chaînes alkyles mono-ramifiées) libérés par hydrolyse acide des cellules des souches CV2803 (A) et PF2803 (B), en fonction du pH. Les valeurs de pH en gras représentent les conditions optimales de croissance.

5.4. Discussion

5.4.1. Stabilité de la quantité et de la distribution des lipides totaux en réponse à des variations de salinité et du pH

Les résultats de cette étude démontrent que des variations de la concentration en NaCl et du pH du milieu de croissance ne modifient pas la quantité et les proportions des différentes classes de lipides synthétisés par les souches PF2803 et CV2803. En revanche, une diminution des quantités totales de lipides cellulaires avait été observée dans des conditions sub- et supra-optimales de température, et avait été interprétée par une diminution de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la synthèse des lipides membranaires. S'il est bien référencé dans la littérature que des variations de salinité et de pH du milieu de vie peuvent augmenter ou diminuer l'activité de différentes enzymes bactériennes (e.g. [McDermid et al., 1988](#) ; [Oren, 2008](#)), ceci ne semble pas être le cas dans cette étude. Il serait possible que nos deux souches incorporent de petits osmolytes organiques pendant la phase de stress osmotique car cette stratégie adaptative permet à différents micro-organismes de maintenir l'activité enzymatique et d'empêcher la dénaturation des protéines ([Brown et al., 1978](#) ; [Burg et Ferraris, 2008](#)). Des modifications de la quantité totale de lipides cellulaires en réponse à des variations du pH et de la salinité ont été notamment décrites chez certaines algues halophiles du genre *Dunaliella*, pour lesquelles une production beaucoup plus importante d'AG cellulaires a été observée dans des conditions de stress hyperosmotique ([Mixson Byrd et al., 2017](#)). Cette hausse de production a été expliquée par une stratégie adaptative d'accumulation plus importante d'AG utilisés ensuite comme source d'énergie durant la période de stress osmotique ([Mixson Byrd et al., 2017](#)). Au contraire, l'étude de différentes espèces de champignons par [Sajbidor en 1994](#) a démontré une accumulation plus faible de lipides lorsque le milieu de croissance est chargé en sel. Ce type d'adaptation par accumulation de lipides ne semble pas être employé par nos souches bactériennes car les plus fortes concentrations en NaCl (60 g/L) n'ont pas engendré une production accrue de lipides (AG + AGE) par rapport aux conditions optimales.

Parmi les éthers de lipides, de faibles modifications des proportions de MAGE et de DAGE ont été observées en faisant varier la salinité ou le pH du milieu de croissance. Chez les Archaea capables de synthétiser des diéthers de glycérol (archaeol) et des tétraéthers de glycérol (GDGT) isopréniques, il a été constaté que ces derniers sont préférentiellement synthétisés dans des milieux où la charge ionique est forte (Na^+ et H^+), du fait de leur structure transmembranaire mais aussi du plus grand nombre de

liaison éthers présentes, qui confèrent une plus grande imperméabilité à la membrane (Elferink et al., 1994 ; Dawson et al., 2012 ; Turich et al., 2011). De manière générale, les lipides estérifiés rendent la membrane beaucoup plus perméable que ceux étherifiés (van de Vossenberg et al., 1998). Sur la base de ces précédents constats, il aurait été cohérent dans notre étude d'observer des proportions plus importantes de diéthers à des concentrations en sels et à des pH plus élevés que les conditions optimales. Or, la synthèse des diéthers a été légèrement plus faible après croissance à des salinités et des pH élevés. Un autre mécanisme d'adaptation aux environnements à forte charge ionique que la régulation des proportions des lipides étherifiés par rapport aux lipides estérifiés semble donc être impliqué dans le cas de nos deux souches modèles.

Il faut toutefois souligner que nous avons étudié uniquement les lipides hydrolysés et non les phospholipides intacts. Or, les têtes polaires peuvent être de natures différentes pour plusieurs composés homologues et jouer un rôle important dans l'adaptation membranaire. Les proportions des différents groupements polaires peuvent être modifiées en réponse à des variations de salinité ou de pH du milieu (Hazel et Williams., 1990 ; Russell et al., 1995). Lorsque les bactéries sont soumises à des environnements où la charge ionique est élevée, certaines sont capables d'accroître la charge négative de leur membrane afin d'attirer les cations (Na^+ et H^+) et stabiliser leur structure membranaire (van de Vossenberg et al., 1999a ; Denich et al., 2003). Ainsi, de manière générale, la proportion de phospholipides anioniques (e.g. phosphatidylglycérols PG et cardiolipines CL) augmente et celle de phospholipides zwitterioniques (e.g. phosphatidyléthanolamines PE et phosphatidylcholines PC) diminue lorsque les bactéries sont cultivées dans des milieux de salinité croissante (Adams et al., 1990 ; Russell et al., 1995 ; Romantsov et al., 2009). Par exemple, chez les bactéries Gram-négatives, il est fréquemment observé une augmentation des proportions des PG (anionique) par rapport aux PE (zwitterioniques) avec une augmentation de la salinité du milieu (Adams et al., 1990 ; Hazel et Williams, 1990 ; Russell et al., 1989 ; Russell et al., 1995). Dans le cas de variations du pH, des phospholipides zwitterioniques électriquement neutres pouvant être à la fois en équilibre avec des ions H^+ et OH^- (tels que des PC et des PE) sont préférentiellement synthétisés (Hazel et and Williams, 1990 ; Petelska and Figaszewski, 2000). Outre les modifications des têtes polaires des phospholipides, d'autres mécanismes d'osmorégulation existent, faisant intervenir une modification de la composition intracellulaire des bactéries. Les principaux mécanismes impliquent l'incorporation d'osmolytes organiques compatibles tel que la proline, la glycine bêtaïne, et la glutamine ou l'accumulation de

solutés inorganiques comme du Na⁺, K⁺ et Mg²⁺ (Russell et al., 1995 ; Zahran, 1997 ; Romantsov et al., 2009 ; Burg et Ferraris, 2008 ; Bergmann et al., 2013). Les approches et méthodes utilisées dans cette étude n'ont pas permis d'analyser les phospholipides intacts ni les différentes protéines membranaires, qui nécessiteraient d'autres investigations.

5.4.2. Modifications de la structure des chaînes carbonées des AG et des AGE en réponse à des variations de salinité

En plus de modifications de la nature des groupements polaires des phospholipides et de l'incorporation dans les cellules de différents solutés organiques et inorganiques, les bactéries sont également capables de modifier la structure des chaînes carbonées phospholipidiques lorsque la concentration en sel du milieu varie (Sajbidor, 1997 ; Denich et al., 2003). La croissance dans des environnements chargés en sel entraîne généralement l'empaquetage des lipides au sein de la membrane, réduisant ainsi sa fluidité et sa perméabilité ionique (Nichols et al., 2000). Ces adaptations à des environnements hypersalés consistent souvent à réduire les proportions des acides gras à courtes chaînes carbonées et/ou insaturés et/ou ramifiés, et à augmenter les proportions des chaînes linéaires plus longues, saturées et/ou possédant des motifs cyclopropaniques (McGarrity et al., 1975 ; Tunblad-Johansson et al., 1987 ; Sajbidor et al., 1994 ; Sajbidor, 1997 ; Chihib et al., 2005 ; Turk et al., 2007). Ces adaptations physiologiques à des stress osmotiques permettent de maintenir le rôle de la membrane en tant que barrière ionique par réduction de la perméabilité (Chihib et al., 2005).

Dans cette étude, nous avons observé des modifications structurales importantes des chaînes lipidiques (AG et AGE) en relation avec la salinité du milieu de croissance. La longueur de chaîne moyenne (ACL) des AG et des AGE diminue progressivement en réponse à une augmentation des concentrations en NaCl. Une diminution de l'ACL tend à rendre la membrane cytoplasmique plus fluide et beaucoup plus perméable, ce qui ne semble pas ici être adapté à des conditions supra-optimales de salinité (Suutari and Laakso et al., 1994 ; Denich et al., 2003 ; Mykytczuk et al., 2007). Toutefois, les modifications structurales associées à des changements environnementaux ne sont pas universelles chez les bactéries et d'autres mécanismes adaptatifs peuvent être impliqués et prévaloir sur des modifications de la longueur des chaînes (Russell and Fukunaga, 1990 ; Freeze et al., 2008). Parmi ces mécanismes, des modifications des taux d'insaturation et de ramification sont souvent impliquées (Hazel and Williams, 1990 ; Turk et al., 2007 ; Freeze et al., 2008). Les souches CV2803 et PF2803

sont capables de synthétiser des 1-*O*-MAGE insaturés, mais ceux-ci n'ont été identifiés qu'à l'état de trace dans nos cultures. Ces résultats indiquent donc que le taux d'insaturation des lipides n'est pas impliqué dans la régulation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane cellulaire pour ces deux souches. En revanche, le taux de ramification des AG et des AGE a montré une tendance à la diminution lorsque la salinité du milieu augmente. L'augmentation des proportions d'AG et d'AGE saturés linéaires après croissance en conditions supra-optimales de salinité indiquerait une rigidification et une diminution de la perméabilité ionique de la membrane (Ohno et al., 1979 ; Suutari and Laakso, 1994 ; Chihib et al., 2005 ; Poger et al., 2014).

Nous avons également observé une modification de la proportion des AGE *antéiso* par rapport aux autres structures d'AGE, ainsi qu'une corrélation négative entre le rapport des AGE *antéiso/iso* et la salinité. Une étude récente a démontré que la position du groupement méthyle le long des chaînes de GPL bactériens a une influence importante sur la fluidité membranaire (Poger et al., 2014). Plus les ramifications sont situées en milieu de chaîne des GPL, plus il y a d'espace entre les lipides membranaires et plus l'agencement des lipides entre eux est désorganisé, augmentant ainsi la fluidité de la membrane et indirectement sa perméabilité (Poger et al., 2014). Cette étude a également démontré que les GPL ramifiés en position *iso* ont des propriétés physiques très proches de leurs homologues linéaires, et permettent donc de réduire la fluidité membranaire (Poger et al., 2014). Il est donc cohérent d'observer dans notre étude une diminution des AGE ramifiés en position *antéiso* compensée par une augmentation des AGE linéaires et ramifiés en position *iso* lorsque la concentration en NaCl du milieu augmente. Cependant, il est beaucoup plus surprenant de ne pas observer de modification des proportions des AGE ramifiés en C-10, possédant donc un groupement méthyle beaucoup plus central. En effet, les proportions de ces derniers sont fortement modifiées avec des variations de température car ils permettent une régulation de la fluidité membranaire plus efficace que des modifications des AGE *antéiso* (Poger et al., 2014 ; cf. Chapitre 4). Il serait donc possible que, en réponse à des variations de salinité, nos souches bactériennes ne modifient pas les proportions des AGE ramifiés en C-10 afin de ne pas altérer la fluidité membranaire, et que seule la régulation des AGE ramifiés en position *antéiso* leur permette d'ajuster la perméabilité de la membrane face au stress osmotique.

5.4.3. Absence de modifications structurales des lipides des souches PF2803 et CV2803 avec des variations du pH

Les bactéries sont capables de s'adapter au pH de leur milieu de vie et ainsi de survivre aux environnements acides ou basiques en modifiant la structure des chaînes des acylglycérols (De Rosa et al., 1974 ; Turk et al., 2007). Cependant, les changements structuraux associés aux variations du pH ne sont pas systématiquement identiques d'une espèce bactérienne à une autre. Il a été observé chez *Escherichia coli* et chez certaines bactéries acidophiles qu'une diminution du pH du milieu de croissance entraîne une augmentation des proportions relatives des acylglycérols possédant des chaînes carbonées saturées et linéaires, alors que chez d'autres espèces également acidophiles, une diminution du pH induit une augmentation des proportions de ces mêmes classes de lipides (Brown et al., 1997 ; Yuk and Marshall, 2004 ; Mykytczuk et al., 2010). Des études sur l'adaptation à un pH bas de bactéries aciduriques ont montré que les souches modifient leur composition membranaire en augmentant cette fois-ci la quantité d'acides gras à longues chaînes mono-insaturées (Fozo et al., 2004). A faible pH, de nombreuses bactéries dont *E. coli* synthétisent préférentiellement des AG cyclopropaniques, composés qui se sont avérés essentiels à la survie en milieu acide (Drici-Cachon et al., 1996 ; Brown et al., 1997 ; Chang and Cronan, 1999 ; Beales, 2004 ; Fozo et al., 2004). Enfin, chez certaines bactéries acidophiles et alcalinophiles, aucune variation structurale des lipides membranaires n'a été observée avec des modifications du pH du milieu de croissance (van de Vossenberg et al., 1999b).

Parmi les bactéries capables de synthétiser des éthers de glycérol, certaines acidophiles modifient leur composition lipidique en augmentant à bas pH les proportions des tétraéthers de glycérol ramifiés (brGDGT) afin de diminuer la perméabilité de leur membrane (Macalady et al., 2004). Dans des extraits lipidiques d'échantillons de sol, il a été observé une diminution du nombre de cycle pentyle dans des brGDGT (probablement synthétisés par des communautés microbiennes acidophiles) avec une diminution du pH (Weijers et al., 2007). Les cycles pentyles contenus dans les brGDGT rendent la membrane plus perméable aux protons (Nagle and Morowitz, 1978 ; Driessen et al., 1996). Ainsi l'augmentation des proportions des brGDGT possédant des cycles (mais aussi du nombre de cycles de ces composés) rend la membrane plus rigide et moins perméable et serait donc liée à une adaptation de ces bactéries à des pH faibles (Weijers et al., 2007). Récemment, Yang et al. (2015) ont observé une bonne corrélation ($R^2 = 0,62$) entre le rapport des proportions des MAGE ramifiés

en position *antéiso* et *iso* et le pH de divers sols. Cette observation reflète une possible adaptation bactérienne aux variations de pH par modifications des proportions des MAGE ramifiés. Notre étude démontre cependant l'absence de changements structuraux (ACL et taux de ramification) des MAGE, des DAGE et des AG quel que soit le pH considéré, pour les deux souches PF2803 et CV2803. Il convient toutefois de noter que ces bactéries évoluent dans des milieux marins, et non dans des sols. Ceci pourrait indiquer des réponses physiologiques différentes entre les espèces bactériennes capables de synthétiser des AGE en milieu aquatique, et celles se développant dans les sols. D'autres mécanismes adaptatifs (cités dans le paragraphe 5.4.1) pourraient prévaloir sur des modifications structurales des chaînes des AGE et des AG, telles que des variations de la nature des groupements polaires des phospholipides en fonction du pH, mais d'autres types d'analyse sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. De plus, les modifications membranaires engendrées chez les bactéries par des variations du pH sont classiquement observées sur de larges intervalles de pH allant de 1 à 9. Il est donc possible que l'intervalle de pH de croissance des deux souches modèles de cette étude soit trop restreint (~ intervalle compris entre 6 et 8) pour nécessiter ou observer une adaptation par modification du contenu lipidique.

5.4.4. Rôle des éthers lipidiques et utilité de ces lipides pour les études (paléo)environnementales

Au cours des dernières années, l'analyse de la matière organique contenue dans divers échantillons naturels a révélé le caractère ubiquiste des AGE bactériens dans l'environnement. Les AGE ont été identifiés à la fois dans des environnements particuliers (sources hydrothermales, volcans de boue et suintements froids ; Zeng et al., 1992 ; Orphan et al., 2001 ; Pancost et al., 2001 ; Elvert et al., 2005 ; Kaur et al., 2008 ; Bradley et al., 2009) et dans des environnements plus classiques (sédiments lacustres et marins, colonne d'eau océanique, rivières, sols (Oppermann et al., 2010 ; Hernandez-Sanchez et al., 2014 ; Yang et al., 2015 ; Wang and Xu, 2016). L'ubiquité des AGE et leur résistance à la diagénèse (Saito et al., 2013) confèrent un intérêt particulier pour ces lipides membranaires dont il est possible d'envisager l'utilisation comme indicateurs de conditions environnementales actuelles ou passées.

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré que les AGE, au même titre que les acylglycérols, participent à l'adaptation homeovisqueuse des membranes bactériennes en réponse

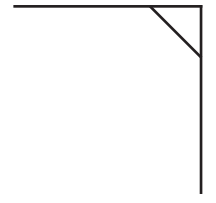
à des stress environnementaux. Nous avons notamment montré que les deux souches mésophiles PF2803 et CV2803 modifient la longueur moyenne des chaînes et le taux de ramification des AGE, mais aussi les proportions des composés ramifiés en position C-10, en réponse à des variations de température, indiquant un rôle certain de ces lipides dans la régulation de la fluidité membranaire (cf. Chapitre 4). L'étude de ces mêmes souches cultivées à différentes concentrations en NaCl montre ici des modifications structurales des chaînes alkyles des AGE qui, d'après la littérature, sont en accord avec des mécanismes de régulation de la perméabilité membranaire. Ces nouveaux résultats confirment le rôle de ces lipides dans l'adaptation des membranes bactériennes mais indiquent des réponses spécifiques à des modifications de salinité, pouvant être découplées de l'effet de la température. Il est donc envisageable d'exploiter ces réponses physiologiques spécifiques enregistrées par les AGE en les utilisant comme indicateurs de variations de conditions de salinité.

Nous avons observé que le taux global de ramification des AGE est linéairement et négativement corrélé avec la salinité de croissance. Cependant, ce taux de ramification diminue de façon similaire lorsque la température de croissance augmente (cf. **Figure 4.2** Chapitre 4). Le taux global de ramification ne peut donc être envisagé comme indicateur de variations de température ou de salinité dans le milieu naturel, lorsque ces deux paramètres sont susceptibles de varier. En revanche, nous avons mis en évidence de très bonnes corrélations entre le rapport des AGE ramifiés en position *antéiso* par rapport autres structures synthétisées ($0,60 < R^2 < 0,98$), notamment les AGE ramifiés en position *iso* ($0,72 < R^2 < 0,97$), et la salinité du milieu. Il est intéressant de noter que les proportions des AGE *antéiso* ne sont pas modifiées en réponse à des variations de température (cf. **Figure 4.3** Chapitre 4). Inversement, la proportion des AGE ramifiés en position C-10, qui est linéairement corrélée avec la température de croissance ($0,81 < R^2 < 0,98$; cf. **Figure 4.4** ; Chapitre 4), ne varie quasi pas avec la salinité du milieu de croissance. Ainsi, nous mettons en évidence à travers nos différentes études, deux rapports indépendants et potentiellement utiles pour retracer des variations de conditions environnementales, l'un basé sur les proportions relatives des AGE ramifiés en C-10 et l'autre sur les composés ramifiés en *antéiso*, corrélés respectivement avec la température ou la salinité du milieu. Le rapport des DAGE di-ramifiés par rapport aux homologues linéaires qui est corrélé avec la température ($R^2 \sim 0,94$; cf. **Figure 4.S2** ; Chapitre 4), l'est aussi avec la salinité de croissance. Enfin, nous n'avons pas observé d'influence du pH de croissance des souches PF2803 et CV2803 sur la structure des AGE, malgré l'identification dans le milieu naturel d'une relation entre le pH des sols

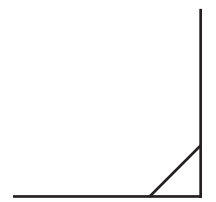
et le rapport des MAGE *antéiso/iso* (Yang et al., 2015).

Très peu de proxys organiques existent à ce jour pour estimer les paléosalinités, et ceux proposés sont souvent influencés par d'autres facteurs biologiques ou sont limités à certains types d'environnements. En effet, il a été mis en évidence une relation entre la salinité et la composition isotopique en hydrogène de l'eau et des alcénones (cf. paragraphe 1.3.3.2 Chapitre 1; Van der Meer et al., 2007 ; Sachse et Sachs, 2008), mais le fractionnement isotopique de l'hydrogène est également associé à la biosynthèse des alcénones (Schwab et Sachs, 2009) et peut être influencé par la phase de croissance des microorganismes (Wolhowe et al., 2009). Turich et Freeman (2011) ont mis en évidence une relation entre les abondances relatives de l'archaeol et du caldarchaeol et la salinité, reflétant une transition entre des populations d'Archaea marines à hypersalines (cf. paragraphe 1.3.3.1 Chapitre 1). A partir de l'analyse de particules en suspension et de sédiments de surface d'environnements marins à hypersalins actuels, les auteurs ont observé une très bonne corrélation du rapport archaeol / caldarchaeol (ACE pour Archaeol and Caldarchaeol Ecometric) avec la salinité (Turich et Freeman, 2011). Ce rapport a ensuite été appliqué à deux séries sédimentaires datant du Miocène et enregistrant des variations de salinité au cours de cette période. Les résultats ont montré que les paléosalinités estimées avec l'ACE étaient corrélées avec les salinités absolues au moment des dépôts de ces sédiments (Turich et Freeman, 2011). Cependant, les estimations de salinité avec le rapport ACE ne semblent pas fonctionner pour certains environnements actuels (Günther et al., 2014 ; Huguet et al., 2015). De plus, la source de caldarchaeol dans les milieux hypersalins n'est pas connue à ce jour. Les rapports décrits dans notre étude, basés sur les AGE *antéiso*, pourraient donc constituer de nouveaux indicateurs de variations de salinité, en considérant qu'ils ne sont pas modifiés par d'autres paramètres environnementaux.

Comme pour la calibration de paléothermomètres couramment utilisés pour les reconstructions paléoenvironnementales, tels que l' $U_{37}^{K'}$ et le TEX_{86} (cf. paragraphes 1.3.2.1 et 1.3.2.2 Chapitre 1 ; Brassel et al., 1986 ; Schouten et al., 2002), une étude approfondie de la distribution en AGE dans divers sédiments naturels couvrant une large gamme de salinités sera nécessaire pour confirmer les différentes relations mises en évidence dans nos études et préciser l'utilité des AGE comme indicateurs de salinité.



Supplementary data



Strain	NaCl	MAGEs		DAGEs			1-O-MAGEs	2-O-MAGEs
		Linear	Monomethyl br.	Linear	Monomethyl br.	Dimethyl br.		
PF2803	3	4.3 ± 1.7	10.5 ± 3.4	1.8 ± 0.9	73.7 ± 1	9.6 ± 5.1	92.4 ± 1.9	7.6 ± 1.9
	10	3 ± 0.4	11.5 ± 1.3	3.1 ± 0.2	77 ± 1.8	5.3 ± 0.7	92.4 ± 0.3	7.6 ± 0.3
	25	3.5 ± 0.8	9.9 ± 2.5	4.9 ± 0.9	74.8 ± 2.7	6.9 ± 1.7	89.6 ± 0.3	10.4 ± 0.3
	45	6.4 ± 1.4	13.4 ± 3	7.1 ± 1.2	68.8 ± 2.6	4.2 ± 2.7	89.8 ± 0.3	10.2 ± 0.3
	60	8.2 ± 0.3	16.6 ± 1.5	8.3 ± 1.7	64.8 ± 0.7	2 ± 0.3	91.2 ± 0.3	8.8 ± 0.3
CV2803	3	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4	8.4 ± 0.1	75.7 ± 1.3	6.4 ± 1.3	80 ± 1	19.9 ± 1
	24	8.4 ± 4	14.7 ± 8.4	5.2 ± 2.6	66.1 ± 9.1	5.6 ± 0.9	85.3 ± 2	14.7 ± 2
	45	8.4 ± 0.6	10.6 ± 2.6	9.8 ± 4	67.5 ± 1.5	3.7 ± 0.4	85.9 ± 2.5	14.1 ± 2.5
	60	15.1 ± 0.4	11 ± 0.5	16.3 ± 1.5	56.5 ± 1	1.1 ± 0.6	89 ± 0.9	11 ± 0.9

Tableau 5.S1 : Proportions relatives des MAGE et DAGE linéaires et ramifiés (% des AGE totaux) et des 1-O-MAGE et 2-O-MAGE (% des MAGE totaux) des souches PF2803 et CV2803 cultivées à différentes salinités. Les optimums sont en gras.

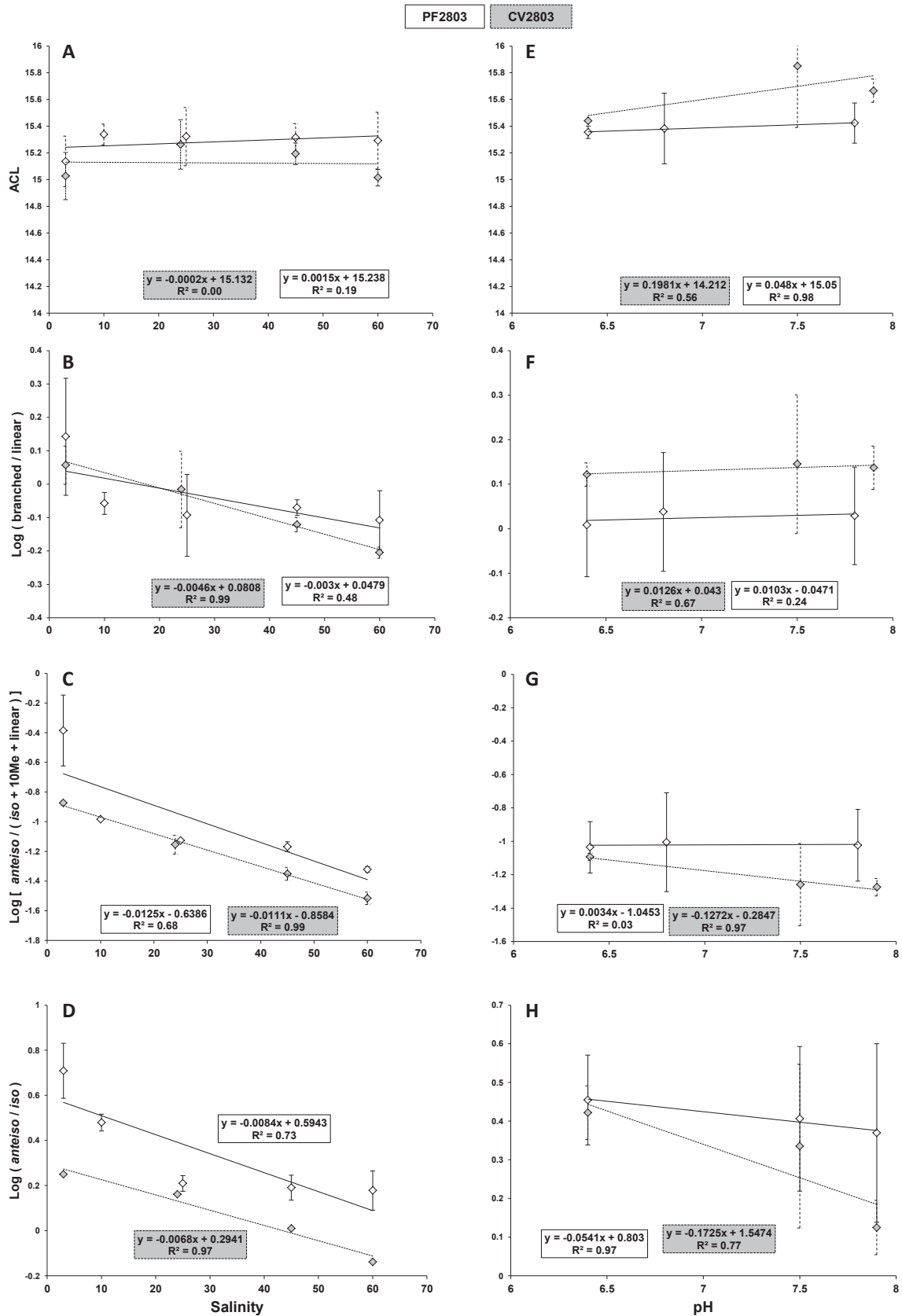


Figure 5.S1 : Moyennes pondérées d'ACL (A et E) et logarithme du ratio ramifiés/linéaires (B et F) des AG synthétisés par les souches CV2803 et PF2803 après croissance à différentes concentrations en NaCl et à différents pH. C et G) Logarithme du ratio *anteiso* / (linéaires + 10Me + *iso*) des AG synthétisés par les souches PF2803 et CV2803 en fonction de la salinité et du pH. D et H) Logarithme du ratio *anteiso* / *iso* des AG synthétisés par les souches PF2803 et CV2803 en fonction de la salinité et du pH.

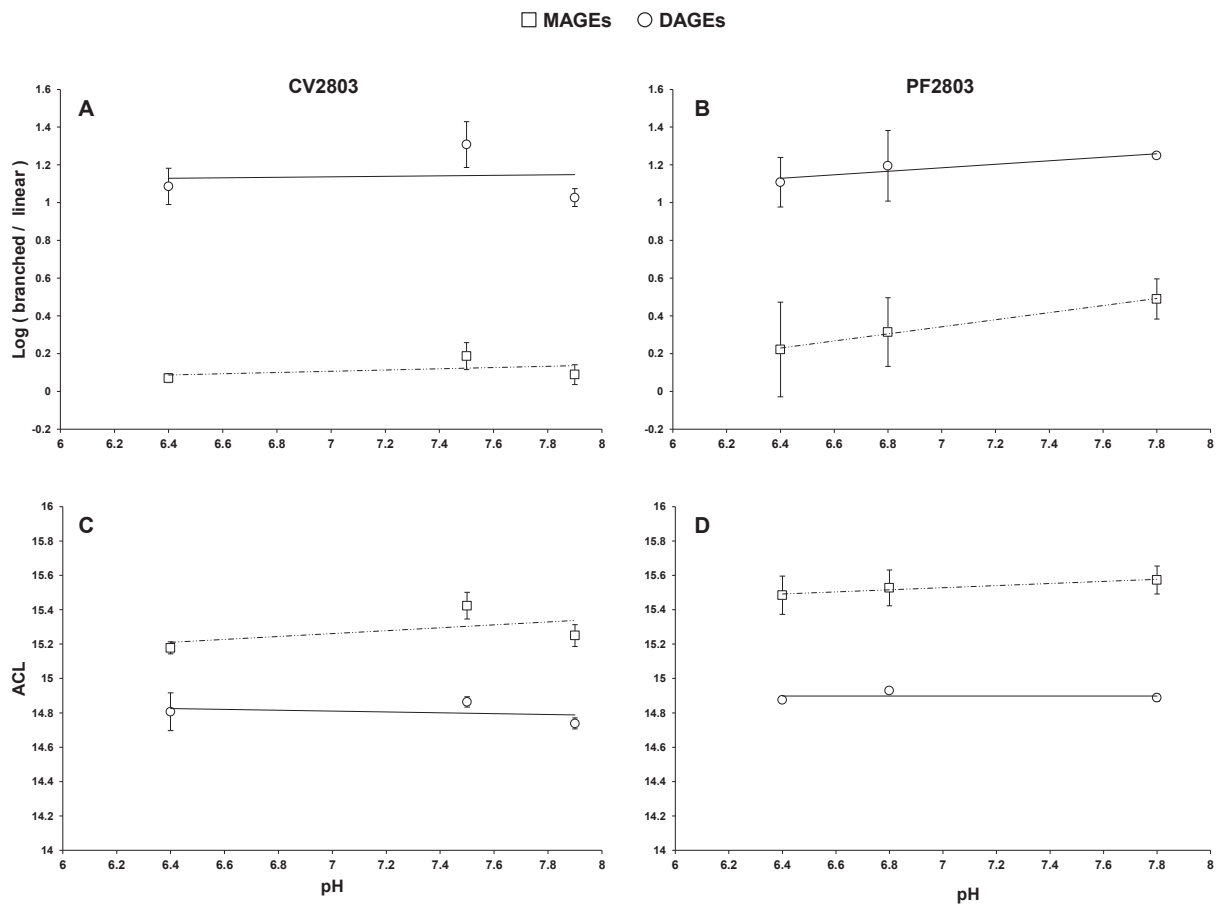


Figure 5.S2 : Moyennes pondérées d'ACL (A et B) et logarithme du ratio ramifiés/linéaires (C et D) des MAGE et DAGE synthétisés par les souches CV2803 et PF2803 après croissance à différents pH.

**Chapitre 6 : Exemples d'utilisation des AGE
comme indicateurs de variations de conditions
environnementales**

Chapitre 6 : Exemples d'utilisation des AGE comme indicateurs de variations de conditions environnementales

6.1. Introduction

Seule une petite quantité de la matière organique (MO) produite par les organismes est préservée dans l'environnement au cours des temps géologiques (e.g. dans les sols et les sédiments). Cependant, le contenu et la composition géochimique (composition élémentaire et isotopes de certains éléments chimiques) de la MO peuvent fournir de nombreuses informations sur les conditions environnementales et climatiques dans lesquelles elle a été biosynthétisée, transportée ou préservée. L'examen de la MO à l'échelle moléculaire permet notamment d'identifier des composés organiques individuels ou certaines classes de composés (appelés biomarqueurs) possédant une spécificité biologique et une bonne résistance aux processus diagénétiques, qui peuvent être utilisés pour définir l'origine de la MO et les conditions environnementales dans lesquelles cette dernière a été produite (Peters et al., 2005 ; Castañeda et al., 2011).

Ces dernières années, de plus en plus d'indices basés sur des rapports de biomarqueurs (appelés proxys organiques) ou sur la composition en isotopes stables de certains composés spécifiques, ont été utilisés pour reconstruire les conditions environnementales passées (e.g. température, salinité, pH, concentration en dioxyde de carbone, type de végétation, etc... ; Eglinton et Eglinton, 2008 ; Castañeda et al., 2011). Certains de ces proxys basés sur les rapports d'abondance de lipides spécifiques sont de plus en plus utilisés pour reconstruire les paléo-températures des eaux marines, mais aussi lacustres, ou encore les température de l'air (Castañeda et al., 2011 ; Schouten et al., 2013). Les cétones insaturées à longues chaînes carbonées (alcénones) produites par les algues unicellulaires eucaryotes (indice U_{37}^k ; Brassell et al., 1986 ; Prahl and Wakeham, 1987 ; Prahl et al., 1988), les tétraéthers de glycérol isoprénoïdes (Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraether ; GDGT) d'archées (indice TEX_{86} ; Schouten et al., 2002) ou les diols à longues chaînes carbonées produits par certaines *Eustigmatophytes* ou diatomées (indice LDI ; Rampen et al., 2012, 2014), sont devenus des outils moléculaires couramment utilisés pour reconstruire les températures des eaux de surfaces (SST) océaniques et lacustres (cf. section 1.3.2 Chapitre 1). Un autre proxy basé sur les rapports d'abondance de tétraéthers de glycérol ramifiés bactériens (brGDGT), a été proposé pour reconstruire les paléo-pH des sols (indice CBT) et les paléo-

températures de l'air sur les continents (indice MBT ; [Weijers et al., 2007](#) ; [Peterse et al., 2012](#) ; cf. paragraphe 1.3.2.3 Chapitre 1). Cependant, la robustesse des estimations de température avec ces proxys organiques est souvent limitée par le manque d'informations disponibles sur les organismes producteurs des molécules utilisées dans ces différents indices. Par exemple, l'origine biologique (TEX_{86} , LDI et MBT/CBT) ainsi que le rôle physiologique (U^{k}_{37} et LDI) des biomarqueurs sont souvent mal contraints, leur stabilité diagénétique est remise en question (U^{k}_{37}), et la profondeur du milieu de vie des organismes producteurs (TEX_{86}) n'est pas clairement définie ([Schouten et al., 2013](#)).

Contrairement aux proxys organiques permettant de reconstruire les variations de température dans le passé, très peu de proxys permettent d'estimer les variations de salinité d'un environnement de dépôt. Une relation a été mise en évidence entre la salinité du milieu et la composition isotopique en hydrogène (δD) de l'eau et des alcénones ([Van der Meer et al., 2007](#) ; [Sachse et Sachs, 2008](#) ; cf. paragraphe 1.3.3.2 Chapitre 1). Bien que prometteuse pour estimer les paléo-salinités, cette méthode est néanmoins limitée car le fractionnement isotopique de l'hydrogène est également directement associé à la biosynthèse des alcénones ([Schwab et Sachs, 2009](#)) et influencée par la phase de croissance des organismes ([Wolhowe et al., 2009](#)). [Turich et Freeman \(2011\)](#) ont mis en évidence une relation entre l'abondance relative de l'archaeol vis à vis du caldarchaeol (indice ACE) et la salinité du milieu (cf. paragraphe 1.3.3.1 Chapitre 1). Cependant, l'indice ACE a été calibré à partir d'environnements hypersalins, et non d'environnements marins plus classiques, et les applications de ce proxy à certains environnements actuels ne semblent pas nécessairement suivre les variations de salinité ([Günther et al., 2014](#) ; [Huguet et al., 2015](#)).

Il existe donc encore à ce jour un réel besoin de développer de nouveaux proxys environnementaux afin de réduire les incertitudes associées aux proxys déjà établis, et reconstruire avec plus de confiance et de robustesse les conditions paléo-environnementales. Depuis quelques années, des lipides bactériens particuliers, les mono- et diéthers de glycérol non isoprénoïdes (respectivement MAGE et DAGE) ont été identifiés chez des souches aux préférences physiologiques et écologiques variées et dans divers milieux naturels couvrant une large gamme de conditions environnementales ([Grossi et al., 2015](#) ; [Vinçon-Laugier et al., 2016](#) et références associées). En raison de leur ubiquité dans l'environnement et de leur stabilité diagénétique (ces lipides ayant été détectés dans des carbonates âgés de 250Ma ; [Saito et al., 2013](#)), les éthers de glycérol bactériens (AGE) sont susceptibles de constituer des biomarqueurs utiles pour les reconstructions paléo-environnementales. De récentes études ont tenté

de relier les variations de la distribution structurale des AGE observées dans l'environnement à celles de paramètres environnementaux tels que la température et le pH (Hernandez-Sanchez et al., 2014 ; Kaur et al., 2015 ; Yang et al., 2015) ou à des types d'environnements de dépôts (Wang et Xu., 2016). Un effet du pH sur le degré de ramification des chaînes carbonées des MAGE et des DAGE a été observé dans des environnements caractérisés par de grands intervalles de pH, tels que les sols (Yang et al., 2015) ou diverses sources hydrothermales (Kaur et al., 2015). Une augmentation de la longueur de chaîne carbonée et du taux d'insaturation des MAGE a été observée dans les eaux de l'océan Austral par rapport à celles de l'Atlantique Sud, suggérant une adaptation des communautés microbiennes à des températures de surface froides (Hernandez-Sanchez et al., 2014). Par ailleurs, Wang et Xu (2016) ont mis en évidence une diminution progressive de la proportion du $i\text{-C}_{15}$ MAGE depuis des sols jusqu'à l'océan ouvert, ce qui suggère que les MAGE peuvent être utilisés pour discerner les différents environnements de formation de ces composés. L'utilité des AGE en tant que proxys environnementaux est toutefois fortement limitée par le manque d'information disponible sur la réponse physiologique des membranes bactériennes contenant des AGE (et en particulier sur la modification structurale des AGE) à des variations des conditions environnementales.

Les études réalisées durant cette thèse à partir de différentes souches pures de bactéries capables de synthétiser des AGE et cultivées en conditions contrôlées (cf. Chapitres 3, 4 et 5) ont démontré le rôle de ces lipides dans l'adaptation des membranes à des variations de conditions environnementales. Diverses modifications structurales des AGE ont été mises en évidence en réponse à des variations des conditions de croissance, dont certaines spécifiques d'une adaptation, et linéairement corrélées, à la température ou à la salinité (cf. Chapitres 4 et 5). Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de la distribution structurale des AGE dans le milieu naturel comme indicateur de variations de conditions environnementales.

Dans cette étude, nous avons sélectionné différents écosystèmes actuels et anciens (paléo-écosystèmes) : deux séries sédimentaires anciennes déposées en milieux marins pour lesquelles les températures de l'eau de mer ont été précédemment reconstruites à l'aide de proxys de température bien calibrés (Plancq et al., 2014, 2015) ; et deux environnements aquatiques actuels caractérisés par des concentrations en sels variables (Huguet et al., 2015 ; Leboulanger et al., 2017). Le premier objectif de cette étude a été de déterminer la distribution structurale des AGE bactériens dans ces différents environnements, afin d'identifier les homologues et/ou isomères retrouvés le plus fréquemment, quel

que soit l'âge et le milieu de dépôt. Sur la base des résultats obtenus à partir des cultures de souches pures en conditions contrôlées, nous avons ensuite proposé différents rapports d'AGE présents dans ces milieux naturels comme nouveaux outils pour tracer les variations de température et de salinité de l'eau de mer, dans des écosystèmes anciens et actuels.

6.2. Contexte géologique et description des sites

6.2.1. Formation sapropélique de Punta Piccola (Sicile)

La section de Punta Piccola représente la partie supérieure de la section composite de Capo Rossello et affleure à environ 10 km à l'ouest de la ville d'Agrigente en Sicile ([Figure 6.1A](#) et [Tableau 6.1](#)). La partie principale de la section Punta Piccola comprend des alternances régulières de marnes grises et de calcaires marneux gris clair, avec l'apparition cyclique de marnes laminées sombres très riches en matière organique (appelées sapropèles ; [Hilgen, 1991](#) ; [Lourens et al., 1996](#) ; [Sprovieri et al., 2006](#)). Selon le modèle d'âge de [Lourens et al. \(1996\)](#), l'intervalle de temps étudié couvre le Plaisancien (Pliocène supérieur), de la limite Zancéléenne / Plaisancienne (3,6 Ma) à la limite Plaisancienne / Gélasiennne coïncidant avec le milieu du sapropèle A5 (2,59 Ma). Au cours du Pliocène, le site était situé dans un bassin versant, à une profondeur d'eau d'environ 600-800 m ([Sgarrella et al., 2012](#)). La formation des sapropèles est supposée avoir été déclenchée par des apports d'eau douce en Méditerranée dues à des augmentations cycliques de température (origines orbitales) qui ont renforcé la mousson africaine ([Pedersen, 1990](#) ; [Bethoux, 1993](#) ; [Combourieu Nebout et al., 2004](#) ; [Plancq et al., 2015](#)). Ces événements cycliques sont venus interrompre une période où les conditions climatiques étaient relativement stables au Pliocène supérieur, et ont conduit à une meilleure préservation de la matière organique liée à deux mécanismes: (i) une productivité primaire plus intense et une exportation accrue de la matière organique vers les sédiments marins ([Pedersen, 1990](#) ; [Bethoux, 1993](#) ; [Combourieu Nebout et al., 2004](#) ; [Plancq et al., 2015](#)) ; (ii) une stratification accrue de la colonne d'eau et une amélioration de la préservation de la matière organique ([Bethoux, 1993](#) ; [Plancq et al., 2015](#)). Cette série sédimentaire constitue donc un environnement de choix pour tester un nouvel indicateur de variations de température basé sur les éthers de glycérol bactériens. Le choix des échantillons et les méthodes d'extraction, de purification et d'analyse des AGE sont décrits dans le Chapitre 2 (cf. paragraphe 2.2.1). L'étude de ces échantillons par [Plancq et al. \(2015\)](#) avait

permis la reconstruction des SST (pour la période entre 3.6–2.59 Ma) notamment à partir des indices $U^{K'}_{37}$ et du TEX_{86} . Les équations de calibration de ces proxys organiques utilisées par [Plancq et al. \(2015\)](#) sont détaillées dans le Chapitre 2 (cf. section 2.4).

Tableau 6.1 : Localisation des sites d'étude et paramètres environnementaux testés pour chaque site.

Site	Locality	Period	Reference	Parameter studied
Punta Picolla composite section DSDP Site 511	Southwest of Sicily Falkland Plateau (southwest Atlantic Ocean)	late Pliocene (Piacenzian; 3.6-2.59 Ma) late Eocene-early Oligocene (37.5-31.4 Ma)	Plancq <i>et al.</i> , 2015 Plancq <i>et al.</i> , 2014	Temperature Temperature
Lake Dziani Dzaha	Mayotte Island	Present	Leboulanger <i>et al.</i> , 2017	Salinity
Tropical Ponds "Les Salines" and "La Saline"	La Désirade Island (Guadeloupe)	Present	Huguet <i>et al.</i> , 2015	Salinity
Tropical Ponds "La Salinette" and "La Grande Saline"	Grande Terre Island (Guadeloupe)	Present	Huguet <i>et al.</i> , 2015	Salinity

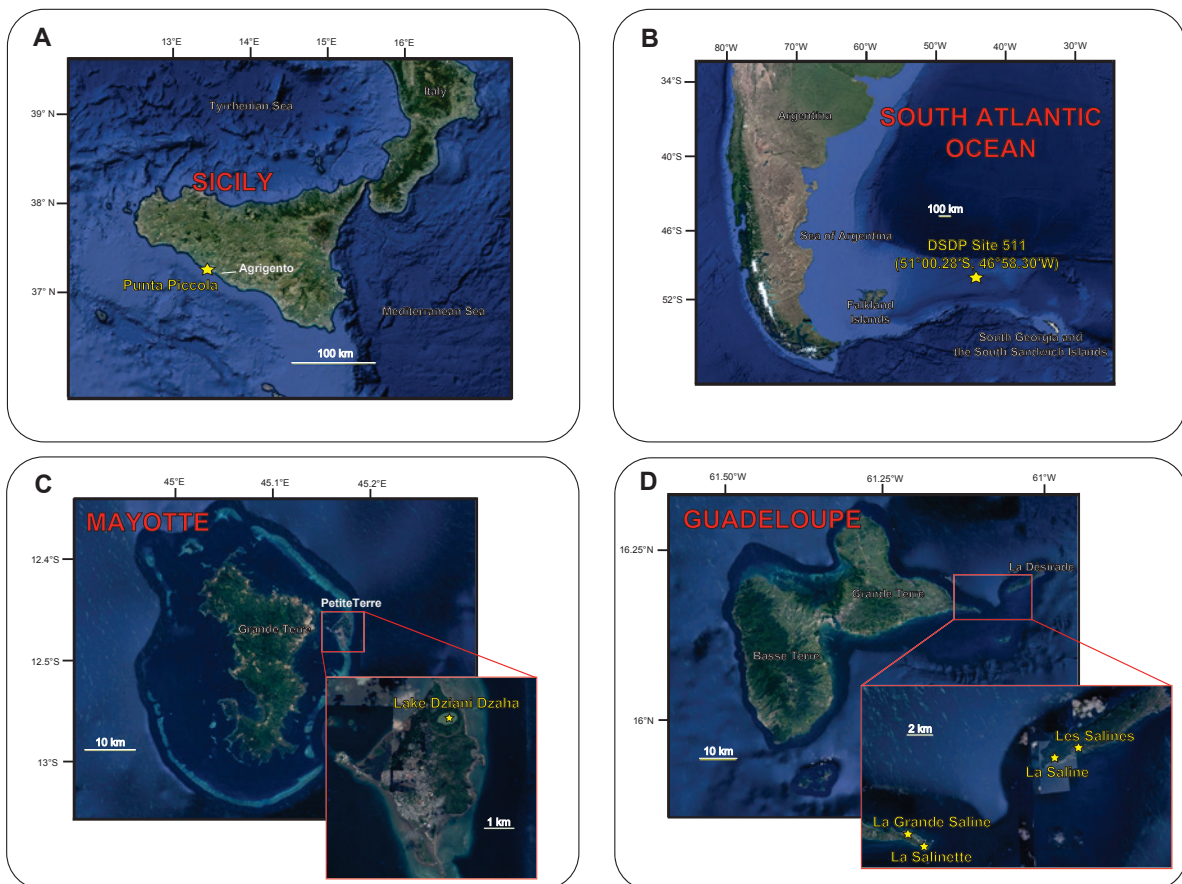


Figure 6.1 : Cartes des sites d'étude (image satellite google map) : (A) Série stratigraphique de Punta Piccola, (B) site marin profond DSDP 511, (C) Lac salé Dziani Dzaha, (D) Etangs salés de Guadeloupe.

6.2.2. Deep Sea Drilling Project (DSDP) site 511

Le site DSDP 511 (51°00.28'S, 46°58.30'W) a été foré durant la campagne DSDP Leg71 en 1980 à une profondeur d'eau de 2589 m, au niveau du bassin du plateau des Malouines (sud-ouest de l'océan Atlantique ; **Tableau 6.1** et **Figure 6.1B**). Cette série enregistre la transition Eocène-Oligocène (EOT ; ~34 Ma) qui marque un important refroidissement climatique entraînant la formation d'une calotte glaciaire permanente sur l'Antarctique Est (Zachos et al., 2001 ; Lear et al., 2008). Le site DSDP 511 était situé durant cette période à environ 55°S, 42°W (Basov et Krasheninnikov, 1983 ; Syke et al., 1998).

La section sédimentaire choisie pour notre travail a été précédemment étudiée par Plancq et al. en 2014 (cf. paragraphe 2.2.2 Chapitre 2). Cette étude a permis une reconstruction des SST autour de la transition Eocène/Oligocène à partir de l'indice d'insaturation des alcénones U_{37}^K . L'équation de calibration de l' U_{37}^K utilisée pour estimer les SST dans cette étude est décrite dans le Chapitre 2 (cf. section 2.4). Cet environnement constitue donc un second modèle de choix pour tester les AGE comme nouveaux indicateurs de variations de température. Le contenu en DAGE des échantillons sélectionnés a été déterminé directement à partir des chromatogrammes des fractions F3 obtenus par Plancq et al. en 2014 (cf. paragraphe 2.2.2 Chapitre 2).

6.2.3. Lac Dziani Dzaha

Le lac Dziani Dzaha est un lac de cratère volcanique situé sur l'île de Mayotte, un complexe insulaire appartenant à l'archipel des Comores dans le nord du canal du Mozambique dans l'Océan Indien Occidental (**Tableau 6.1** et **Figure 6.1C**). Cette île se divise en deux îles principales, celle de Grande Terre et de Petite Terre où le lac d'étude se situe (**Tableau 6.1** et **Figure 6.1C**). La formation de l'île provient probablement d'un événement éruptif qui s'est produit pendant l'ère du Pléistocène supérieur et du Miocène inférieur (Nougier et al., 1979). L'évènement volcanique qui a engendré la formation de la caldera, donnant par la suite naissance au lac Dziani Dzaha, recoupe le récif corallien entourant l'île de Petite Terre (**Figure 6.1C**). Les plus récents dépôts de cendres volcaniques au niveau de cette barrière de corail ont été datés de l'Holocène, entre 7000 (Zinke et al., 2003a) et 4000 ans « avant le présent » (Zinke et al., 2003b), ce qui donne probablement l'âge maximum et minimum pour la formation du lac. La superficie du lac est d'environ 25 ha et l'altitude de la surface du lac

est proche du niveau moyen de la mer. Cependant, le niveau du lac augmente d'environ 1 mètre entre la saison sèche pendant laquelle l'évaporation domine (de Mai à Octobre) et la saison humide pendant laquelle les précipitations ont lieu (de Novembre à Avril ; [Leboulanger et al., 2017](#)). Le lac Dziani Dzaha possède une eau très salée (en moyenne de 50 psu soit 1,5 fois celle de l'eau de mer) présentant une coloration verte permanente et ne contient aucun organisme eucaryote de grande taille ([Leboulanger et al., 2017](#)).

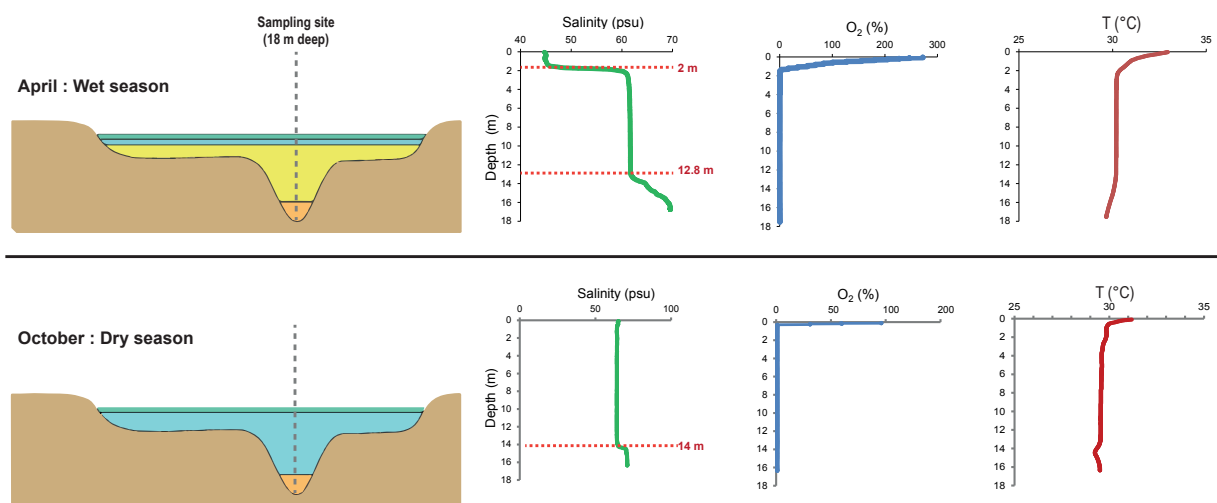


Figure 6.2 : Représentation schématique (communication personnelle de David Sala et Ivan Jovovic) de la structure du lac Dziani Dzaha, et profils des paramètres physiques et chimiques (Salinité, O₂ et température) en fonction de la profondeur au niveau du site profond (site d'échantillonnage) pour la saison humide (Avril) et la saison sèche (Octobre).

La chimie du lac est différente entre la saison des pluies et la saison sèche. En période sèche le lac n'est stratifié que dans sa partie la plus profonde (chemocline à 14 m de fond dans la fosse ; [Figure 6.2](#)) alors qu'en période humide le lac est entièrement stratifié en subsurface (chemocline à 2 m de fond) et présente une deuxième chemocline dans sa partie la plus profonde (à 13-14 m de fond dans la fosse). Le lac est oxique sur 0,5 mètre en fin de saison sèche et sur 1,5 mètre en saison humide, puis est anoxique en-dessous de ces profondeurs ([Figure 6.2](#)). La température varie de quelques degrés (1 à 2°C) mais reste globalement stabilisée autour de 30°C depuis la surface jusqu'au fond du lac pour les deux saisons ([Figure 6.2](#)). En saison sèche, la salinité est d'environ 64 psu et homogène de la surface jusqu'à la chemocline de fond où elle atteint 71 psu ([Figure 6.2](#)). Pendant la saison humide, la salinité est de 45 psu sur les deux premiers mètres, puis augmente jusqu'à 60 psu au niveau de la chemocline

de subsurface et reste stabilisée autour de cette valeur jusqu'à la chemocline de fond où elle augmente de nouveau jusqu'à 68 psu (Figure 6.2). Ce lac présente un contraste de salinité en fonction de la saison et constitue donc un bon modèle pour tester un indicateur de variation de salinité basé sur les AGE. Des prélèvements de matériel en suspension ont été réalisés à différentes profondeurs du lac au niveau de sa partie la plus profonde (Figure 6.2). Ces échantillons ont été analysés dans le cadre du master 2 et du doctorat de David Sala (cf. paragraphe 2.2.3 Chapitre 2). Leur contenu en DAGE a été déterminé directement à partir des chromatogrammes des fractions alcools analysées par GC-MS (cf. section 2.2.3 Chapitre 2).

6.2.4. Etangs salés de Guadeloupe

Parmi les quatre étangs étudiés, deux (nommés La Salinette et La Grande Saline) sont situés sur l'île de Grande-Terre, et les deux autres (nommés Les Salines et La Saline) sur l'île de la Désirade à 10 km à l'est de Grande-Terre (Tableau 6.1 et Figure 6.1D). La superficie de ces étangs est comprise entre 0,5 et 2,1 ha et la profondeur de l'eau dans les quatre étangs est inférieure à 1 m. L'eau des quatre étangs a un pH situé entre 7 et 7,5 et une température allant de 27°C à 33°C (Huguet et al., 2015). La salinité de l'eau est très différente d'un étang à l'autre en raison de leur situation respective. Les étangs de Grande-Terre sont placés sur des terrains plats, très proches de l'océan et sont donc sujet à des apports d'eau de mer (Figure 6.1D). La Salinette et la Grande Saline sont des environnements légèrement évaporitiques, induisant une salinité supérieure à celle de l'eau de mer (respectivement 41 et 93 psu; Huguet et al., 2015). En revanche, Les Salines et La Saline de l'île de la Désirade sont fortement influencées par le ruissellement dû à la topographie de l'île et à leur emplacement à la base d'un relief (Figure 6.1D), induisant une faible salinité de l'eau de ces étangs (respectivement 4 et 8 psu; Huguet et al., 2015). Les 4 étangs présentent donc des salinités très différentes et constituent un second modèle pour tester l'utilisation des DAGE comme indicateurs de salinité. L'échantillonnage des sédiments de ces étangs et les techniques d'extraction et d'analyse des lipides contenus dans les échantillons sont décrits dans le Chapitre 2 (cf. paragraphe 2.2.4).

6.3. Résultats et discussion

6.3.1. Présence et identification des AGE dans le milieu naturel

Les fractions lipidiques de 88 échantillons sédimentaires de répartitions géographiques et temporelles différentes, ont été analysées pour leur teneur en AGE. Pour les sites anciens de Punta Piccola et DSDP 511 ainsi que pour le lac Dziani Dzaha, seuls les DAGE ont pu être analysés, car les fractions plus polaires contenant les MAGE n'étaient pas disponibles. Ainsi seule la composition en DAGE a pu être comparée entre tous les sites d'étude et les résultats présentés dans ce chapitre ne concernent que cette classe d'éthers lipidiques. Entre 4 et 13 homologues de DAGE ont été identifiés dans chaque site ; ces composés possèdent de 31 (abrégé par C_{31} ; $M^+ = 556$ après silylation; avec deux chaînes alkyles à 14 atomes de carbone) à 37 atomes de carbone ($M^+ = 640$; avec deux chaînes alkyles à 16 atomes de carbone). La plus grande diversité de DAGE (13 homologues) a été observée dans La Salinette et la plus faible (4 homologues) dans La Grande Saline et Les Salines. Malgré un

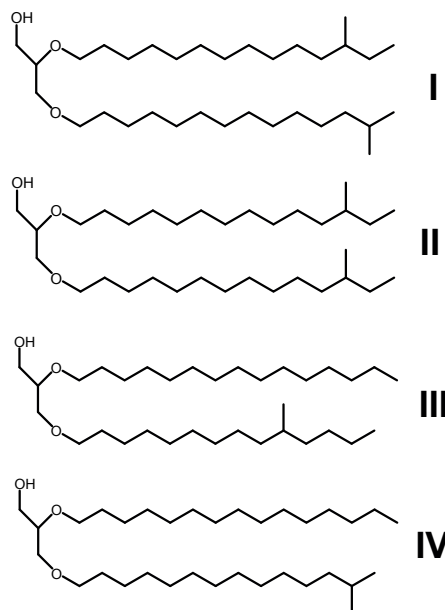


Figure 6.3 : Proposition d'identification des structures chimiques des DAGE I, II, III et IV identifiés dans ce travail.

nombre variable de DAGE d'un site à l'autre (ou d'un niveau stratigraphique à un autre pour les séries anciennes), 4 homologues ont été systématiquement détectés dans tous les échantillons. Ces 4 DAGE ont la même masse moléculaire après silylation ($M^+ = 584$), correspondant à des composés contenant 33 atomes de carbone (incluant le glycérol).

Leurs structures ont été déduites par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des nombreux DAGE synthétisés par les souches pures étudiées au cours de cette thèse (Chapitre 3 ; Vinçon-Laugier et al., 2016). Ils ont été nommés I, II, III et IV suivant leur ordre d'élution chromatographique. Ces 4 DAGE possèdent des chaînes linéaires ou ramifiées du même type que celles retrouvées dans nos souches modèles (C-10, *antéiso* et *iso* ; Chapitres 3, 4 et 5 ; Vinçon-Laugier et al., 2016). Toutefois, seuls deux des quatre DAGE naturels ont été observés dans nos souches (Chapitre 3, 4 et 5 ; Vinçon-Laugier et al., 2016). Il s'agit de DAGE mono-ramifiés en position C-10 (III) ou en position *iso* (IV ; Figure 6.3). Les deux autres DAGE détectés *in situ* possèdent a priori 2 chaînes ramifiées en positions *antéiso/iso* (I) ou *antéiso/antéiso* (II ; Figure 6.3). Pour ces 4 DAGE, la position *sn-1* ou *sn-2* de la ou des chaînes ramifiées reste toutefois incertaine, et les structures proposées dans la figure 6.3 ne sont pas totalement confirmées comme discuté ci-après.

De nombreuses études mentionnent la présence dans les sédiments de DAGE en C₃₃ avec deux chaînes alkyles en C₁₅. Dans une étude pionnière, Pancost et al. (2001) ont identifié plusieurs structures de DAGE dans des carbonates formés dans une zone à suintement froid de Méditerranée. Les auteurs ont notamment identifié une série (dénommée série I ; Figure 6.4A) qui ressemble beaucoup à celle que nous observons systématiquement *in situ* (composés I-IV ; Figure 6.4B), mais dont les homologues seraient uniquement constitués de chaînes alkyles *iso*-C₁₅ et *antéiso*-C₁₅ (composés Id-If Figure 6.4A ; Pancost et al., 2001). En se basant sur les propositions d'identification structurale et les Indices de Rétention (RI) déterminés par Pancost et al. (2001), d'autres études ont par la suite reporté la présence des DAGE Id-If dans d'autres environnements (Bouloubassi et al., 2006 ; Bradley et al., 2009 ; Chevalier et al., 2011 ; Ge et al., 2011 ; Berndmeyer et al., 2012). Beaucoup de travaux ont également reporté la présence de DAGE avec deux chaînes alkyles en C₁₅ sans caractériser précisément la structure de ces dernières (Zeng et al., 1992 ; Orphan et al., 2001 ; Pancost et al., 2006 ; Guido et al., 2003 ; Saito et al., 2013). La difficulté à déterminer la position des ramifications dans les DAGE ramifiés à partir de leurs spectres de masse peut expliquer ces identifications incomplètes.

A l'instar de l'étude de Pancost et al. (2001) qui a servi de base pour l'identification des DAGE dans de nombreuses autres études, des traitements à l'acide iodhydrique (traitement HI/LiAlH₄ ; section 2.3 Chapitre 3) sont nécessaires afin d'hydrolyser les liaisons éthers et mieux identifier les chaînes alkyles (sous la forme d'hydrocarbures) constitutives des AGE (e.g. nature et position des ramifications ; section 3.1 Chapitre 3 et Figure 6.4C). Cependant, comme nous avons pu le constater

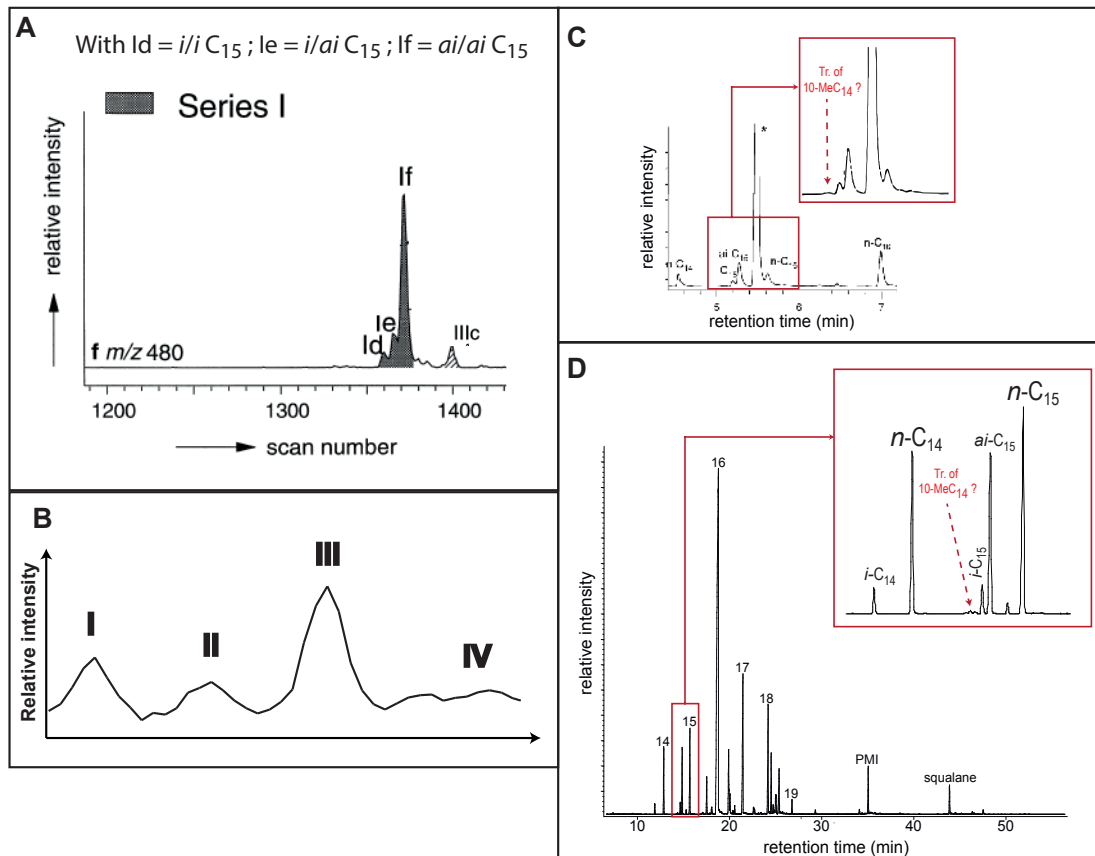


Figure 6.4 : **A)** Chromatogramme partiel de l'ion à $m/z = 480$ (M-104) caractéristique de la série de DAGE en C_{33} (série I) identifiée par [Pancost et al. \(2001\)](#). **B)** Chromatogrammes partiels (TIC) montrant les abondances relatives des DAGE **I**, **II**, **III** et **IV** observés dans nos études *in-situ*. **C)** et **D)** Chromatogramme partiel du courant d'ions total (TIC) des chaînes alkyles libérées par traitement HI des DAGE observés par [Pancost et al. \(2001\)](#) et [Bradley et al. \(2009\)](#). L'éluion suspectée de l'alcane 10-MeC₁₄ est représentée en rouge.

lors de l'identification des DAGE produits par nos souches modèles ([Vinçon-Laugier et al., 2016](#) ; Chapitre 3), ce traitement HI/LiAlH₄ a un rendement assez faible et peut engendrer la perte des chaînes alkyles les plus volatiles après hydrolyse. L'identification des différents homologues d'une série de DAGE à partir de la distribution relative des chaînes alkyles hydrolysées peut donc s'avérer trompeuse. Il faut en effet considérer qu'une chaîne avec un groupement méthyle en position C-10 a une température de fusion beaucoup plus basse (entre 40 et 80°C de différence respectivement pour des chaînes en C₁₆ et C₁₄) qu'un isomère linéaire ou ramifié en position *iso* ou *antéiso* ([Marsh et al., 2010](#)), et que l'alcane ramifié issu du traitement par HI/LiAlH₄ peut être perdu plus facilement que son isomère linéaire lors du traitement des extraits lipidiques, notamment lors des étapes d'évaporation sous flux d'azote et à l'évaporateur rotatif

Il est intrigant de constater que les structures des DAGE Ie et If proposées par [Pancost et al.](#)

(2001) correspondraient à celles que nous envisageons pour les composés **I** et **II** (Figures 6.3 et 6.4B). En revanche, les structures des DAGE **III** et **IV** que nous proposons ne semblent pas avoir été identifiées dans les études précédentes. Il n'est pas impossible que l'absence d'identification de DAGE ramifiés en C-10 dans les études antérieures soit due à des biais d'identification, comme souligné plus haut. En observant les chromatogrammes issus de traitement HI obtenus par Pancost et al. (2001), nous constatons la présence d'un composé en faible abondance éluant juste avant l'*iso*-C₁₅ (Figure 6.4C), qui pourrait correspondre au 10Me-C₁₄ d'après nos analyses de souches pures. Cette observation est également faite en étudiant le chromatogramme obtenu après traitement HI de DAGE réalisé par Bradley et al. (2009) qui, de même, n'avait pas rapporté la présence de chaîne alkyle 10Me-C₁₄ (Figure 6.4D). Ce biais analytique, si avéré, aurait donc engendré une mauvaise identification des structures chimiques des DAGE nommés Id, Ie et If dans les études postérieures à celle de Pancost et al. (2001). De plus, le chromatogramme des DAGE identifiés par Pancost et al. (2001) montre la présence d'un quatrième composé éluant après le DAGE If (Figure 6.4A), que les auteurs n'ont pas identifié et qui pourrait correspondre au DAGE **IV** que nous observons (Figures 6.4A-B). Il n'est pas impossible non plus que diverses structures ramifiées de DAGE (mono-ramifié en position C-10 ou di-ramifiés en position *iso/antéiso*) éluent aux mêmes temps de rétention, ce qui accentue la difficulté d'identification de ces composés. Il est donc envisageable que différentes séries de DAGE mono- et di-ramifiés existent dans différents écosystèmes. Afin d'appuyer l'identification structurale des 4 DAGE présents dans nos échantillons, nous avons déterminé la structure des MAGE présents dans les sédiments des étangs de Guadeloupe. En effet, les MAGE et les DAGE sont connus pour avoir des liens biosynthétiques et, lorsque les 2 classes de composés coexistent dans un échantillon, les chaînes alkyles des MAGE sont retrouvées dans les DAGE (Grossi et al., 2015 ; Vinçon-Laugier et al., 2016). Dans les 4 étangs salés de Guadeloupe, nous avons relevé la présence systématique de 4 MAGE avec des chaînes alkyles en C₁₅, dont une structure linéaire, et trois autres structures possédant des ramifications en position C-10 (10Me-C₁₄), *iso* et *antéiso* comme celles suspectées présentes dans les DAGE. Ceci supporte notre proposition d'identification structurale pour les composés **I**, **II**, **III** et **IV** (Figure 6.3). Toutefois, une identification formelle de ces DAGE à l'aide de standards synthétiques ou après analyse par RMN ou traitement HI des composés individuels isolés par CG préparative s'avère nécessaire.

6.3.2. Indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$: nouveaux indicateurs de variations de température ?

6.3.2.1. Détermination des indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$

L'étude de l'influence de la température sur la synthèse d'éthers de glycérol par nos souches modèles de bactéries sulfato-réductrices a permis de mettre en évidence des variations importantes des proportions de certains AGE ramifiés en fonction de ce paramètre environnemental (cf. Chapitre 4). Il a notamment été démontré que les proportions des AGE ramifiés en position C-10 par rapport aux autres structures d'AGE synthétisées (*antéiso*, *iso* et linéaires) sont linéairement corrélées avec la température de croissance de l'organisme ($R^2 > 0,81$; cf. **Figure 4.4** ; Chapitre 4). De plus, ces proportions d'AGE ramifiés en position C-10 ne sont pas influencées par des variations de salinité ou de pH du milieu de croissance (cf. **Figures 5.6E**, **5.6F** et **5.7** ; Chapitre 5). Parmi les 4 diéthers de glycérol présents dans les échantillons naturels analysés dans cette étude, seul le DAGE **III** possède une ramification en position C-10 (**Figure 6.3**). Or, l'analyse des échantillons des séries sédimentaires de Punta Piccola et du site DSDP 511 montre principalement des variations d'abondance de ce composé (**Figures 6.5A** et **6.6A**). En revanche, les abondances des DAGE **I**, **II** et **IV** ne semblent pas être modifiées de façon significative (**Figures 6.5A** et **6.6A**). Les variations de distribution des 4 DAGE pourraient donc être dues à des variations des SST marines mises en évidence par [Plancq et al. \(2014, 2015\)](#). Sur la base de ces observations et des résultats obtenus avec nos modèles biologiques, nous avons constitué deux rapports comparant les proportions du DAGE **III** (a priori ramifié en C-10) avec les autres structures observées *in situ* : un premier nommé $DAGE_{10}$ (équation 1) comprenant l'ensemble des 4 DAGE, et un second rapport simplifié nommé $DAGE_{10}'$ comprenant uniquement les DAGE **I**, **II** et **III** (car le DAGE **IV** est parfois difficilement quantifiable à cause de sa faible abondance ; équation 2). Ces deux rapports sont proposés afin d'être testés comme indicateurs de variations de température pour chacune des deux séries sédimentaires choisies.

$$DAGE_{10} = \text{Log} [(\mathbf{I} + \mathbf{II} + \mathbf{IV}) / (\mathbf{III})] \quad (1)$$

$$DAGE_{10}' = \text{Log} [(\mathbf{I} + \mathbf{II}) / (\mathbf{III})] \quad (2)$$

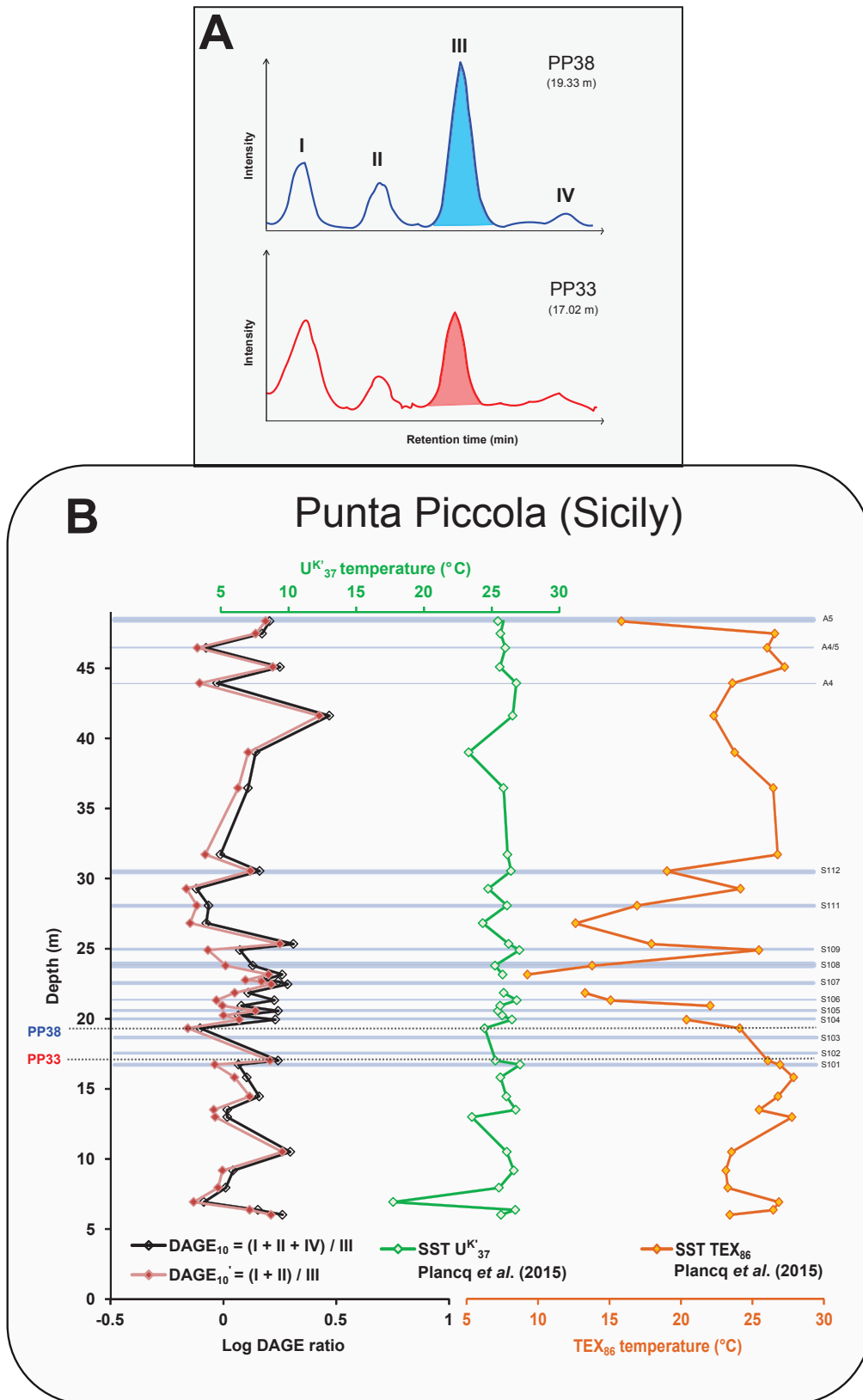


Figure 6.5 : **A**) Chromatogrammes partiels (TIC) montrant les abondances relatives des DAGEs **I**, **II**, **III** et **IV** dans les échantillons PP33 et PP38 issus de la série sédimentaire de Punta Piccola. **B**) Températures de l'eau de mer reconstituées avec les proxys U^K₃₇ (profil vert) et TEX₈₆ (profil orange) par Plancq et al. (2015) pour le Pliocène supérieur de la section composite de Punta Piccola. Les profils noirs et rouges correspondent respectivement aux valeurs des ratios DAGE₁₀ et DAGE₁₀' exprimées en logarithme.

6.3.2.2. Utilisation des indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ pour la section de Punta Piccola

Nous avons tout d'abord comparé les valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ calculés pour les 4 échantillons (à 26,82, 28,08, 30,54 et 31,72 m) extraits et analysés selon nos méthodes (cf. section 2.2.1 Chapitre 2), avec celles calculées à partir des analyses faites par [Plancq et al. \(2015\)](#). Malgré les différents protocoles d'extraction et de séparation des lipides utilisés, les proportions de DAGE contenus dans chacun des échantillons sont identiques entre les deux études et nous pouvons utiliser avec confiance les analyses faites par [Plancq et al. en 2015](#) (Résultats non montrés).

Les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$, varient le long de la série sédimentaire dans un intervalle compris entre -0.16 et 0.46 avec des valeurs moyennes respectives de 0,12 et de 0,06 ([Figure 6.5C](#)). Les profils obtenus avec les deux rapports sont semblables, indiquant que la forme simplifiée du rapport ($DAGE_{10}'$) enregistre un signal similaire à celui considérant l'ensemble des 4 DAGE ($DAGE_{10}$; [Figure 6.5B](#)).

Les SST reconstituées à l'aide des paléothermomètres organiques $U^{K'}_{37}$ ([Figure 6.5B](#)) et LDI (non reportées dans cette étude) sont relativement stables tout au long du Pliocène supérieur (températures moyennes de 25,6°C et 24,7°C pour les indices $U^{K'}_{37}$ et LDI respectivement ; [Plancq et al., 2015](#)). En dépit de ces températures relativement stables sur la période considérée, une augmentation des SST est enregistrée par ces deux paléothermomètres organiques dans chaque niveau de dépôt sapropélique (températures moyennes de 26,3°C et 25,1°C pour les indices $U^{K'}_{37}$ et LDI respectivement ; [Plancq et al., 2015](#) ; [Figure 6.5B](#)), suggérant que le dépôt de ces niveaux riches en matière organiques s'est fait dans des conditions climatiques plus chaudes. En comparant les profils des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ avec celui de l' $U^{K'}_{37}$, on observe qu'ils sont beaucoup plus contrastés et que la relative stabilité observée pour le profil de l' $U^{K'}_{37}$ est moins nette pour les indices $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ ([Figure 6.5B](#)). Pourtant, les valeurs de $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ semblent corrélées avec celui de l' $U^{K'}_{37}$ et des augmentations des deux rapports de diéthers sont également observées pour la plupart des niveaux sapropéliques de la série S101-S112, coïncidant avec des augmentations de température de surface estimées par l' $U^{K'}_{37}$ et le LDI ([Plancq et al., 2015](#)). Les deux rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ semblent donc être reliés aux températures des milieux de dépôts de la même manière que le LDI et l' $U^{K'}_{37}$. Les températures estimées à l'aide du TEX_{86} ([Plancq et al., 2015](#)), qui reflètent un enregistrement de

température plus profond que les eaux de surface (Huguet et al., 2007), montrent un profil assez bien corrélé avec les SST reconstruites avec les deux autres proxys organiques avant (16m ; ~3.4-3.1 Ma) et après (32m ; ~ 2,8-2,6 Ma) le dépôt des sapropèles S101-S112 (Figure 6.5B ; Plancq et al., 2015). Cependant, dans l'intervalle de sapropèles S101-112 (entre 16 et 32 m), des écarts importants sont observés entre les trois proxys de température avec des SST plus froides (~20°C) estimées par le TEX_{86} que celles estimées par l' $U^{K'}_{37}$ et le LDI au moment des dépôts sapropéliques (Plancq et al., 2015 ; Figure 6.5B). Les profils des rapports DAGE_{10} et DAGE_{10}' sont également assez bien corrélés avec le profil de SST reconstruit avec le TEX_{86} mais uniquement en dehors de l'intervalle de dépôts des sapropèles S101-112 (Plancq et al., 2015 ; Figure 6.5B). Les écarts importants observés entre les valeurs de températures du TEX_{86} et celles de l' $U^{K'}_{37}$ et du LDI dans les niveaux sapropéliques de la série S101-S112 sont cependant supposés être liés aux plus forts ruissellements qui ont eu lieu au cours de ces périodes plus chaudes (Plancq et al., 2015). En effet, les augmentations des apports en eaux douces ont pu induire une augmentation de la profondeur de la chémocline dans la colonne d'eau, poussant les populations d'archées à migrer vers des eaux plus profondes et plus fraîches, induisant des enregistrements de températures non représentatives des eaux de surfaces (Menzel et al., 2006 ; Huguet et al., 2007). Des études antérieures ont montré des estimations plus froides des températures basées sur le TEX_{86} dans les zones côtières, due à des apports de GDGT d'origine terrestre par les rivières (Leider et al., 2010 ; Grauel et al., 2013 ; Schouten et al., 2013 ; Plancq et al., 2015). Les rapports DAGE_{10} et DAGE_{10}' ne suivent pas les mêmes tendances que le TEX_{86} dans cette zone à niveaux sapropéliques (Figure 6.5B). En comparaison avec les interprétations précédemment faites sur les populations d'archées sources des GDGT, ces résultats permettent de supposer que les populations bactériennes synthétisant les DAGE dans cette série sédimentaire sont soit uniquement d'origine aquatique (et pas issues d'apports terrigènes), soit non affectées par une migration de la chémocline, ou incapables de migrer le long de la colonne d'eau.

Au niveau de la seconde série de sapropèles composant la section supérieure de la coupe de Punta Piccola (entre 44 et 48,4 m ; 2.7–2.6 Ma ; Plancq et al., 2015), les trois proxys de température mesurés par Plancq et al. (2015) enregistrent une légère hausse des SST (Figure 6.5B ; Plancq et al., 2015), alors que les valeurs des rapports DAGE_{10} et DAGE_{10}' sont plus faibles et contradictoires avec une hausse de température responsable de la formation de ces niveaux riches en matières organiques (Figure 6.5B). Cependant, Plancq et al. (2015) ont suggéré que la température était un facteur moins

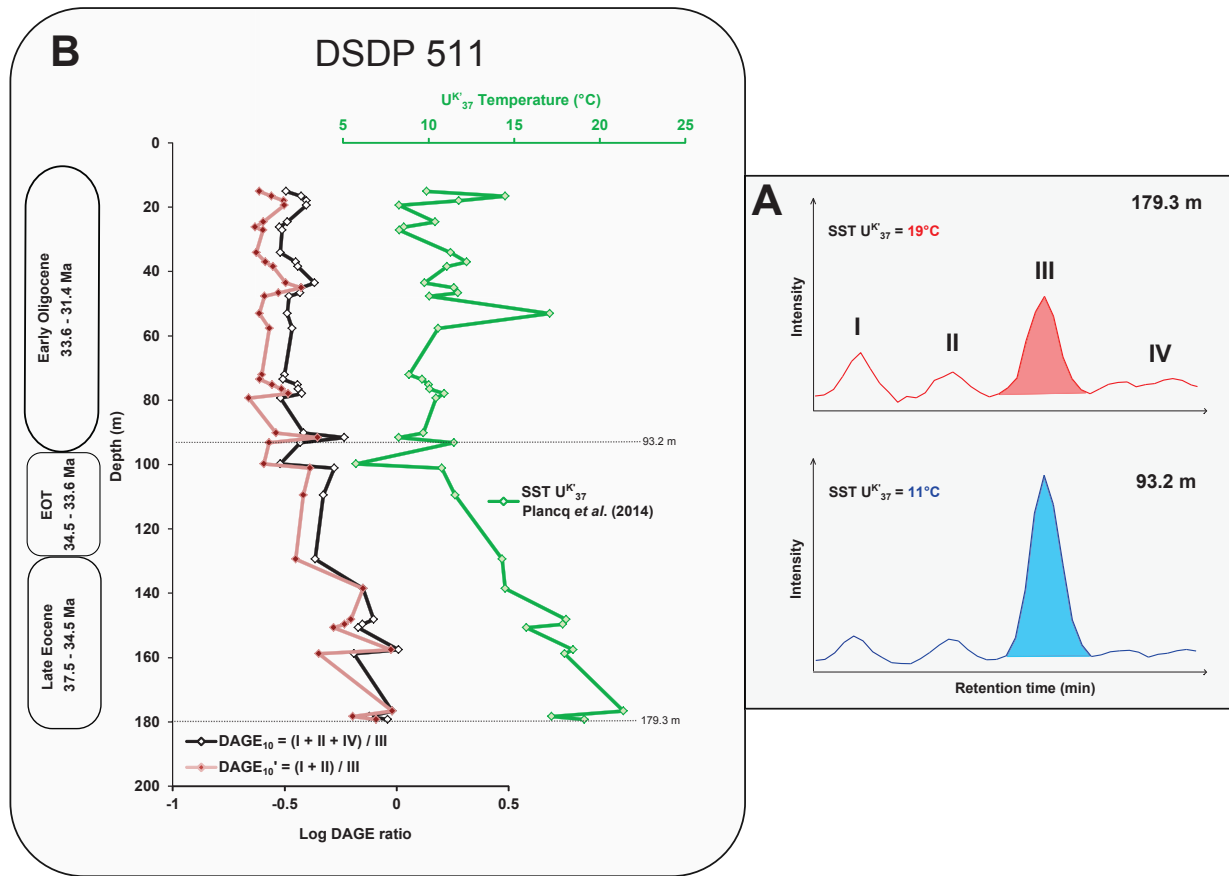


Figure 6.6 : A) Chromatogrammes partiels (TIC) montrant les abondances relatives des DAGE I, II, III et IV dans les échantillons à 93,2 et 179,3 m de profondeur issus de la carotte sédimentaire du site DSDP 511. (B) Températures de l'eau de mer reconstituées par Plancq et al. (2014) à partir du proxy UK^K₃₇ (profil vert) pour la transition Eocène-Oligocène au site DSDP 511. Les profils noirs et rouges correspondent respectivement aux valeurs des ratios DAGE₁₀ et DAGE₁₀' exprimées en logarithme.

important dans la formation des sapropèles A4-A5, et que les dépôts de ces niveaux sapropéliques étaient probablement contrôlés par une productivité primaire accrue et donc un export plus important de MO vers les sédiments.

6.3.2.3. Utilisation des indices DAGE₁₀ et DAGE₁₀' au site DSDP 511

Les valeurs de l'UK^K₃₇ dans ces sédiments ont été déterminées par Plancq et al. (2014), et les rapports DAGE₁₀ et DAGE₁₀' ont pu être déterminés sur tous les extraits lipidiques de Plancq et al. (2014) excepté à 10 m (31,4 Ma) en raison de concentrations très faibles en DAGE (Figure 6.6B)

Les SST estimées par l'UK^K₃₇ montrent une diminution régulière depuis environ 18°C entre 179 et

148 m (entre 37,5 et 34,5 Ma ; Eocène supérieur) à environ 10°C entre 148 et 100 m (34,5 et 33,6 Ma ; aux alentours de la transition Eocène-Oligocène ; **Figure 6.6B** ; **Plancq et al., 2014**). Les SST restent ensuite relativement stables durant l'Oligocène inférieur (environ 10°C ; **Figure 6.6B** ; **Plancq et al., 2014**) même si des événements de réchauffement semblent être enregistrés à 53m (32,5 Ma ; ~17°C) et 16,6 m (31,5 Ma ; ~14°C ; **Figure 6.6B**).

Les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ varient au cours de la transition Eocène supérieur / Oligocène inférieur avec des valeurs moyennes respectives de -0.36 et de -0.45 (**Figure 6.6B**). L'intervalle de valeurs des deux rapports pour le site 511 est remarquablement plus faible (entre -0.66 et 0.01) que celui précédemment déterminé pour la série sédimentaire de Punta Piccola (entre -0.16 et 0.46 ; **Figure 6.5B**). La différence des SST moyennes estimées par l' $U^{K'}_{37}$ entre la série de dépôt de Punta Piccola et celle du site 511 est d'environ 14°C ; il semble donc que cette différence de température soit également retranscrite dans les valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$. Les profils de ces deux rapports sont une fois de plus très proches, indiquant un enregistrement des variations de température similaire quel que soit le rapport utilisé (**Figure 6.6B**). Ces profils sont également en accord avec celui de l' $U^{K'}_{37}$ (**Figure 6.6B**), montrant une diminution régulière des valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ depuis l'Eocène supérieur jusqu'à la fin de la transition Eocène-Oligocène (33,6 Ma ; **Figure 6.6B**). Durant l'Oligocène inférieur (de 33,6 à 31,5 Ma), les valeurs des deux rapports se stabilisent autour de valeurs moyennes respectives de -0.45 et -0.56 (**Figure 6.6B**). D'autres études ont également estimé les variations de SST au cours de cette même période en utilisant différents paléothermomètres, tels que le $\delta^{18}O$ des tests de foraminifères planctoniques (**Muza et al., 1983**), l' $U^{K'}_{37}$ et le TEX_{86} (**Liu et al., 2009** ; **Pagani et al., 2011**). Toutes ont démontré un refroidissement important entre l'Eocène supérieur et l'Oligocène inférieur. Nos rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ basés sur les DAGE bactériens semblent donc bien enregistrer des variations de température des eaux océaniques.

6.3.2.4. Corrélation des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ avec l'indice $U^{K'}_{37}$

L'ensemble des valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ obtenues pour tous les échantillons de la coupe composite de Punta Piccola et de la série sédimentaire du site DSDP 511 (N=74 pour chacun des rapports) a été reporté en fonction des valeurs d' $U^{K'}_{37}$ déterminées pour les mêmes échantillons par

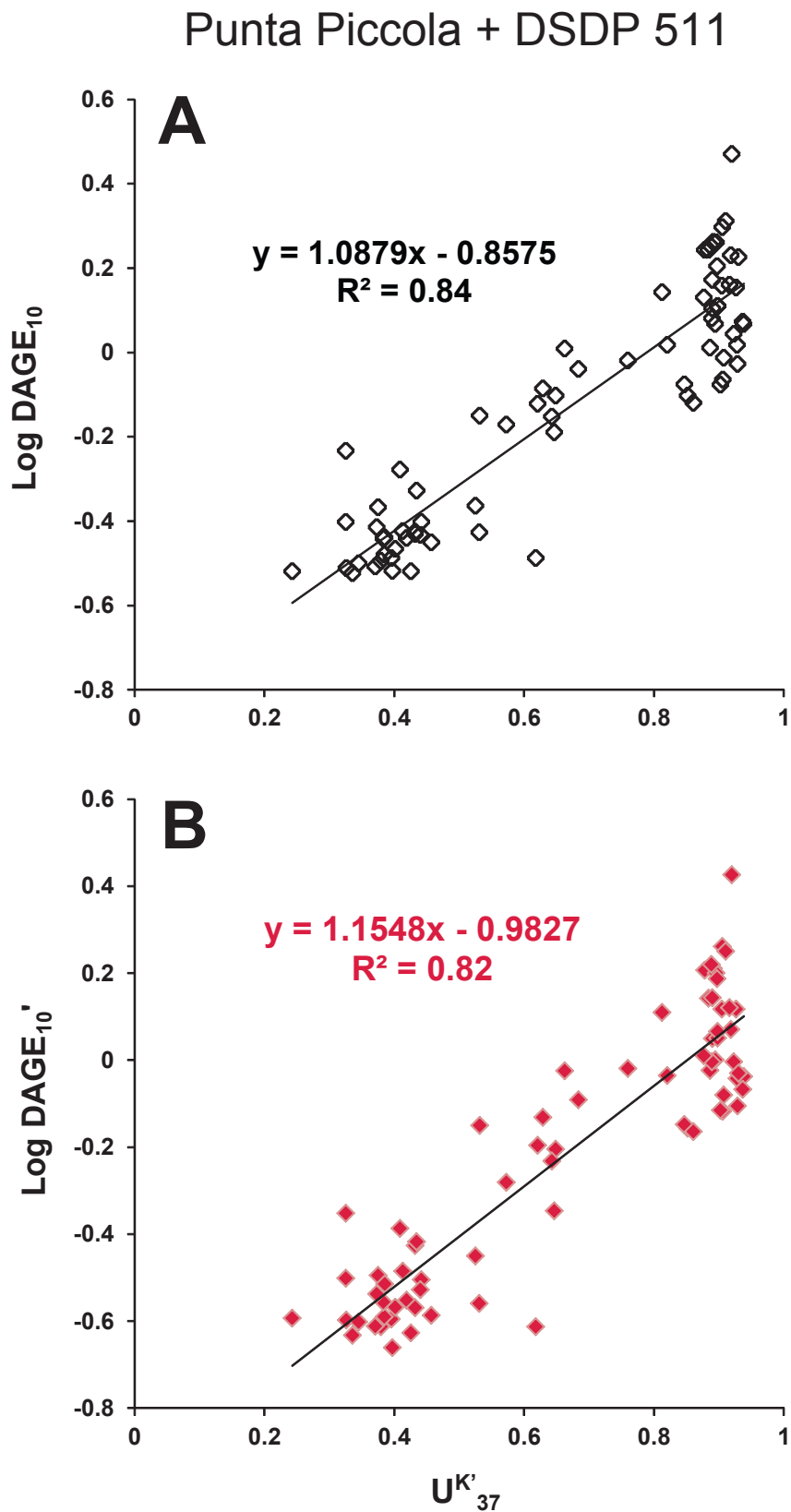


Figure 6.7 : Relation entre les ratios DAGE₁₀ (A) ou DAGE₁₀' (B) et l' $U^{K'}_{37}$ (Plancq et al., 2014, 2015) dans les échantillons de la coupe composite de Punta Piccola et de la carotte du site DSDP 511.

Plancq et al. (2014, 2015 ; Figures 6.7A-B). Nous avons choisi de reporter ces valeurs en fonction des valeurs brutes d' $U_{37}^{K'}$ et non des SST estimées, afin de s'affranchir de l'erreur engendrée par le choix de l'équation de calibration permettant d'estimer les SST à partir de l' $U_{37}^{K'}$ (qui est différente entre les deux sites d'études ; Plancq et al., 2014, 2015). Les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ apparaissent fortement corrélées avec les valeurs brutes d' $U_{37}^{K'}$ ($R^2 = 0,84$ et $R^2 = 0,82$ respectivement ; Figures 6.7A-B). La comparaison des pentes obtenues par les deux corrélations, via un test statistique ANCOVA, indique que les valeurs de pentes sont identiques ($p = 0,43$; $p_{\text{same}} < 0,05$). Ces corrélations linéaires suggèrent donc que les valeurs des deux indices bactériens sont intrinsèquement reliées à la température de l'environnement de manière similaire à l'indice $U_{37}^{K'}$. Des modifications des proportions des DAGE ramifiés en C-10 (ici le DAGE III) par rapport aux autres structures synthétisées ont déjà été reportées chez des souches pures cultivées à différentes températures (cf. Chapitre 4) et sont donc cohérentes avec une régulation de la fluidité des membranes bactériennes.

Cependant, les corrélations des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ avec l' $U_{37}^{K'}$ ne sont pas parfaites ($R^2 < 1$), mais cette différence est probablement due à l'origine biologique différente des DAGE et des alcénones et à une réponse à la température qui peut être différente entre bactéries et phytoplancton. Le rôle physiologique des alcénones est à ce jour encore inconnu et d'autres paramètres environnementaux pourraient influencer la synthèse de ces biomolécules (Schouten et al., 2013 ; section 1.3.2.1 chapitre 1). De plus, ces lipides sont produits par des microalgues planctoniques évoluant dans les eaux de surface (zone photique) alors que la profondeur du milieu de vie des bactéries synthétisant les DAGE I, II, III et IV est inconnue et peut s'étendre des eaux de surface aux sédiments. Des MAGE ont en effet été retrouvés dans des particules organiques le long de colonnes d'eau marines (Hernandez-Sanchez et al., 2014) et les DAGE sont ubiquistes dans les sédiments marins (Grossi et al., 2015 ; Vinçon-Laugier et al., 2016 ; et références associées).

Pour conclure, les fortes corrélations entre l' $U_{37}^{K'}$ et les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ indiquent que ces deux indices peuvent être utilisés comme traceurs de variations de température dans le passé. La forme simplifiée du rapport bactérien $DAGE_{10}'$ est légèrement moins bien corrélée avec les valeurs d' $U_{37}^{K'}$ (et donc indirectement avec les SST) que la forme complète $DAGE_{10}$ (Figures 6.7A-B), mais semble enregistrer des variations de température similaires (Figures 6.5 et 6.6). L'utilisation de la formule simplifiée $DAGE_{10}'$, lorsque la quantification de DAGE IV dans un environnement n'est pas possible, serait donc aussi robuste pour estimer des variations de température que la formule complète

DAGE₁₀.

6.3.3. Indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$: nouveaux indicateurs de variations de salinité ?

6.3.3.1. Détermination des indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$

L'influence de la salinité sur la synthèse d'éthers de glycérol par nos souches modèles de BSR (cf. Chapitre 5) a permis de mettre en évidence des variations des proportions des AGE ramifiés en position *antéiso* par rapport aux autres structures d'AGE synthétisées (C-10, *iso* et linéaires) en réponse à des modifications de la concentration en sel du milieu de croissance. Ces proportions sont apparues linéairement corrélées avec la salinité à la fois pour les MAGE et pour les DAGE ($0,60 < R^2 < 0,98$; cf. **Figures 5.6A** et **5.6B** ; Chapitre 5). Le rapport des proportions des AGE ramifiés en position *antéiso* par rapport à ceux ramifiés en position *iso* s'est également montré très fortement corrélé avec la salinité du milieu de croissance ($0,72 < R^2 < 0,86$; **Figures 5.6C** et **5.6D** ; Chapitre 5). De plus, les proportions des AGE *antéiso* ne sont pas modifiées en réponse à des variations de température ou de pH (cf. **Figures 4.3** et **5.7** Chapitres 4 et 5). Parmi les 4 DAGE présents dans les échantillons naturels considérés dans cette étude, seul le DAGE **II** possède deux ramifications *antéiso* et le DAGE **IV** une seule ramification *iso* (**Figure 6.3**), les deux autres homologues présentant soit aucune ramification *iso* ou *anteiso* (DAGE **III**), soit une ramification de chaque type (DAGE **I**). Les chromatogrammes des fractions lipidiques des échantillons de la colonne d'eau du lac Dziani Dzaha en période mélangée (**Figure 6.8**) montrent principalement des variations d'abondances des DAGE **I** et **II** en fonction de la profondeur du lac (Lac Dziani) semblant être en adéquation avec des variations de la salinité (**Figure 6.8A**). En revanche, les abondances des DAGE **III** et **IV** restent stables (**Figure 6.8A**), contrairement aux deux sites précédemment étudiés pour la température (Punta Piccola et site DSPD 511 ; **Figures 6.5B** et **6.6.A**). Sur la base de ces observations et des résultats obtenus avec les cultures de souche pures en conditions contrôlées de salinité (cf. Chapitre 5), nous proposons deux rapports comparant les proportions du DAGE **II** (possédant deux groupes méthyle en position *antéiso*) avec les autres structures observées et susceptibles de tracer la salinité du milieu de vie des organismes producteurs : le rapport $DAGE_{ai/ai}$ (équation 3) et le rapport $DAGE_{ai/i}$ (équation 4).

$$DAGE_{ai/ai} = \text{Log} [\text{II} / (\text{I} + \text{III} + \text{IV})] \quad (3)$$

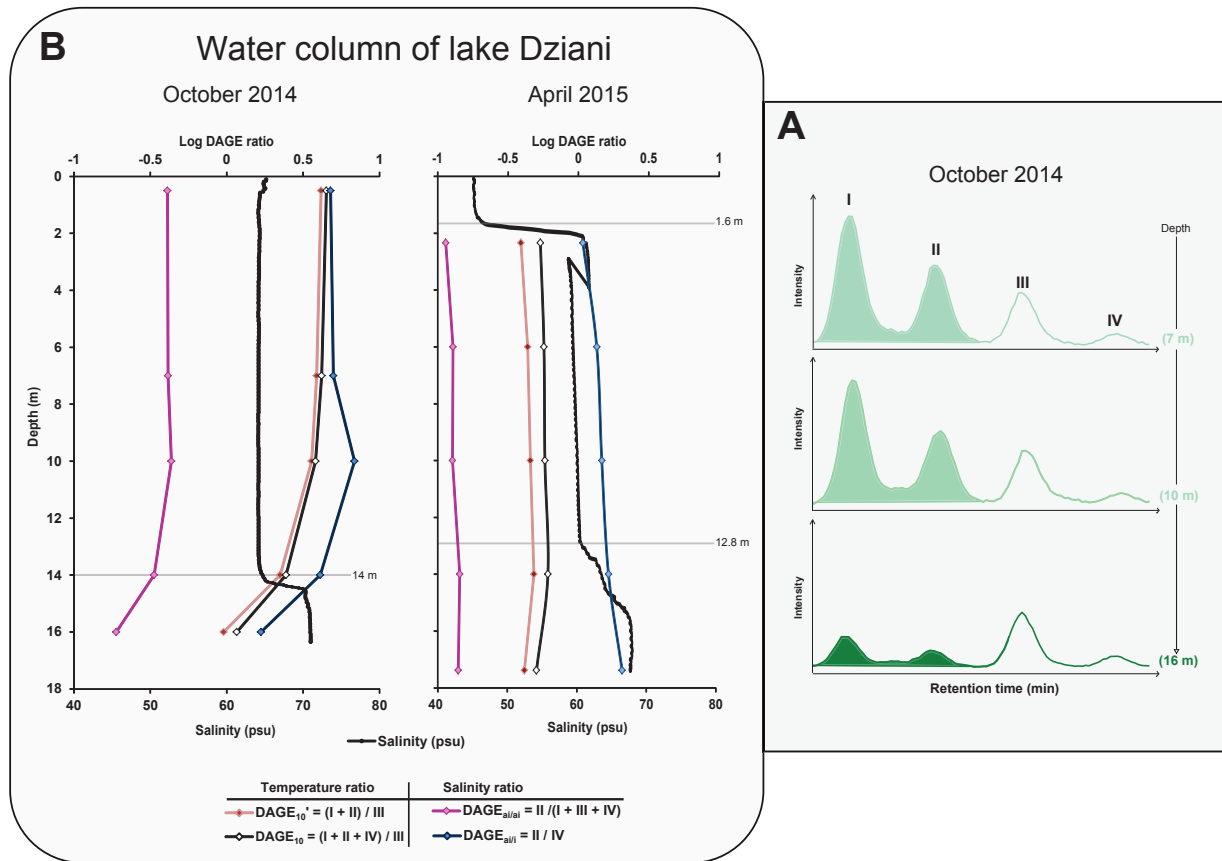


Figure 6.8 : **A**) Chromatogrammes partiels (TIC) montrant les abondances relatives des DAGE I, II, III et IV présents dans les échantillons d'eau à 7, 10 et 16 m du lac Dziani Dzaha en Octobre 2014. **B**) Valeurs des ratios $\text{DAGE}_{ai/i}$ (profil rose), $\text{DAGE}_{ai/i}$ (profil bleu), DAGE_{10} (profil noir et points blancs) et DAGE_{10}' (profil rouge) exprimées en logarithme en fonction de la profondeur du lac Dziani Dzaha en Octobre 2014 et Avril 2015. Les mesures de salinité sont représentées par les profils noirs.

$$\text{DAGE}_{ai/i} = \text{Log} (II / IV) \quad (4)$$

Ces deux rapports ont été testés par la suite comme indicateur potentiel de variations de salinité dans la colonne d'eau du lac Dziani Dzaha, et dans les sédiments de différents étangs salés de Guadeloupe.

6.3.3.2. Variations des indices $\text{DAGE}_{ai/i}$ et $\text{DAGE}_{ai/i}$ dans la colonne d'eau du lac Dziani Dzaha

Le lac Dziani Dzaha présente sur l'année et sur l'ensemble du lac une salinité moyenne d'environ 50 psu (LeBoulanger et al., 2017). Cependant, la salinité varie le long de la colonne d'eau suivant la saison (cf. Figure 6.2 ; section 6.2.3 de ce chapitre).

Les 4 DAGE sus-cités ont pu être identifiés dans tous les échantillons de matériel en suspension prélevés en fin de saison sèche (lac ‘mélangé’ ; octobre 2014) et en fin de saison humide (lac stratifié ; avril 2015); toutefois, leur faible abondance dans les deux premiers mètres de la colonne d’eau en avril 2015 a empêché leur quantification (Figure 6.8B). Ces résultats démontrent pour la première fois la présence de DAGE sur toute la profondeur d’une colonne d’eau, témoignant de communautés bactériennes capables de synthétiser des AGE dans des systèmes aquatiques en présence ou en absence d’oxygène.

En octobre 2014, les valeurs des rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ sont stables ($\sim -0,4$) entre 0,5 m et 14 m de profondeur, ce qui est en accord avec une absence de variation de la salinité (Figure 6.8B). Ce rapport diminue pour atteindre une valeur de $-0,7$, parallèlement à l’augmentation de la salinité. De même, les valeurs du rapport $DAGE_{ai/i}$ sont relativement stables jusqu’à la chémocline de fond ($\sim 0,7$), puis décroissent ($\sim 0,22$) en dessous de celle-ci. La diminution des proportions du DAGE II lorsque la salinité augmente est conforme aux observations faites à partir des cultures de souches pures en conditions contrôlées, et est cohérente avec une adaptation des membranes à la salinité, car la ramification *antéiso* influence la perméabilité des membranes bactériennes (cf. Chapitre 5). En revanche, malgré une différence de salinité plus importante au niveau de la chémocline de sub-surface en période stratifiée (avril 2015), les tendances des rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ observées en octobre 2014 ne sont pas retrouvées à cette saison (Figure 6.8B). En effet, les valeurs des deux rapports $DAGE_{ai/ai}$ demeurent relativement stables de 2,3m jusqu’au fond et ne semblent pas modifiées de façon significative au niveau de la chémocline de fond (Figure 6.8B). Les tendances enregistrées par les deux rapports proposés montrent donc des réponses différentes d’une saison à une autre, malgré des variations de salinité comparables. De plus, l’ordre de grandeur des valeurs d’un même rapport n’est pas similaire d’une saison à l’autre malgré des salinités proches. Ces observations ne permettent pas de confirmer l’utilisation de ces rapports comme potentiels indicateurs de variations de salinité. Cependant, ces résultats sont discutables car notre site d’étude concerne un écosystème actuel très particulier, marqué par différentes stratifications chimiques selon la saison. D’autres paramètres physico-chimiques non considérés dans cette étude mais aussi des différences de composition (qualitative et quantitative) des communautés bactériennes qui synthétisent les éthers de glycérol pourraient être à l’origine des différences de distribution des 4 DAGE observées.

Afin de vérifier la robustesse de nos proxys de variations de température mis en évidence dans les

sections précédentes, nous avons également déterminé les valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ en fonction de la profondeur (Figure 6.8B). Les profils obtenus pour les deux rapports sont similaires entre eux pour chaque saison considérée, malgré des ordres de grandeur différents pour des températures comparables ($\sim 30^{\circ}\text{C}$; Figure 6.2 et Figure 6.8B). En octobre 2014, les valeurs sont stables sur les 10 premiers mètres de colonne d'eau puis diminuent en dessous de la chémocline de fond (Figure 6.8B). Aucune modification de température n'est pourtant enregistrée de part et d'autre de la chémocline ; la modification des rapports de DAGE observée pourrait être liée à une influence de la salinité. En effet, les abondances du DAGE III ne sont pas modifiées en fonction de la profondeur, mais les abondances des DAGE I et II fluctuent avec notamment une diminution importante enregistrée sous la chémocline, augmentant par conséquent les valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ (Figure 6.8B). En avril 2015, les valeurs des deux rapports sont stables sur l'intégralité de la colonne d'eau et ne semblent pas influencées par la chémocline de fond. En revanche, la légère diminution des rapports observée à 16m pourraient refléter la baisse d'environ 1°C mesurée entre 12,8 et 16 m de profondeur.

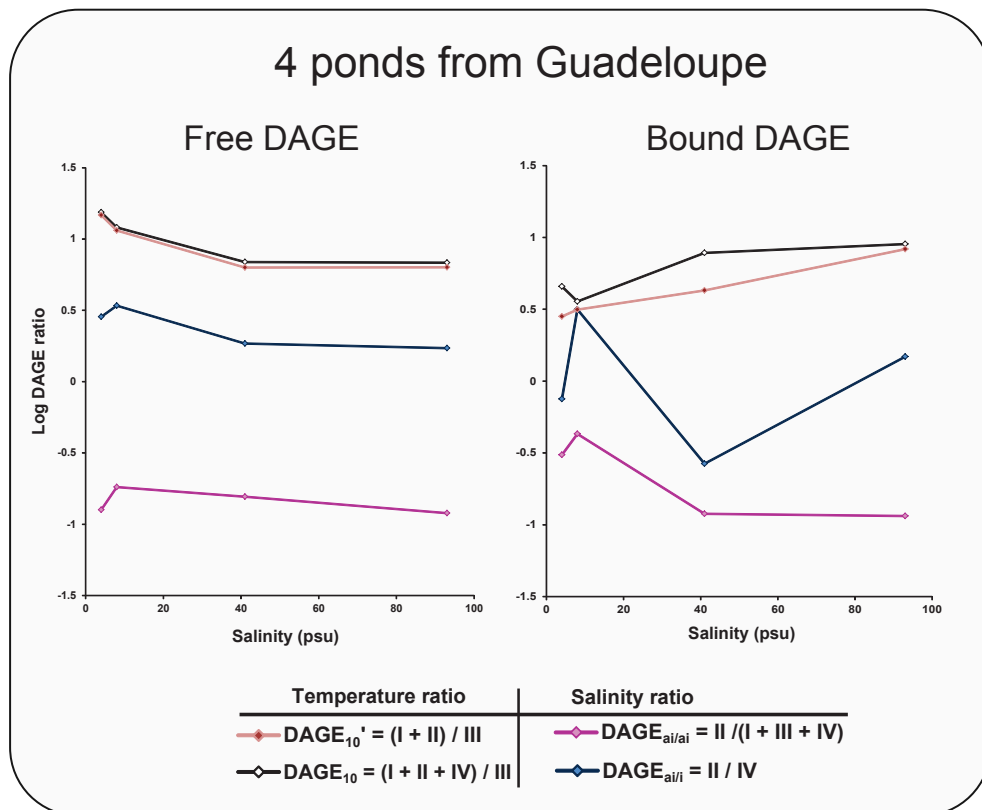


Figure 6.9 : Valeurs (logarithme) des ratios $DAGE_{ai/ai}$ (profil rose), $DAGE_{ai/i}$ (profil bleu), $DAGE_{10}$ (profil noir et points blancs) et $DAGE_{10}'$ (profil rouge) mesurées dans les sédiments de surface de 4 étangs salés de Guadeloupe en fonction de la salinité de l'eau de chaque étang.

6.3.3.3. Application des indices $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ aux étangs salés de Guadeloupe

Dans cette étude de sédiments d'étangs salés de Guadeloupe, nous avons analysé les 4 DAGE suscités sous leur forme libre (considérée représentative de la biomasse bactérienne « morte ») et après hydrolyse des têtes polaires présentes dans les phospholipides intacts (représentatifs de la biomasse bactérienne « vivante »). Les valeurs des rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ calculées à partir des DAGE libres ne montrent aucune relation nette avec la salinité des étangs (Figure 6.9). La mesure de ces rapports sur les fractions « hydrolysées » des DAGE montrent également une absence de relation avec la salinité des eaux (Figure 6.9).

L'absence de relation entre le type de ramification des 4 DAGE considérés et la salinité des étangs est en accord avec une étude précédente qui avait montré une absence de corrélation entre les valeurs du proxy ACE (cf. section 1.3.3.1 Chapitre 1) et les concentrations en sel de ces mêmes étangs (Huguet et al., 2015). Le fait que l'indice ACE ne reflète pas systématiquement des variations de salinité a été précédemment souligné par Günther et al. (2014), et attribué à des changements de communautés d'archées entre des environnements de différentes salinités. Ainsi, dans notre cas, des différences de composition des communautés bactériennes halophiles d'un étang à un autre pourraient être à l'origine de l'absence de relation des rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ avec la salinité mesurée.

Par ailleurs, les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ des fractions libres et liées diffèrent également entre les sites d'études (Figure 6.9). Bien que la température des eaux soit légèrement différente d'un site à un autre (3-6°C ; Huguet et al., 2015), les valeurs de ces rapports ne montrent pas de relation avec la température. Ceci pourrait être dû à des effets combinés de variations de température et de salinité entre les étangs. Des différences de composition des communautés bactériennes d'un étang à un autre pourraient aussi être à l'origine de l'absence de relation entre les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ et la température.

De plus, les valeurs obtenues pour chacun des rapports de DAGE (sensés tracer la salinité ou la température) sont remarquablement différentes entre les fractions « libres » et « liées » (Figure 6.9). Nous avons vu que la production de DAGE peut avoir lieu à la fois dans la colonne d'eau et dans les sédiments. La fraction de DAGE « libre » peut donc refléter à la fois les populations mortes qui

se sont développées dans l'eau et/ou dans les sédiments, alors que la fraction de DAGE « liée » ne témoignerait que de la production de bactéries vivant dans ces sédiments. Ainsi, les DAGE retrouvés dans la fraction « liée » ne représentent probablement qu'une partie des DAGE identifiés dans la fraction « morte » représentative de l'ensemble des communautés de bactéries capables de synthétiser les DAGE.

6.4. Conclusion

Les analyses lipidiques de sédiments actuels continentaux (Lac Dziani Dzaha et étangs salés de Guadeloupe) ainsi que de séries anciennes déposées en milieu marin (coupe composite de Punta Piccola et site DSDP 511) mettent en évidence la présence systématique de 4 DAGE ramifiés d'origine bactérienne. Les structures exactes de ces diéthers de glycérol nécessiteraient d'être confirmées sans ambiguïté mais il est possible que certains de ces composés aient été mal identifiés ou omis lors de précédentes études d'échantillons naturels. Nos travaux démontrent d'une part que ces 4 DAGE peuvent être produits sur toute la profondeur d'une colonne d'eau, mais également dans les sédiments.

L'étude de la composition lipidique de séries sédimentaires anciennes déposées dans des conditions climatiques variables (mises en évidence par différents proxys organiques de température ; $U^{K'}_{37}$, LDI et TEX_{86}) indique des variations des proportions du DAGE **III** (ramifié en position C-10) en lien avec la température. Les valeurs des rapports comparant les proportions de ce composé avec les autres homologues ($DAGE_{10}'$ et $DAGE_{10}$) suivent les variations de température enregistrées par d'autres proxys organiques calibrés, et sont linéairement corrélées avec les valeurs de l' $U^{K'}_{37}$ ($R^2 > 0,82$). Les deux rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ semblent donc pouvoir constituer de nouveaux traceurs de variations de température dans l'environnement. La production des DAGE utilisés dans ces deux rapports semble pouvoir s'effectuer dans toute la colonne d'eau, induisant un enregistrement de la température moyenne de l'ensemble de la colonne d'eau dans les sédiments sous-jacents. Ces résultats prometteurs nécessitent cependant d'être testés sur un plus grand nombre d'environnements et d'effectuer une calibration globale basée sur l'analyse de sédiments de surface.

Bien que des variations de proportions des DAGE **I** et **II** aient été observées dans des environnements où la salinité varie le long de la colonne d'eau ou d'un écosystème à un autre, les proportions de ces

deux diéthers (exprimées sous la forme des rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$) n'ont pu être mis en lien avec la salinité du milieu dans lequel ils ont été produits. Nous avons cependant étudié des écosystèmes actuels très particuliers, compartimentés soit par une stratification importante de la colonne d'eau soit séparés géographiquement, impliquant donc certainement différentes communautés bactériennes à l'origine de la formation des 4 homologues de DAGE considérés.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Synthèse et conclusions des différentes études :

Ce travail de thèse avait comme objectifs de mieux appréhender les modes de formation et le rôle physiologique des éthers de glycérol au sein des membranes bactériennes, afin d'envisager d'utiliser ces lipides atypiques comme biomarqueurs et comme indicateurs de conditions environnementales lors de l'étude d'écosystèmes aquatiques actuels et passés. Notre approche par culture de souches pures en conditions contrôlées, couplée à l'étude de différents sites naturels actuels et anciens, a permis de démontrer que :

1) *La source de carbone (substrat de croissance) influence significativement la variété structurale des éthers de glycérol (AGE) synthétisés par des BSR hétérotrophes.* L'assimilation de substrats à longues chaînes carbonées par ces bactéries (ex. hydrocarbures mono-insaturés et acides organiques de $n\text{-C}_{15}$ à $n\text{-C}_{18}$) entraîne la formation d'une faible diversité de structures d'AGE ($6 < N < 18$), alors que la croissance des cellules sur des substrats à courtes chaînes carbonées (acides organiques de C_3 à C_9) conduit à un grand nombre d'homologues d'AGE ($35 < N < 52$). La forte diversification structurale des AGE synthétisés lors d'une croissance sur les petits substrats carbonés est liée au plus grand nombre de réactions nécessaires (cataboliques et anaboliques) pour métaboliser le substrat et synthétiser les acides gras à l'origine des chaînes acyles et alkyles constitutives des phospholipides membranaires. Cette diversification structurale est en partie liée à la synthèse d'AGE ramifiés (en position *iso*-, *antéiso*- ou C-10) qui est influencée par la nature du substrat de croissance. Des ramifications en C-10 sont formées quelle que soit la nature du substrat de croissance. En revanche, aucune chaîne alkyle ramifiée en position *antéiso* ou *iso* n'est synthétisée à partir de substrats à longue chaîne carbonée ($> \text{C}_9$), limitant ainsi les combinaisons de structures possibles. La présence de ramifications en position *antéiso* et *iso* n'a été observée qu'après croissance sur des petits substrats ($< \text{C}_9$) ou sur substrat isoprénoïde en C_{20} (isomères de phytadiènes). Ce dernier n'entraîne pas la formation d'AGE isoprénoïdes alors que la diversité d'AGE synthétisés à partir de ce substrat de croissance est importante ($N > 21$). En plus des variations du type de ramification, la nature du substrat carboné influence aussi la longueur des chaînes alkyles constitutives des éthers de glycérol. Une croissance sur des substrats pairs entraîne majoritairement la formation de chaînes alkyles paires,

alors qu'une croissance sur des substrats impairs entraîne un mélange de structures paires et impaires, générant ainsi un nombre plus élevé de structures d'AGE.

Les grandes variations de composition en AGE engendrées par un changement de substrat de croissance ne semblent pas pour autant induire de modification des propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires. En effet, la longueur de chaîne moyenne (ACL) ainsi que le taux de ramification moyen (proportions des structures ramifiées vs linéaires) de tous les AGE synthétisés restent comparables quel que soit le substrat utilisé, indiquant un contrôle par les cellules de la composition en AGE de leurs parois membranaires afin de maintenir des propriétés optimales indépendamment de la nature du substrat de croissance et de la diversité en AGE synthétisés.

2) *Des variations de la température et de la salinité du milieu de croissance influencent la composition en AGE de BSR hétérotrophes mésophiles ou thermophile, alors que des variations du pH n'entraînent pas de modification notable de la structure des chaînes alkyles de ces lipides chez ces organismes.* Une diminution des quantités de lipides (AG, MAGE et DAGE) est observée aux extrêmes des intervalles de température de croissance des deux souches mésophiles et de la souche thermophile étudiées, suggérant une réduction de l'activité de certaines enzymes à basse et à haute température. En revanche, chez les deux souches mésophiles, des variations de salinité n'influencent pas leur teneur en lipides. Les proportions de MAGE par rapport aux DAGE restent identiques d'une température de croissance à une autre pour les trois souches considérées, alors qu'une légère diminution des DAGE est observée dans les conditions supra-optimales de salinité. Les liaisons éthers, qui sont chimiquement plus stables aux hautes températures et qui offrent une plus faible perméabilité aux membranes, ne sont pas pour autant préférentiellement synthétisées dans des conditions de haute température ou de haute salinité (i.e. proportion des DAGE constante pour toutes les conditions de température ou de salinité testées).

Différentes modifications structurales des AGE induites par des variations de température et/ou de salinité ont cependant été démontrées. Ainsi, lorsque la salinité ou la température augmente, l'ACL des AGE membranaires diminue. Ces observations ne sont pas en totale adéquation avec celles classiquement faites chez les bactéries qui, souvent, augmentent l'ACL de leurs glycérophospholipides (GPL) afin de réduire la fluidité et la perméabilité de leurs membranes en réponse à une augmentation de la température ou de la salinité. Ce type de réponse n'est toutefois pas universel et d'autres bactéries

semblent favoriser d'autres mécanismes adaptatifs pour contrôler la fluidité et la perméabilité de leur membrane. Dans le cas de notre modèle thermophile, l'ACL des AGE ne varie pas avec la température de croissance. En revanche, le taux global de ramification des AGE, ainsi que les proportions des AGE di-ramifiés diminuent drastiquement avec une augmentation de la température (pour les souches mésophiles et la thermophile) ou de la salinité. Ces observations sont en accord avec des mécanismes de régulation de la fluidité et de la perméabilité des membranes bactériennes constituées d'acylglycérols, indiquant certaines similitudes dans les mécanismes d'adaptation des membranes constituées d'AGE ou d'acylglycérols.

En revanche, les proportions des AGE ramifiés varient de différente manière en fonction des variations de température ou de salinité. Pour nos deux souches modèles mésophiles, les proportions des AGE linéaires ou mono-ramifiés en position C-10 sont principalement influencées par la température du milieu de croissance, alors que ce paramètre n'influence pas les proportions des AGE ramifiés en position *antéiso* et *iso*. Les ramifications en position centrale (e.g. en position C-10) permettent aux GPL d'atteindre une température de fusion plus basse et fluidifient la membrane plus efficacement par rapport à des ramifications en position *antéiso* ou *iso*. Les variations de température étant connues pour altérer la fluidité des membranes, il est donc cohérent d'observer des modifications préférentielles des proportions des AGE ramifiés en position C-10 avec ce paramètre.

Des variations de salinité entraînent quant à elles principalement des modifications des proportions des AGE ramifiés en position *antéiso* et *iso* et des AGE linéaires, sans influencer les proportions des AGE ramifiés en position C-10. La régulation de la perméabilité membranaire, bien qu'étroitement liée à la fluidité des membranes, est davantage essentielle pour la survie des cellules en réponse à des variations de salinité du milieu. Il est donc cohérent d'observer des modulations préférentielles des proportions des AGE ramifiés dans ces positions plus externes (i.e. *antéiso*) en fonction de la salinité, régulant ainsi la perméabilité membranaire, plutôt que des modifications des proportions des AGE ramifiés en position plus centrale (i.e. C-10) davantage impliquées dans la fluidité membranaire.

Par contre, la souche thermophile qui ne synthétise pas d'AGE ramifiés en position C-10, régule la fluidité de sa membrane en modifiant les proportions des AGE ramifiés en position *antéiso* (dominants chez cette souche) par rapport aux composés linéaires et ceux ramifiés en position *iso*. Enfin, une modification des proportions des MAGE en position *sn-2* (2-O-MAGE) par rapport aux MAGE en

position *sn*-1 (1-*O*-MAGE) a été observée en réponse à des variations de la température (mais pas de la salinité) pour les trois souches de BSR étudiées, témoignant d'un nouveau mécanisme d'adaptation à la température jamais décrit à ce jour chez les bactéries.

Ces résultats démontrent donc pour la première fois l'implication des AGE dans l'adaptation des membranes bactériennes en réponse à des variations physico-chimiques du milieu. De plus, les modifications structurales observées sont spécifiques d'une adaptation à un paramètre environnemental, et sont linéairement corrélées à celui-ci. Les relations décrites pour chaque intervalle de températures ou de salinités, laissent envisager l'utilisation de certains rapports d'AGE (e.g 10Me/linéaires ; *antéiso/iso*) comme nouveaux indicateurs de variations de température ou de salinité lors de l'étude d'environnements actuels ou passés.

3) *Quatre isomères de DAGE dont les structures chimiques s'apparentent à certaines synthétisées par nos souches modèles de BSR, sont systématiquement détectés dans le milieu naturel et semblent permettre, dans certains cas, de retracer des variations des conditions environnementales.* En effet, l'étude de la composition lipidique d'échantillons issus de deux séries sédimentaires marines anciennes (Pliocène et transition Eocène-Oligocène) et de deux écosystèmes continentaux actuels (colonne d'eau d'un lac salé et sédiments de 4 étangs salés) démontre la présence systématique de 4 isomères de DAGE présentant les mêmes types de ramification (groupement méthyle en position C-10, *antéiso* et *iso*) que ceux identifiés chez les souches pures de BSR étudiées dans les chapitres précédents. Sur la base des observations faites à partir des cultures en conditions contrôlées et des structures des 4 DAGE naturels sus-cités, différents rapports moléculaires basés sur ces 4 isomères de DAGE ont été définis afin d'essayer de les mettre en relation avec des variations des conditions environnementales mesurées par d'autres moyens (mesures physico-chimiques pour les écosystèmes actuels ou autres indicateurs de conditions environnementales pour les écosystèmes anciens). Ainsi, les rapports $DAGE_{10}$ et sa version simplifiée $DAGE_{10}'$, qui reflètent la proportion relative du DAGE mono-ramifié en position C-10 par rapport aux autres isomères, sont proposés pour tenter de tracer des variations de température, alors que les rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$, qui mesurent la proportion relative du DAGE di-ramifié en position *antéiso/antéiso* par rapport aux autres isomères ou seulement au di-ramifié *antéiso/iso*, ont été définis pour tenter de tracer des variations de salinité.

L'étude de la composition en DAGE des sédiments issus de séries sédimentaires anciennes,

déposées dans conditions climatiques contrastées, montre des variations des proportions du DAGE ramifié en position C-10 en lien avec des variations de la température estimée par différents proxys organiques bien établis : $U^{K'}_{37}$, LDI et TEX_{86} . Les valeurs des rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ suivent en effet les variations de température enregistrées par les différents paléothermomètres suscités et sont linéairement corrélées avec les valeurs de $U^{K'}_{37}$. Ces deux rapports de DAGE semblent donc pouvoir constituer de nouveaux traceurs de variations de température dans l'environnement. En revanche, l'étude de la composition en DAGE d'échantillons issus d'environnements actuels où la salinité varie (soit au sein du même écosystème, soit d'un écosystème à un autre), n'a pas permis d'établir de relation claire entre les rapport $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ et la salinité du milieu. Cependant, les deux cas d'étude choisis sont particuliers et ne constituent probablement pas de bons modèles pour tester ces rapports (i.e. séparation géographique ou stratification importante de la colonne d'eau impliquant certainement des variations de communautés bactériennes entre les sites ou entre les différents compartiments aquatiques).

Conclusions générales

L'identification durant cette thèse d'une grande variété d'éthers de glycérol non-isoprénoïdes chez plusieurs espèces de Bacteria mésophiles, ainsi que dans des environnements tempérés, démontre une nouvelle fois que la présence de liaisons éthers dans les lipides membranaires n'est pas une exclusivité des Archaea ou des Bacteria extrêmophiles. Ce travail a également mis en évidence pour la première fois la présence de DAGE dans les compartiments oxygènes et anoxiques de la colonne d'eau d'un lac stratifié, ce qui témoigne une nouvelle fois de leur large représentativité environnementale. L'identification de ces éthers lipidiques, dont 4 isomères de DAGE particuliers, dans des sédiments contemporains et dans des séries sédimentaires anciennes (datant de 37 Ma) témoigne de sources biologiques aux capacités métaboliques proches à travers les temps géologiques, et confirme le potentiel de résistance des AGE aux processus diagénétiques. L'influence de la source de carbone sur la synthèse des AGE permet de mieux comprendre la grande diversité des AGE observée dans l'environnement (Bradley et al., 2009). Cependant, les sources biologiques de certains AGE macrocycliques ou présentant des cycles propaniques et héliques restent encore inconnues à ce jour (Pancost et al., 2001 ; Bradley et al., 2009 ; Baudrand et al., 2010).

Des variations de la température de croissance des souches pures étudiées n'ont pas entraîné de modification des proportions des lipides possédant deux liaisons éther (DAGE) par rapport aux autres lipides membranaires. Ces observations montrent que la synthèse de liaison éther ne peut plus être envisagée comme une seule et unique adaptation de ces organismes à la thermophilie (Valentine, 2007 ; Koga et al., 2012 ; Grossi et al., 2015). Cependant, la présence de lipides étherifiés dans les membranes bactériennes n'exclut pas de leur conférer une plus grande stabilité et une plus faible perméabilité (Lombard et Moreira, 2011; Matsumi et al., 2011).

Nous avons par ailleurs démontré pour la première fois que les mécanismes de formation des chaînes alkyles des AGE et leur rôle dans l'adaptation des membranes à des stress environnementaux sont très similaires à ceux des acylglycérols plus communément retrouvés chez les Bacteria et les Eukaryota (Sinensky, 1974 ; Denich et al., 2003 ; Mykytczuk et al., 2007 ; Ersnt et al., 2016). L'analyse de cellules bactériennes cultivées en conditions contrôlées de température et de salinité a démontré la modulation des proportions de certains AGE ramifiés et linéaires en fonction des conditions de croissance, indiquant une régulation de la fluidité et/ou de la perméabilité des membranes bactériennes. Certains mécanismes adaptatifs apparaissent linéairement corrélés avec la température ou la salinité de croissance, et peuvent être utilisés comme outils de reconstruction de variations environnementales. Malgré la forte influence de la nature du substrat de croissance sur la diversité structurale des AGE, la composition structurale moyenne des lipides membranaires reste pour autant stable quel que soit le substrat utilisé, ce qui ne constitue donc pas un biais pour l'utilisation de proxys environnementaux basés sur les AGE.

Notre approche par culture de souches pures en conditions contrôlées démontre donc que les éthers de glycérol non-isoprénoïdes possèdent les caractéristiques nécessaires pour constituer d'excellents biomarqueurs environnementaux : spécificité, stabilité chimique et implication physiologique dans l'adaptation des membranes. Les premiers tests effectués pour retracer des variations de température in-situ en utilisant des rapports moléculaires basés sur les DAGE (rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$) se sont avérés très prometteurs. En effet, les valeurs de ces rapports sont linéairement corrélées aux températures estimées à partir du proxy de température couramment utilisé en Paléoclimatologie, l' $U^{K'}_{37}$. A l'heure actuelle, aucun proxy moléculaire ne permet des estimations exactes de température car différents facteurs externes sont connus pour influencer la distribution des molécules utilisées dans ces proxys (Eglinton et Eglinton, 2008 ; Schouten et al., 2013). Il est donc recommandé

d'effectuer des études multi-proxys afin d'affiner la qualité et la robustesse des reconstructions paléoenvironnementales et paléoclimatiques. Les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ pourraient dans un avenir proche constituer de nouveaux paléothermomètres organiques, applicables dans différents écosystèmes aquatiques (en contexte marin ou continental), et permettraient donc d'appuyer les estimations faites avec d'autres proxys moléculaires. En revanche, l'absence de relation des rapports $DAGE_{ai/ai}$ et $DAGE_{ai/i}$ avec la salinité dans des environnements actuels compromet l'utilisation de ces proxys comme indicateurs de salinité passés. Toutefois, ces deux rapports nécessitent d'être testés sur des environnements mieux contraints et non séparés géographiquement.

Perspectives

La culture de souches pures capables de synthétiser des AGE a démontré que différents facteurs environnementaux (source de carbone, température et salinité) influencent la composition structurale de ces lipides. Cependant, il est connu que d'autres facteurs environnementaux peuvent modifier la composition des GPL (Sajbidor, 1997 ; Denich et al., 2003 ; Mykytczuk et al., 2007). Des stress oxydants, des carences en nutriments, et d'autres paramètres physiques (e.g. pression) peuvent être responsables de modifications structurales des lipides membranaires chez les bactéries. Bien que difficilement réalisable sur le court terme, il serait intéressant de tester ces différents paramètres environnementaux afin de mieux contraindre les facteurs qui peuvent influencer la composition en éthers de glycérol des cellules bactériennes. De plus, au cours de la thèse, nous avons étudié chacun des paramètres environnementaux indépendamment. Il serait donc également nécessaire de mesurer l'action de variations combinées de différents paramètres physico-chimiques (ex. température et salinité) sur la composition cellulaire en AGE. En effet, des études précédentes de cultures bactériennes ont démontré des réponses membranaires différentes lorsque plusieurs paramètres environnementaux varient simultanément (e.g. de Rosa et al., 1974 ; Nichols et al., 2000).

Nous n'avons observé aucune influence du pH sur la composition structurale des AGE. Ces résultats ne sont cependant pas synonymes d'une absence d'adaptation des souches avec le pH. En effet, des modifications de la nature des têtes polaires des GPL bactériens sont connues pour permettre aux membranes de s'adapter à des stress ioniques et osmotiques (Russell, 1993 ; Russell, 1995 ; Denich et al., 2015). Il serait donc nécessaire d'étudier la composition des groupements polaires

chez des souches capables de synthétiser des AGE, et de caractériser d'éventuelles modifications de ces groupements en fonction des variations de certains paramètres environnementaux (pH mais aussi salinité et température). Des premières analyses des phospholipides intacts des souches modèles utilisées dans cette étude ont été effectuées en collaboration avec le Royal Netherlands Institute for Sea Research (Drs E. Hopmans et J. Sinninghe Damsté) ; elles ont permis l'identification de la nature des têtes polaires des éthers de glycérol de nos BSR mésophiles modèles, ainsi que la caractérisation d'une nouvelle famille de lipides complexes (cardiolipins) contenant de 1 à 4 chaînes éthérifiées (Grossi, résultats non publiés).

Une cinétique de production et de dégradation sur le long terme (en absence et en présence d'oxygène) des éthers de glycérol est également envisagée. Des premiers résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que, d'un stade de croissance à un autre (après 3, 5, 8 et 11 jours de croissance), le contenu qualitatif en lipides des cellules ainsi que les proportions des différentes structures lipidiques (taux et position des ramifications, ACL) restent similaires au cours de la croissance et après la mort cellulaire. Ces résultats démontrent également une excellente résistance dans le temps (après 100 jours d'incubation) des éthers de glycérol et des membranes cellulaires les contenant, même en conditions oxydantes. Nous envisageons d'étudier la composition lipidique de cellules incubées pendant plus de 1 an en présence d'oxygène, et pendant 3 et 10 ans en anaérobiose afin de tester la stabilité chimique des AGE. Ces résultats devraient être prochainement disponibles.

L'étude de l'influence de différents paramètres environnementaux (Température, pH et salinité) sur la composition en isotopes stables du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) des AGE est également envisagée. Dans le cas où des fractionnements isotopiques en ^{13}C des AGE diffèreraient avec les variations d'un paramètre physico-chimique, la composition en isotopes du carbone de ces lipides pourrait constituer un nouvel indicateur de conditions environnementales. Les extraits lipidiques des cellules cultivées en conditions contrôlées de température, salinité et pH obtenus au cours de cette thèse sont en cours d'analyse pour leurs compositions en ^{13}C . Les premiers résultats indiquent des fractionnements isotopiques différents d'une condition de température à une autre.

A plus long terme, il serait nécessaire d'identifier dans différents écosystèmes aquatiques actuels les communautés microbiennes responsables de la synthèse des éthers de glycérol, afin de mieux contraindre les sources biologiques et les préférences écologiques des organismes producteurs.

Nous avons également observé que les rapports de différents DAGE proposés comme indicateurs de variations de salinité ne varient pas avec la salinité des écosystèmes étudiés. Afin de préciser ce point, il conviendrait d'effectuer de nouvelles études en sélectionnant un seul écosystème homogène et pour lequel des variations de salinité pourraient être mesurées directement sur un certain intervalle de temps.

Nos rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ semblent constituer de bons outils pour reconstruire des variations de température dans des environnements passés. L'étape suivante qui permettrait de valider cette utilisation serait d'effectuer une étape de calibration globale à partir de différents sédiments marins de surface actuels pour lesquels la température de la masse d'eau est connue. Ces analyses permettraient de valider ou non l'utilisation des DAGE en tant que proxy de température.

Enfin, les rapports $DAGE_{10}$ et $DAGE_{10}'$ étant basés sur des diéthers de glycérol, il conviendrait de regarder si le même genre de rapport peut être obtenu à partir des MAGE. Nous avons en effet observé que la composition des MAGE de souches pures varie avec les conditions de croissance de façon similaire aux DAGE. L'analyse du contenu en MAGE de matrices sédimentaires caractérisées par des conditions environnementales contrastées permettrait donc sans doute de proposer de nouveaux proxys organiques basés sur cette classe de lipides.

Références

- Adams, R. L., Kogut, M., Russell, N., 1990. The effect of salinity on growth and lipid composition of a moderately halophilic Gram-negative bacterium HX. *Biochemistry and Cell Biology*, 68, 249-254.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. Le, Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59, 429–493.
- Adler, L., Liljenberg, C., 1981. Sterol content, fatty acid composition of phospholipids, and permeability of labeled ethylene glycols in relation to salt-tolerance of yeasts. *Physiologia Plantarum* 53, 368–374.
- Aerts, J.M., Lauwers, A.M., Heinen, W., 1985. Temperature-dependent lipid content and fatty acid composition of three thermophilic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51, 155–65.
- Albers, S.-V., Meyer, B.H., 2011. The archaeal cell envelope. *Nature reviews. Microbiology* 9, 414–426.
- Allers, T., Mevarech, M., 2005. Archaeal genetics - the third way. *Nature reviews. Genetics* 6, 58–73.
- Anderson, T. F., 1949. *In the Nature of the Bacterial Surface*, Oxford University Press. Oxford, U.K.
- Asselineau, C., Asselineau, J., 1990. Analyse lipidique en taxonomie bactérienne: proposition d'une méthode standardisée. *Biochemistry and Cell Biology* 68, 379–386.
- Ballantyne, A. P., Greenwood, D. R., Sinninghe Damsté, J. S., Csank, A. Z., Eberle, J. J., and Rybczynski, N., 2010. Significantly warmer Arctic surface temperatures during the Pliocene indicated by multiple independent proxies, *Geology*, 38, 603–606.
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., Pace, N.R., 1997. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9188–9193.
- Basov, I.A., Krasheninnikov, V.A., 1983. Benthic foraminifers in Mesozoic and Cenozoic sediments of the southwestern Atlantic as indicators of paleoenvironment: Deep Sea Drilling Project Leg 71. In: Ludwig, W.J., et al. (Eds.), *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project*, 71, pp. 739–788.
- Baudrand, M., Grossi, V., Pancost, R., Aloisi, G., 2010. Non-isoprenoid macrocyclic glycerol diethers associated with authigenic carbonates. *Organic Geochemistry* 41, 1341–1344.
- Beales, N., 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 1–20.

- Bender, G.R., Sutton, S.V.W., Marquis, R.E., 1986. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infection and Immunity* 53, 331–338.
- Bergmann, S., David, F., Clark, W., Wittmann, C., Krull, R., 2013. Membrane fluidity of halophilic ectoine-secreting bacteria related to osmotic and thermal treatment. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36, 1829–1841.
- Berndmeyer, C., Birgel, D., Brunner, B., Wehrmann, L.M., Jöns, N., Bach, W., Arning, E.T., Föllmi, K.B., Peckmann, J., 2012. The influence of bacterial activity on phosphorite formation in the Miocene Monterey Formation, California. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 317–318, 171–181.
- Bethoux, J.-P., 1993. Mediterranean sapropel formation, dynamic and climatic viewpoints. *Oceanologica Acta* 16, 127–133.
- Bishop, D.G., Work, E. 1965. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine limiting conditions. *Biochemical Journal* 96, 567–576
- Bloom, M., Evans, E., Mouritsen, O.G., 1991. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membrane; a perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics* 24, 293–397.
- Borenstain, V., Barenholz, Y., 1993. Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization. *Chemistry and Physics of Lipids* 64, 117–127.
- Boucher, Y., 2007. Lipids: biosynthesis, function, and evolution. *Archaea. Molecular and Cellular Biology*, 341-353.
- Bouloubassi, I., Aloisi, G., Pancost, R.D., Hopmans, E., Pierre, C., Sinninghe Damsté, J.S., 2006. Archaeal and bacterial lipids in authigenic carbonate crusts from eastern Mediterranean mud volcanoes. *Organic Geochemistry* 37, 484–500.
- Bradley, A.S., Fredricks, H., Hinrichs, K.-U., Summons, R.E., 2009. Structural diversity of diether lipids in carbonate chimneys at the Lost City Hydrothermal Field. *Organic Geochemistry* 40, 1169-1178.
- Brassell, S.C., Eglinton, G., Marlowe, I.T., Sarnthein, M., Pflaumann, U., 1986. Molecular stratigraphy: a new tool for climatic assessment. *Nature* 320, 129–133.
- Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S., Zivanovic, Y., Confalonieri, F., Forterre, P., 2005. Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to *Thermococcales*? *Genome biology* 6, R42.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P., 2008. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature reviews. Microbiology* 6, 245–252.

- Brochier-armanet, C., Forterre, P., Gribaldo, S., 2011. Phylogeny and evolution of the Archaea : one hundred genomes later. *Current Opinion in Microbiology* 14, 274–281.
- Brown, A.D., 1978. Compatible Solutes and Extreme Water Stress in Eukaryotic Micro-Organisms. *Advances in Microbial Physiology* 17, 181–242.
- Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A., Nichols, P.D., 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 37, 163–173.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A., 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, *mycobacteria* and fungi. *Nature reviews. Microbiology* 13, 620–630.
- Buckles, L.K., H. Weijers, J.W., Verschuren, D., Sinninghe Damsté, J.S., 2014. Sources of core and intact branched tetraether membrane lipids in the lacustrine environment: anatomy of Lake Challa and its catchment, Equatorial East Africa. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 140, 106–126
- Burg, M.B., Ferraris, J.D., 2008. Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7309–7313.
- Caillon, E., Lubochinsky, B., Rigomier, D., 1983. Occurrence of dialkyl ether phospholipids in *Stigmatella aurantiaca* DW4. *Journal of Bacteriology* 153, 1348–1351.
- Carreto, L., Moore, E., Nobre, M.F., Wait, R., Riley, P.W., Sharp, R.J., Da Costa, M.S., 1996. *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a New Thermophilic Species Isolated from a Thermally Polluted Effluent. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 460–465.
- Castañeda, I.S., Schouten, S., 2011. A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quaternary Science Reviews* 30, 2851–2891.
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F., 2006. Archaeal habitats--from the extreme to the ordinary. *Canadian journal of microbiology* 52, 73–116.
- Chan, M., Himes, R.H., Akagi, J.M., 1971. Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic, and psychrophilic *clostridia*. *Journal of Bacteriology* 106: 876–881.
- Chang, Y.Y., Cronan, J.E., 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 33, 249–259.
- Chanock, R.M., Hayflick, L., Barile, M.F., 1962. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 41–9.
- Chevalier, N., Bouloubassi, I., Birgel, D., Crémière, A., Taphanel, M.-H., Pierre, C., 2011. Authigenic carbonates at cold seeps in the Marmara Sea (Turkey): a lipid biomarker and stable carbon and

- oxygen isotope investigation. *Marine Geology* 288, 112–121.
- Chihib, N.E., Tierny, Y., Mary, P., Hornez, J.P., 2005. Adaptational changes in cellular fatty acid branching and unsaturation of *Aeromonas* species as a response to growth temperature and salinity. *International Journal of Food Microbiology* 102, 113–119.
- Choquet, C.G., Patel, G.B., Sprott, G.D., Beveridge, T.J., 1994. Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42, 375–384.
- Ciesielski, P.F., Weaver, F.M., 1983. Neogene and Quaternary paleoenvironmental history of Deep Sea Drilling Project Leg 71 sediments, southwest Atlantic Ocean. In: Ludwig, W.J., et al. (Eds.), *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project*, vol. 71. U.S. Govt. Printing Office, Washington, pp. 461–477.
- Combourieu Nebout, N., Foucault, A., Mélières, F., 2004. Vegetation markers of palaeoclimate cyclical changes in the Pliocene of Punta Piccola (Sicily, Italy). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 214, 55–66.
- Conte, M.H., Volkman, J.K., Eglinton, G., 1994. Lipid biomarkers of the Haptophyta. In: *The Haptophyte Algae*. Clarendon Press, Oxford, pp. 351–377.
- Conte, M.H., Thompson, A., Eglinton, G., Green, J.C., 1995. Lipid biomarker diversity in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (*Prymnesiophyceae*) and the related species *Gephyrocapsa oceanica*. *Journal of Phycology* 31, 272–282.
- Conte, M.H., Thompson, A., Lesley, D., Harris, R.P., 1998. Genetic and physiological influences on the alkenone/alkenoate versus growth temperature relationship in *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62 (1), 51–68.
- Conte, M.H., Sicre, M.A., Rühlemann, C., Weber, J.C., Schulte, S., Schulz-Bull, D., Blanz, T., 2006. Global temperature calibration of the alkenone unsaturation index ($U^{K'_{37}}$) in surface waters and comparison with surface sediments. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 7.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48, 1146–1151.
- Cooper, G.M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cossins, A.R., Christiansen, J., Prosser, C.L., 1978. Adaptation of biological membranes to temperature. The lack of homeoviscous adaptation in the sarcoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 511, 442–454.

- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Jouliau, C., Cayol, J.L., Hirschler-Réa, A., 2004a. *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an *n*-alkane- and *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 77–83.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Jouliau, C., Cayol, J.L., Hirschler-Réa, A., 2004b. *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1639–1642.
- Crowe, M.A., Power, J.F., Morgan, X.C., Dunfield, P.F., Lagutin, K., Rijpstra, W.I.C., Rijpstra, I.C., Sinninghe Damste, J.S., Houghton, K.M., Ryan, J.L.J., Stott, M.B., 2014. *Pyrimononas methylaliphatogenes* gen. nov., sp. nov., a novel group 4 thermophilic member of the phylum *Acidobacteria* from geothermal soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 220–227.
- Cullis, P.R., Hope, M.J., de Kruijff, B., Verkleij, A.J., Tilcock, C.P.S., 1985. Structural properties in biological membranes. In: Kuo, J.F. (Ed.), *Phospholipids and Cellular Regulations*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–60.
- D’Anjou, R. M., Wei, J. H., Castañeda, I. S., Brigham-Grette, J., Petsch, S. T., and Finkelstein, D. B., 2013. High-latitude environmental change during MIS 9 and 11: biogeochemical evidence from Lake El’gygytyn, Far East Russia, *Climate Past*, 9, 567–581.
- Dansgaard, W., 1964. Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16, 436–468.
- Dawson, K.S., Freeman, K.H., Macalady, J.L., 2012. Molecular characterization of core lipids from halophilic archaea grown under different salinity conditions. *Organic Geochemistry* 48, 1–8.
- De Leeuw, J.W., Rijpstra, W.I.C., Schenck, P.A., 1981. The occurrence and identification of C₃₀, C₃₁ and C₃₂ alkan-1,15-diols and alkan-15-one-1-ols in Unit I and Unit II Black Sea sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 2281–2285.
- De Long, E.F., Yayanos, A.A., 1985. Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228, 1101–1103
- De Mendoza, D., Cronan, J.E., 1983. Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends in Biochemical Sciences* 8, 49–52.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., Lock, J.D.B.U., 1974. Effects of pH and temperature on the fatty acid composition of *Bacillus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* 117, 212–214.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., 1988. The lipids of archaebacteria. *Progress in Lipid Research* 27, 153–175.
- Delong, E.F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5685–5689.

- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T., 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* 52, 149–182.
- Ding, S., Xu, Y., Wang, Y., He, Y., Hou, J., Chen, L., He, J.S., 2015. Distribution of branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers in surface soils of the Qinghai-Tibetan Plateau: Implications of brGDGTs-based proxies in cold and dry regions. *Biogeosciences* 12, 3141–3151.
- Donato, M.M., Jurado, a. S., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C., 2000. Membrane lipid composition of *Bacillus stearothermophilus* as affected by lipophilic environmental pollutants: An approach to membrane toxicity assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 145–153.
- Doumenq, P., Acquaviva, M., Asia, L., Durbec, J.P., Le Dréau, Y., Mille, G., Bertrand, J.C., 1999. Changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in response to n-eicosane as carbon source and various culture conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 151–161.
- Dowhan, W., 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annual Review of Biochemistry* 66, 199–232.
- Drici-Cachon, Z., Cavin, J.F., Divies, C., 1996. Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Letters in Applied Microbiology* 22, 331–334
- Driessen, A.J.M., van de Vossenberg, J.L.C.M., Konings, W.N., Driessen, A.J.M., van de Vossenberg, J.L.C.M., Konings, W.N., 1996. Membrane composition and ion-permeability in extremophiles. *FEMS Microbiology Reviews* 18, 139–148.
- Dumas, F., Lebrun, M.C., Tocanne, J.F., 1999. Is the protein/lipid matching principle relevant to membrane organization and function? *FEBS Letters* 458, 271–277.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Leaf Epicuticular Waxes. *Science, New Series* 156, 1322–1335.
- Eglinton, T.I., Eglinton, G., 2008. Molecular proxies for paleoclimatology. *Earth and Planetary Science Letters* 275, 1–16.
- Elferink, M.G.L., de Wit, J.G., Driessen, A.J.M., Konings, W.N., 1994. Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1193, 247–254.
- Elling, F.J., Könneke, M., Mußmann, M., Greve, A., Hinrichs, K.U., 2015. Influence of temperature, pH, and salinity on membrane lipid composition and TEX₈₆ of marine planktonic thaumarchaeal isolates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 171, 238–255.
- Eltgroth, M.L., Watwood, R.L., Wolfe, G.V., 2005. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the Haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*. *Journal of*

- Phycology 41, 1000–1009.
- Elvert, M., Hopmans, E.C., Treude, T., Boetius, a., Suess, E., 2005. Spatial variations of methanotrophic consortia at cold methane seeps: Implications from a high-resolution molecular and isotopic approach. *Geobiology* 3, 195–209.
- Emiliani, C., 1955. Pleistocene temperatures. *The Journal of Geology* 63, 538–578.
- Englebrecht, A.C., Sachs, J.P., 2005. Determination of sediment provenance at drift sites using hydrogen isotopes and unsaturation ratios in alkenones. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 4253–4265.
- Epstein, B.L., D'Hondt, S., Quinn, J.G., Zhang, J., Hargraves, P.E., 1998. An effect of dissolved nutrient concentrations on alkenone-based temperature estimates. *Paleoceanography* 13, 122–126.
- Erez, J., Luz, B., 1983. Experimental paleotemperature equation for planktonic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 1025–1031.
- Ernst, R., Ejsing, C.S., Antonny, B., 2016. Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids. *Journal of Molecular Biology* 428, 4776–4791.
- Ferrante, G., Ekiel, I., Sprott, G.D., 1987. Structures of diether lipids of *Methanospirillum hungatei* containing novel head groups N, N- dimethylamino- and N,N,N-trimethylaminopentanol. *Biochimica et Biophysica Acta* 921, 281–291.
- Ficken, K., Li, B., Swain, D., Eglinton, G., 2000. An n-alkane proxy for the sedimentary input of submerged/floating freshwater aquatic macrophytes. *Organic Geochemistry* 31, 745–749.
- Fietz, S., Martínez-García, A., Huguet, C., Rueda, G., Rosell-Melé, A., 2011. Constraints in the application of the Branched and Isoprenoid Tetraether index as a terrestrial input proxy. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 116, 1–9.
- Finean, J.B., Coleman, R., Michell, R.H., 1978. *Membranes and Their Cellular Functions*. Blackwell, Oxford.
- Finean, J.B., Michell, R.H., 1981. Isolation, composition, and general structure of membranes. In: Finean, J.B., Michell, R.H. (Eds.), *Membrane Structure*. Elsevier, New York, NY, pp. 19–25.
- Fitch, W.M., Upper, K., 1987. The phylogeny of tRNA sequences provides evidence for ambiguity reduction in the origin of the genetic code. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 52, 759–767.
- Forterre, P., Brochier, C., Philippe, H., 2002. Evolution of the Archaea. *Theoretical Population Biology* 61, 409–422.
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S., Woese, C.R., 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America 74, 4537–4541.
- Fozo, E.M., Kajfasz, J.K., Quivey, R.G., 2004. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 238, 291–295.
- Freese, E., Sass, H., Rütters, H., Schledjewski, R., Rullkötter, J., 2008. Variable temperature-related changes in fatty acid composition of bacterial isolates from German Wadden sea sediments representing different bacterial phyla. *Organic Geochemistry* 39, 1427–1438.
- Fuhrman, J.A., McCallum, K., Davis, A.A., 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356, 148–9.
- Fyfe, P.K., McAuley, K.E., Roszak, A.W., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J., Jones, M.R., 2001. Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 106–111.
- Ge, L., Jiang, S., Yang, T., Yang, J., Wu, N., Zhang, G., Liu, J., 2011. Glycerol ether biomarkers and their carbon isotopic compositions in a cold seep carbonate chimney from the Shenhu area, northern South China Sea. *Chinese Science Bulletin* 56, 1700–1707.
- Gennis, R.B., 1989. *Biomembranes, Molecular Structure and Function*. Springer, New York.
- Ghosh, A., Albers, S.-V., 2011. Assembly and function of the archaeal flagellum. *Biochemical Society transactions* 39, 64–69.
- Gibbons, I.R., 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *Journal of Cell Biology* 91, 107–124.
- Gliozzi, A., Paoli, G., De Rosa, M., Gambacorta, A., 1983. Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 735, 234–242.
- Goldfine, H., Johnston, N.C., 2005. Membrane lipids of clostridia. In *Handbook on Clostridia*, pp. 297–310 Edited by Dürre P., editor. Boca Raton, FL: Taylor & Francis
- Goldfine, H., 2010. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Progress in Lipid Research* 49, 493–498.
- Grauel, A.L., Leider, A., Goudeau, M.L.S., Müller, I.A., Bernasconi, S.M., Hinrichs, K.U., de Lange, G.J., Zonneveld, K.A.F., Versteegh, G.J.M., 2013. What do SST proxies really tell us? A high-resolution multiproxy ($U^{K'}_{37}$, TEX^H_{86} and foraminifera $\delta^{18}O$) study in the Gulf of Taranto, central Mediterranean Sea. *Quaternary Science Reviews* 73, 115–131.
- Gribaldo, S., Brochier-Armanet, C., 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361, 1007–1022.
- Grossi, V., Raphel, D., Aubert, C., Rontani, J.F., 2000. The effect of growth temperature on the long-chain alkenes composition in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Phytochemistry* 54:

393–399.

- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Méou, A., Raphel, D., Garzino, F., Hirschler-Réa, A., 2007. Anaerobic 1-alkene metabolism by the alkane- and alkene-degrading sulfate reducer *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803^T. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7882–7890.
- Grossi, V., Mollex, D., Vinçon-Laugier, A., Hakil, F., Pacton, M., Cravo-Laureau, C., 2015. Mono- and dialkyl glycerol ether lipids in anaerobic Bacteria: biosynthetic insights from the mesophilic sulfate reducer *Desulfatibacillum alkenivorans* PF2803^T. *Applied and Environment Microbiology* 81, 3157–3168.
- Guan, Z., Johnston, N.C., Aygun-Sunar, S., Daldal, F., Raetz, C.R.H., Goldfine, H., 2011. Structural characterization of the polar lipids of *Clostridium novyi* NT. Further evidence for a novel anaerobic biosynthetic pathway to plasmalogens. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811, 186–193.
- Guido, A., Heindel, K., Birgel, D., Rosso, A., Mastandrea, A., Sanfilippo, R., Russo, F., Peckmann, J., 2013. Pendant bioconstructions cemented by microbial carbonate in submerged marine caves (Holocene, SE Sicily). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 388, 166–180.
- Günther, F., Thiele, A., Gleixner, G., Xu, B., Yao, T., Schouten, S., 2014. Distribution of bacterial and archaeal ether lipids in soils and surface sediments of Tibetan lakes: implications for GDGT-based proxies in saline high mountain lakes. *Organic Geochemistry* 67, 19–30.
- Hamilton-Brehm, S.D., Gibson, R. a., Green, S.J., Hopmans, E.C., Schouten, S., van der Meer, M.T.J., Shields, J.P., Damsté, J.S.S., Elkins, J.G., 2013. *Thermodesulfobacterium geofontis* sp. nov., a hyperthermophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Extremophiles* 17, 251–263.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.
- Han, D., Ha, H.K., Hwang, C.Y., Lee, B.Y., Hur, H.-G., Lee, Y.K., 1968. Bacterial distribution along stratified water Columns in the pacific sector of the Arctic ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*.
- Haque, M.A., Russell, N.J., 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology* 150, 1397–1404.
- Harada, N., Sato, M., Sakamoto, T., 2008. Freshwater impacts recorded in tetraunsaturated alkenones and alkenone sea surface temperatures from the Okhotsk Sea across millennial-scale cycles. *Paleoceanography* 23, 1–14.
- Hasegawa, Y., Kawada, N., Nosoh, Y., 1980. Change in Chemical Composition of Membrane of *Bacillus caldotenax* After Shifting the Growth Temperature. *Archives of Microbiology* 126, 103–

108.

- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in lipid research* 29, 167–227.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. *Annual Review of Physiology* 57, 19–42.
- Heipieper, H.J., Diefenbach, R., Keweloh, H., 1992. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1847–1852.
- Henderson, R.J., Millar, R.M., Sargent, J.R., 1995. Effect of growth temperature on the positional distribution of eicosapentaenoic acid and trans hexadecenoic acid in the phospholipids of a vibrio species of bacterium. *Lipids* 30, 181–185.
- Hernandez-Sanchez, M.T., Homoky, W.B., Pancost, R.D., 2014. Occurrence of 1-*O*-monoalkyl glycerol ether lipids in ocean waters and sediments. *Organic Geochemistry* 66, 1–13.
- Hilgen, F.J., 1991. Extension of the astronomically calibrated (polarity) time scale to the Miocene/Pliocene boundary. *Earth and Planetary Science Letters* 107, 349–368.
- Hohn, M.J., Hedlund, B.P., Huber, H., 2002. Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum “*Nanoarchaeota*”: indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Systematic and applied microbiology* 25, 551–554.
- Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Schefuß, E., Herfort, L., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., 2004. A novel proxy for terrestrial organic matter in sediments based on branched and isoprenoid tetraether lipids. *Earth and Planetary Science Letters* 224, 107–116.
- Horner-Devine, M.C., Carney, K.M., Bohannon, B.J.M., 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 271, 113–122.
- Horrocks, L.A., Sharma, M., 1982. Plasmalogens and *O*-alkyl glycerophospholipids, pp. 51–93. In Neuberger A, van Deenen LLM (ed), *New comprehensive biochemistry* (1. phospholipids), vol 4. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Horváth, I., Glatz, a, Varvasovszki, V., Török, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasdi, L., Benkő, S., Joó, F., Vigh, L., 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a “fluidity gene”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3513–3518.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H.O., Stetter, K., 1992. *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 15,

340–351.

- Huber, R., Rossnagel, P., Woese, C.R., Rachel, R., Langworthy, T.A., Stetter, K.O., 1996. Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov.sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 40–49.
- Huguet, C., Schimmelmann, A., Thunell, R., Lourens, L.J., Damsté, J.S.S., Schouten, S., 2007. A study of the TEX₈₆ paleothermometer in the water column and sediments of the Santa Barbara Basin, California. *Paleoceanography* 22, 1–9.
- Huguet, A., Grossi, V., Belmahdi, I., Fosse, C., Derenne, S., 2015. Archaeal and bacterial tetraether lipids in tropical ponds with contrasted salinity (Guadeloupe, French West Indies): Implications for tetraether-based environmental proxies. *Organic Geochemistry* 83–84, 158–169.
- Hynönen, U., Rasinkangas, P., Satokari, R., Paulin, L., de Vos, W.M., Pietilä, T.E., Kant, R., Palva, A., 2016. Isolation and whole genome sequencing of a ruminococcus-like bacterium, associated with irritable bowel syndrome. *Anaerobe* 39, 60–67.
- Janhke, L.L., Eder, W., Huber, R., Hope, Hinrichs, K.U., Hayes, J.M., Des Marais, D.J., Cady, S., Summons, R.E., 2001. Signature Lipids and Stable Carbon Isotope Analyses of Octopus Spring Hyperthermophilic Communities Compared with Those of Aquificales Representatives. *Applied and Environnementale Microbiology* 67, 5179–5189.
- Johnston, N.C., Aygun-Sunar, S., Guan, Z., Ribeiro, A.A., Daldal, F., Raetz, C.R., Goldfine, H., 2010. A phosphoethanolamine-modified glycosyl diradylglycerol in the polar lipids of *Clostridium tetani*. *The Journal of Lipid Research* 51, 1953–1961
- Johnston, N.C., Goldfine, H., 1988. Isolation and characterization of a novel four chain phospholipid, the phosphatidylglycerol acetal of plasmenylethanolamine from *Clostridium butyricum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 961, 1–12.
- Jorge, C.D., Borges, N., Santos, H., 2015. A novel pathway for the synthesis of inositol phospholipids uses cytidine diphosphate (CDP)-inositol as donor of the polar head group. *Environmental Microbiology* 17, 2492–2504.
- Kannenberg, E.L., Poralla, K., 1999. Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* 86, 168–176.
- Kates, M., Sastry, P.S., Yengoyan, L.S., 1963. Isolation and characterization of a diether analog of phosphatidyl glycerophosphate from *Halobacterium cutirubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 70, 705–707.
- Kates, M., 1992. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochemical Society Symposia* 58, 51–72.
- Kaur, G., Mountain, B.W., Pancost, R.D., 2008. Microbial membrane lipids in active and inactive sinters

from Champagne Pool, New Zealand: elucidating past geothermal chemistry and microbiology. *Organic Geochemistry* 39, 1024–1028.

Kaur, G., Mountain, B.W., Stott, M.B., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., 2015. Temperature and pH control on lipid composition of silica sinters from diverse hot springs in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Extremophiles* 19, 327–344.

Kell, D.B., 1984. Diffusion of protein complexes in prokaryotic membranes: fast, free, random or directed? *Trends in Biochemical Sciences* 9, 86–88.

Killops, V., Killops, S., 2005. Introduction to organic geochemistry 2d edition. Blackwe Publishing Ltd.

Kim, J.H., Schouten, S., Hopmans, E.C., Donner, B., Sinninghe Damsté, J.S., 2008. Global sediment core-top calibration of the TEX₈₆ paleothermometer in the ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1154–1173.

Kim, J.H., van der Meer, J., Schouten, S., Helmke, P., Willmott, V., Sangiorgi, F., Koç, N., Hopmans, E.C., Damsté, J.S.S., 2010. New indices and calibrations derived from the distribution of crenarchaeal isoprenoid tetraether lipids: Implications for past sea surface temperature reconstructions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 4639–4654.

Klose, C., Surma, M.A., Gerl, M.J., Meyenhofer, F., Shevchenko, A., Simons, K., 2012. Flexibility of a eukaryotic lipidome - insights from yeast lipidomics. *PLoS One* 7.

Knothe, G., Dunn, R.O., 2009. A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 843–856.

Koga, Y., Goldfine, H., 1984. Biosynthesis of phospholipids in *Clostridium butyricum*: Kinetics of synthesis of plasmalogens and the glycerol acetal of ethanolamine plasmalogen. *Journal of Bacteriology* 159, 597–604.

Koga, Y., Kyuragi, T., Nishihara, M., Sone, N., 1998. Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent. *Journal of Molecular Evolution* 46, 54–63.

Koga, Y., 2012. Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea* 2012.

Koga, Y., 2014. From Promiscuity to the Lipid Divide: On the Evolution of Distinct Membranes in Archaea and Bacteria. *Journal of Molecular Evolution* 78, 234–242.

Konings, W.N., Albers, S-V., Koning, S., Driessen, J.M., 2002. The cell membrane plays a crucial role in the survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antoine van Leeuwenhoek* 81, 61–72.

- Ladbrooke, B.D., Chapman, D., 1969. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes a review and summary of some recent studies. *Chemistry and Physics of Lipids* 304–356.
- Lang, J.M., Darling, A.E., Eisen, J.A., 2013. Phylogeny of Bacterial and Archaeal Genomes Using Conserved Genes: Supertrees and Supermatrices. *PLoS One* 8.
- Langworthy, T.A., Holzer, G., Zeikus, J.G., Tornabene, T.G., 1983. *Iso-* and *Anteiso-*Branched Glycerol Diethers of the Thermophilic Anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 1–17.
- Lattaud, J., Kim, J.-H., De Jonge, C., Zell, C., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., 2016. The C₃₂ alkane-1,15-diol as a tracer for riverine input in coastal seas. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 200, 146–158.
- Lauwers, A. M., Heinen, W. 1983. Thermal properties of enzymes from *Bacillus flavothermus*, grown between 34 and 70°C. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 191–201.
- Lear, C.H., Bailey, T.R., Pearson, P.N., Coxall, H.K., Rosenthal, Y., 2008. Cooling and ice growth across the Eocene-Oligocene transition. *Geology* 36, 251–254.
- Leboulanger, C., Agogué, H., Bernard, C., Bouvy, M., Carré, C., Cellamare, M., Duval, C., Fouilland, E., Got, P., Intertaglia, L., Lavergne, C., Le Floch, E., Roques, C., Sarazin, G., 2017. Microbial Diversity and Cyanobacterial Production in Dziani Dzaha Crater Lake, a Unique Tropical Thalassohaline Environment. *PLOS ONE* 12(1).
- Lechevalier, M. P., Moss, C. W., 1977. Lipids in Bacterial Taxonomy - A Taxonomist's View. *Critical Reviews in Microbiology* 5, 109–210.
- Leider, A., Hinrichs, K.U., Mollenhauer, G., Versteegh, G.J.M., 2010. Core-top calibration of the lipid-based U₃₇^{K'} and TEX₈₆ temperature proxies on the southern Italian shelf (SW Adriatic Sea, Gulf of Taranto). *Earth and Planetary Science Letters* 300, 112–124.
- LePage, C., Fayolle, F., Hermann, M., Vandecasteele, J.-P., 1987. Changes in Membrane Lipid Composition of *Clostridium acetobutylicum* during Acetone-Butanol Fermentation: Effects of Solvents, Growth Temperature and pH. *Microbiology* 133, 103–110.
- Li, J., Pancost, R.D., Naafs, B.D.A., Yang, H., Zhao, C., Xie, S., 2016. Distribution of glycerol dialkyl glycerol tetraether (GDGT) lipids in a hypersaline lake system. *Organic Geochemistry* 99, 113–124.
- Lin, T., Weibel, D.B., 2016. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 4255–4267.
- Lindas, A.C., Bernander, R., 2013. The cell cycle of archaea. *Nature Reviews Microbiology* 11, 627–638.
- Liu, Z., Pagani, M., Zinniker, D., DeConto, R., Huber, M., Brinkhuis, H., Shah, S.R., Leckie, M., Pearson, A., 2009. Global cooling during the Eocene–Oligocene climate transition. *Science* 323,

1187–1190.

- Lloret, E., Dessert, C., Gaillardet, J., Albéric, P., Crispi, O., Chaduteau, C., Benedetti, M.F., 2011. Comparison of dissolved inorganic and organic carbon yields and fluxes in the watersheds of tropical volcanic islands, examples from Guadeloupe (French West Indies). *Chemical Geology* 280, 65–78.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2001. *Molecular Cell Biology* (4th edition). Freeman & Co., New York, NY, 1084 pp.
- Logan, N. A., Vos, P. D. 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Lombard, J., Moreira, D., 2011. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoïd biosynthesis in the three domains of life. *Molecular Biology and Evolution* 28, 87–99.
- Lombard, J., López-García, P., Moreira, D., 2012. The early evolution of lipid membranes and the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology* 10, 507–515.
- Loomis, S.E., Russell, J.M., Eggermont, H., Verschuren, D., Sinninghe Damsté, J.S., 2014. Effects of temperature, pH and nutrient concentration on branched GDGT distributions in East African lakes: Implications for paleoenvironmental reconstruction. *Organic Geochemistry* 66, 25–37.
- López, C.S., Alice, A.F., Heras, H., Rivas, E.A., Sánchez-Rivas, C., 2006. Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* 152, 605–616.
- Los, D.A., Murata, N., 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1666, 142–157.
- Lourens, L.J., Antonarakou, A., Hilgen, F.J., Hoof, A.A.M. Van, Zachariasse, W.J., 1996. Evaluation of the Plio-Pleistocene astronomical. *Paleoceanography* 11, 391–413.
- Ludwig, W.G., Krashennnikov, V.A., Wise, Jr., S.W., 1983. Introduction and Explanatory Notes. In: Ludwig, W.J., et al. (Eds.), *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project*, vol 71, U.S. Govt. Printing Office, Washington, pp. 5–19.
- Macalady, J.L., Vestling, M.M., Baumler, D., Boekelheide, N., Kaspar, C.W., Banfield, J.F., 2004. Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: A key to survival in acid. *Extremophiles* 8, 411–419.
- MacDonald, A.G., 1984. The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 304, 47–68.
- MacDonald, A.G., 1987. The role of membrane fluidity in complex processes under high pressure. In: Marquis, R.E., Zimmerman, A.M., Jannasch, H.W. (Eds.), *Current Perspectives in High Pressure Biology*. Academic Press, London, pp. 207–223

- MacDonald, D.L., Goldfine, H., 1990. Phosphatidylglycerol acetal of plasménylethanolamine as an intermediate in ether lipid formation in *Clostridium butyricum*. *Biochemistry and Cell Biology* 68, 225–230.
- Macnab, R.M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology* 57, 77–100.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., 2015. *Brock biology of microorganisms* (Fourteenth edition). Boston: Pearson.
- Männistö, M.K., Puhakka, J. A., 2001. Temperature- and growth-phase-regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater *Proteobacteria*. *Archives of Microbiology* 177, 41–46.
- Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., De Mendoza, D., 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *Journal of Bacteriology* 186, 6681–6688.
- Marlowe, I.T., Brassell, S.C., Eglinton, G., Green, J.C., 1984. Long chain unsaturated ketones and esters in living algae and marine sediments. *Organic Geochemistry* 6, 135–141.
- Marr, A.G., Ingraham, J.L., 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 84, 1260–7.
- Marsh, D., 2010. Structural and thermodynamic determinants of chain-melting transition temperatures for phospholipid and glycolipids membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1798, 40–51.
- Martin, C.E., Oh, C.-S., Jiang, Y., 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771, 271–285.
- Matsumi, R., Atomi, H., Driessen, A.J., Van Der Oost, J., 2011. Isoprenoïd biosynthesis in Archaea--biochemical and evolutionary implications. *Research in Microbiology* 162, 39–52.
- McDermid, A.S., McKee, A.S., Marsh, P.D., 1988. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infection and Immunity* 56, 1096–1100.
- McElhaney, R.N., 1982. Effects of membrane lipids on transport and enzymatic activities. In: Razin, S., Rottam, R. (Eds.), *Current Topics in Membranes and Transport*, vol. 17. Academic Press, London, pp. 317–380.
- McGarrity, J.T., Armstrong, J.B., 1975. The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 398, 258–264.
- Menzel, D., Hopmans, E.C., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., 2006. Membrane tetraether lipids of planktonic Crenarchaeota in Pliocene sapropels of the eastern Mediterranean Sea. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 239, 1–15.
- Mixson Byrd, S., Burkholder, J.M., Zimba, P. V., 2017. Environmental stressors and lipid production

- by *Dunaliella* spp. I. Salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 487, 18–32.
- Morii, H., Yagi, H., Akutsu, H., Nomura, N., Sako, Y., Koga, Y., 1999. A novel phosphoglycolipid archaetidyl(glucosyl)inositol with two sesterterpanyl chains from the aerobic hyperthermophilic archa- eon *Aeropyrum pernix* K1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436, 426–436.
- Müller, P.J., Kirst, G., Ruhland, G., von Storch, I., Rosell-Mele, a, 1998. Calibration of the alkenone paleotemperature index UK'37 based on core-tops from the eastern South Atlantic and the global ocean (60 degrees N-60 degrees S). *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 62, 1757–1772.
- Muza, J.P., Williams, D.F., Wise, S.W., 1983. Paleogene oxygen isotope record for Deep Sea Drilling Sites 511 and 512, subantarctic south Atlantic ocean: paleotemperatures, paleoceanographic changes, and the Eocene/Oligocene boundary event. *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project* 71, 409–422.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Leduc, L.G., Ferroni, G.D., 2007. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 95, 60–82.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Ferroni, G.D., Leduc, L.G., 2010. Cytoplasmic membrane fluidity and fatty acid composition of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in response to pH stress. *Extremophiles* 14, 427–441.
- Naafs, B.D.A., Gallego-Sala, A.V., Inglis, G.N., Pancost, R.D., 2017. Refining the global branched glycerol dialkyl glycerol tetraether (brGDGT) soil temperature calibration. *Organic Geochemistry*, in press.
- Nagle, J.F., Morowitz, H.J., 1978. Molecular mechanisms for proton transport in membranes. *Proceedings of the National* 75, 298–302.
- Navarre, W.W., Schneewind, O., 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 174–229.
- Nichols, D.S., Olley, J., Garda, H., Brenner, R.R., McMeekin, T.A., 2000. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Applied and environmental microbiology* 66, 2422–2429.
- Nishihara, M., Utagawa, M., Akutsu, H., Koga, Y., 1992. Archaea contain a novel diether phosphoglycolipid with a polar head group identical to the conserved core of eucaryal glycosyl phosphatidylinositol. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 12432–12435.
- Nougier, J., Vatin-Perignon, N., Cantagrel, J.M., Cheminée, J.L., 1979. Volcanism and structure of Mayotte Island (Comoros Archipelago). *Cr. Acad Sci Paris, D.* 288, 211–214.
- Oba, M., Sakata, S., Tsunogai, U., 2006. Polar and neutral isopranyl glycerol ether lipids as biomarkers

- of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry* 37, 1643–1654.
- Oberg, T.S., Ward, R.E., Steele, J.L., Broadbent, J.R., 2011. Identification of plasmalogens in the cytoplasmic membrane of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 880–884.
- Ohniwa, R.L., Kitabayashi, K., Morikawa, K., 2013. Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress. *FEMS Microbiology Letters* 338, 141–146.
- Ohno, Y., Yano, I., Masui, M., 1979. Effect of NaCl concentration and temperature on the phospholipid and fatty acid compositions of a moderately halophilic bacterium, *Pseudomonas halosaccharolytica*. *The Journal of Biochemistry* 85, 413–421.
- Oppermann, B.I., Michaelis, W., Blumenberg, M., Frerichs, J., Schulz, H.M., Schippers, A., Beaubien, S.E., Krüger, M., 2010. Soil microbial community changes as a result of long-term exposure to a natural CO₂ vent. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 2697–2716
- Oren, A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4, 2.
- Orphan, V.J., Hinrichs, K.-U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M., Delong, E.F., 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing Bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environment Microbiology* 67, 1922–1934.
- Pagani, M., Huber, M., Liu, Z., Bohaty, S.M., Henderiks, J., Sijp, W., Krishnan, S., DeConto, R.M., 2011. The role of carbon dioxide during the onset of Antarctic glaciation. *Science* 334, 1261–1264.
- Pancost, R.D., Bouloubassi, I., Aloisi, G., Sinninghe Damste, J.S., Party, M.S.S., 2001. Three series of non-isoprenoïdal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry* 32, 695-707.
- Pancost, R.D., Pressley, S., Coleman, J.M., Talbot, H.M., Kelly, S.P., Farrimond, P., Schouten, S., Benning, L., Mountain, B.W., 2006. Composition and implications of diverse lipids in New Zealand geothermal sinters. *Geobiology* 4, 71–92.
- Paściak, M., Holst, O., Lindner, B., Mordarska, H., Gamian, A., 2003. Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T). *Journal of Biological Chemistry* 278, 3948–3956.
- Patel, G.B., Sprott, G.D., 1999. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Critical reviews in biotechnology* 19, 317–57.
- Patel, G.B., Chen, W., 2005. Archaeosome immunostimulatory vaccine delivery system. *Current drug*

delivery 2, 407–21.

Patel, G.B., Chen, W., 2010. Archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery system. *Expert review of vaccines* 9, 431–440.

Pearson, A., 2014. Lipidomics for geochemistry, p 291–336. In Holland HD, Turekian KK(ed), *Treatise on geochemistry*, 2nd ed, vol 12. Elsevier, Oxford, United Kingdom.

Pearson, A., Ingalls, A.E., 2013. Assessing the Use of Archaeal Lipids as Marine Environmental Proxies. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 41, 359–384.

Pedersen, T., 1991. Anoxia vs. Productivity: What Controls the Formation of Organic Rich Carbon sediments and sedimentary rocks. *AAPG Bulletin* 3, 500–501.

Pehowich, D.J., Macdonald, P.M., McElhaney, R.N., Cossins, A.R., Wang, L.C.H., 1988. Calorimetric and spectroscopic studies of lipid thermotropic phase behavior in liver inner mitochondrial membranes from a mammalian hibernator. *Biochemistry* 27, 4632–4638.

Petelska, A.D., Figaszewski, Z.A., 2000. Effect of pH on the interfacial tension of lipid bilayer membrane. *Biophysical Journal* 78, 812–817.

Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.M., 2005. *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in Petroleum Exploration and Earth History*. Cambridge University Press, New York.

Peterse, F., van der Meer, J., Schouten, S., Weijers, J.W.H., Fierer, N., Jackson, R.B., Kim, J.H., Sinninghe Damsté, J.S., 2012. Revised calibration of the MBT-CBT paleotemperature proxy based on branched tetraether membrane lipids in surface soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 96, 215–229.

Plancq, J., Mattioli, E., Pittet, B., Simon, L., Grossi, V., 2014. Productivity and sea-surface temperature changes recorded during the late Eocene-early Oligocene at DSDP Site 511 (South Atlantic). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 407, 34–44.

Plancq, J., Grossi, V., Pittet, B., Huguet, C., Rosell-Melé, A., Mattioli, E., 2015. Multi-proxy constraints on sapropel formation during the late Pliocene of central Mediterranean (southwest Sicily). *Earth and Planetary Science Letters* 420, 30–44.

Poger, D., Caron, B., Mark, A.E., 2014. Effect of Methyl-Branched Fatty Acids on the Structure of Lipid Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B* 118, 13838–13848.

Poger, D., Mark, A.E., 2015. A ring to rule them all: The effect of cyclopropane fatty acids on the fluidity of lipid bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B* 119, 5487–5495.

Pond, J.L., Langworthy, T. A., 1986. Effect of growth temperature on the long-chain diols and fatty acids of *Thermomicrobium roseum*. *Journal of Bacteriology* 169, 1328–1330.

Prahl, F.G., Wakeham, S.G., 1987. Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone

- compositions for paleotemperature assessment. *Nature* 330, 367–369.
- Prahl, F.G., Muehlhausen, L.A., Zahnle, D.L., 1988. Further evaluation of long-chain alkenones as indicators of paleoceanographic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2303-2310.
- Prahl, F.G., 2003. Physiological impacts on alkenone paleothermometry. *Paleoceanography* 18, 1–7.
- Prahl, F.G., Rontani, J.-F., Volkman, J.K., Sparrow, M.A., 2005. Ecology and biogeochemistry of alkenone production at Station ALOHA. *Deep-Sea Research Part I Oceanographic Research Papers* 52, 699-719.
- Prins, R.A., Akkermans-Kruyswijk, J., Franklin-Klein, W., Lankhorst, A., Van Golde, L.M.G., 1974. Metabolism of serine and ethanolamine plasmalogens in *Megasphaera elsdenii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 348, 361–9.
- Prins, R.A., Van Golde, L.M.G., 1976. Entrance of glycerol into plasmalogens of some strictly anaerobic bacteria and protozoa. *FEBS Letters* 63, 107–111.
- Quinn, P.J., 1981. The fluidity of cell membranes and its regulation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 38, 1–104.
- Quinn, P.J., 1986. Models of haloadaptation in bacterial membranes. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 87–94.
- Rampen, S.W., Willmott, V., Kim, J.H., Uliana, E., Mollenhauer, G., Schefuß, E., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., 2012. Long chain 1,13- and 1,15-diols as a potential proxy for palaeotemperature reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 84, 204–216.
- Rampen, S.W., Willmott, V., Kim, J.H., Rodrigo-Gámiz, M., Uliana, E., Mollenhauer, G., Schefuß, E., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., 2014. Evaluation of long chain 1,14-alkyl diols in marine sediments as indicators for upwelling and temperature. *Organic Geochemistry* 76, 39–47.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. Fatty acids, related and derived lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, Toronto, Canada, pp. 23–52.
- Ravelo, A.C., Hillaire-Marcel, C., 2007. The use of oxygen and carbon isotopes of foraminifera in paleoceanography. In: Hillaire-Marcel, C., de Vernal, A. (Eds.), 2007. *Developments in Marine Geology: Proxies in Late Cenozoic Paleoceanography*, vol. 1. Elsevier, pp. 735–764.
- Razin, S., 1982. Sterols in Mycoplasma Membranes. *Current Topics in Membranes and Transport* 17, 183–205.
- Record, M.T., Jr, Courtenay, E.S., Cayley, D.S. Guttman, H. J., 1998. Responses of *Escherichia coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 143–148.
- Reizer, J., Grossowicz, N., Barenholz, Y., 1985. The effect of growth temperature on the thermotropic

- behavior of the membranes of a thermophilic *Bacillus*. Composition-structure-function relationships. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 815, 268–280.
- Renaud, S.M., Zhou, H.C., Parry, D.L., Thinh, L. Van, Woo, K.C., 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis sp.*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis sp.* (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology* 7, 595–602.
- Rilfors, L., Lindblom, G., Wieslander, A., Christiansson, A., 1984. Lipid bilayer stability in biological membranes. In: Kates, M., Morris, L. (Eds.), *Biomembranes*, vol. 12. Membrane Fluidity. Plenum Press, New York, pp. 206–245.
- Ring, M.W., Schwär, G., Thiel, V., Dickschat, J.S., Kroppenstedt, R.M., Schulz, S., Bode, H.B., 2006. Novel iso-branched ether lipids as specific markers of developmental sporulation in the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36691–36700.
- Rodrigo-Gámiz, M., Rampen, S.W., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., 2016. The impact of oxic degradation on long chain alkyl diol distributions in Arabian Sea surface sediments. *Organic Geochemistry* 100, 1–9.
- Romantsov, T., Guan, Z., Wood, J.M., 2009. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788, 2092–2100.
- Rommerskirchen, F., Plader, A., Eglinton, G., Chikaraishi, Y., Rullkötter, J., 2006. Chemotaxonomic significance of distribution and stable carbon isotopic composition of long-chain alkanes and alkan-1-ols in C₄ grass waxes. *Organic Geochemistry, Stable Isotopes in Biogeosciences* 37, 1303–1332.
- Rosa, M.D.E., Gambacorta, a, Lock, J.D.B.U., 1974. Effects of pH and Temperature on the Fatty Acid Composition of *Bacillus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* 117, 212–214.
- Rosell-Melé, A., Carter, J., Eglinton, G., 1994. Distributions of long-chain alkenones and alkyl alkenoates in marine surface sediments from the North East Atlantic. *Organic Geochemistry* 22, 501–509.
- Rosell-Melé, A., Jansen, E., Weinelt, M., 2002. Appraisal of a molecular approach to infer variations in surface ocean freshwater inputs into the North Atlantic during the last glacial. *Global and Planetary Change* 34, 143–152.
- Russell, N., 1984. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends in Biochemical Sciences* 9, 108–112.
- Russell, N.J., 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 21, 93–113.
- Russell, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, a, Abee, T., 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food microbiology* 28, 255–261.

- Russell, N.J., Fukunaga, N., 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 75, 171–182.
- Russell, N.J., Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms, 1993. In: R.H. Vreeland and L. Hochstein L. (editors) *Microbiology of Extreme and Unusual Environments*, Vol. 1, The Halophiles, CRC Press, Boca Raton, pp. 163-210.
- Rütters, H., Sass, H., Cypionka, H., Rullkötter, J., 2001. Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Archives of Microbiology* 176, 435–442.
- Sachs, J., Pahnke, K., Smittenberg, R., Zhang, Z., 2007. Biomarkers Indicators of Past Climate. *Encyclopedia Quaternary Science* 2, 775–782.
- Sachse, D., Sachs, J.P., 2008. Inverse relationship between D/H fractionation in cyanobacterial lipids and salinity in Christmas Island saline ponds. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 793–806.
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* 14, 225–274.
- Saita, E., Albanesi, D., De Mendoza, D., 2016. Sensing membrane thickness: Lessons learned from cold stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 837–846.
- Saito, R., Oba, M., Kaiho, K., Maruo, C., Fujibayashi, M., Chen, J., Chen, Z.Q., Tong, J., 2013. Ether lipids from the lower and middle triassic at Qingyan, Guizhou Province, Southern China. *Organic Geochemistry* 58, 27–42.
- Sajbidor, J., Lamaeka, M., Breierovh, E., Chrastina, A., Pokreisz, P., and Eetik, M. 1994. Effect of salt stress on fatty acid alterations in some strains of *Dipodascopsis* and *Dipodascus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 184-1 86.
- Sajbidor, J., 1997. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical reviews in biotechnology* 17, 87–103.
- Salton, M. R. J. 1952. Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. *Nature* 170:746–747.
- Salton, M. R. J. 1994. The bacterial cell envelope—a historical perspective, pp. 1–22. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Schleper, C., Jurgens, G., Jonuscheit, M., 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature reviews. Microbiology* 3, 479–88.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14421–14426.

- Schouten, S., Hopmans, E.C., Schefuß, E., Sinninghe Damsté, J.S., 2002. Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? *Earth and Planetary Science Letters* 204, 265–274.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Forster, A., van Breugel, Y., Kuypers M.M.M., Sinninghe Damsté, J.S., 2003. Extremely high sea-surface temperatures at low latitudes during the middle Cretaceous as revealed by archaeal membrane lipids. *Geology* 31, 1069–72.
- Schouten, S., Ossebaar, J., Kienhuis, M., and Bijma, J. 2005. Stable hydrogen isotopic fractionation patterns of long chain alkenones. *Organic Geochemistry: Challenges for the 21st Century* 1, 603–604.
- Schouten, S., Ossebaar, J., Schreiber, K., Kienhuis, M.V.M., Langer, G., Benthien, A., Bijma, J., 2006. The effect of temperature, salinity and growth rate on the stable hydrogen isotopic composition of long chain alkenones produced by *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Biogeosciences* 3, 113–119.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., 2013. The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: A review. *Organic Geochemistry* 54, 19–61.
- Schulz, H.N., Schulz, H.D., 2005. Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite. *Science* 307, 416–418.
- Schwab, V.F., Sachs, J.P., 2009. The measurement of D/H ratio in alkenones and their isotopic heterogeneity. *Organic Geochemistry* 40, 111–118.
- Sessions, A.L., Burgoyne, T.W., Schimmelmann, A., Hayes, J.M., 1999. Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Organic Geochemistry* 30, 1193–1200.
- Sessions, A.L., Sylva, S.P., Summons, R.E., Hayes, J.M., 2004. Isotopic exchange of carbon-bound hydrogen over geologic timescales. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 1545–1559
- Sgarrella, F., Di Donato, V., Sprovieri, R., 2012. Benthic foraminiferal assemblage turnover during intensification of the Northern Hemisphere glaciation in the Piacenzian Punta Piccola section (Southern Italy). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 333–334, 59–74.
- Shackleton, N.J., 1967. Oxygen Isotope Analyses and Pleistocene Temperatures Re-assessed. *Nature* 21, 15–17.
- Shen, P.Y., Coles, E., Foote, J.L., Stenesh, J., 1970. Fatty acid distribution in mesophilic and thermophilic strains of the genus *Bacillus*. *Journal of Bacteriology* 103, 479–481.
- Sikes, E.L., Sicre, M.-A., 2002. Relationship of the tetra-unsaturated C37 alkenone to salinity and temperature: Implications for paleoproxy applications. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 3, 1–11.

- Sinensky, M., 1971. Temperature Control of Phospholipid Biosynthesis in *Escherichia coli*. Journal of bacteriology 106, 2–9.
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 71, 522–525.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720–730
- Sinninghe Damsté, J.S., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., Schouten, S., Geenevasen, J. a. J., 2000. Newly discovered non-isoprenoid glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in sediments. Chemical Communications 17, 1683–1684.
- Sinninghe Damsté, J. S. S. Schouten S, Hopmans EC, van Duin AC, G.J., 2002. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. The Journal of Lipid Research 43, 1641–1651.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Geenevasen, J. a J., Strous, M., Jetten, M.S.M., 2005. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox). FEBS Journal 272, 4270–4283.
- Sinninghe Damsté, J.S.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Schouten, S., Balk, M., Stams, A.J.M., 2007. Structural characterization of diabolic acid-based tetraester, tetraether and mixed ether/ester, membrane-spanning lipids of bacteria from the order Thermotogales. Archives of Microbiology 188, 629–641.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Foesel, B.U., Overmann, J., Dedysh, S.N., 2011. 13,16-Dimethyl octacosanedioic acid (iso-Diabolic Acid), a common membrane-spanning lipid of *Acidobacteria* subdivisions 1 and 3. Applied and Environmental Microbiology 77, 4147–4154.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Foesel, B.U., Wüst, P.K., Overmann, J., Tank, M., Bryant, D. a., Dunfield, P.F., Houghton, K., Stott, M.B., 2014. Ether- and ester-bound iso-diabolic acid and other lipids in members of *Acidobacteria* subdivision 4. Applied and Environmental Microbiology 80, 5207–5218.
- Spang, A., Saw, J.H., Jørgensen, S.L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A.E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., Ettema, T.J.G., 2015. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. Nature 521, 173–179.
- Spero, H.J., Bijma, J., Lea, D.W., Bemis, B.E., 1997. Effect of seawater carbonate concentration on foraminiferal carbon and oxygen isotopes. Nature 390, 497–500.
- Sperotto, M.M., Ispen, J.H., Mouritsen, O.G., 1989. Theory of protein-induced lateral phase separation

in lipid membranes. *Cell Biochemistry and Biophysics* 14, 79–94.

Sprott, G.D., Meloche, M., Richards, J.C., 1991. Proportions of diether, macrocyclic diether, and tetraether lipids in *Methanococcus jannaschii* grown at different temperatures. *Journal of Bacteriology* 173, 3907–3910.

Sprovieri, R., Sprovieri, M., Caruso, A., Pelosi, N., Bonomo, S., Ferraro, L., 2006. Astronomic forcing on the planktonic foraminifera assemblage in the Piacenzian Punta Piccola section (southern Italy). *Paleoceanography* 21, 1–21.

Standley, L.J., Simoneit, B.R.T., 1987. Characterization of extractable plant wax, resin, and thermally matured components in smoke particles from prescribed burns. *Environmental Science and Technology* 21, 163–169.

Stein, J., Budzikiewicz, H., 1987. 1-O-(13-Methyl-1-Z-tetradecenyl)-2-O-(13-methyltetradecanoyl)-glycero-3-phospho-ethanolamin, ein Plasmalogen aus *Myxococcus stipitatus*. *Zeitschrift für Naturforschung B*. Volume 42, Issue 8, 1017–1020.

Sturt, H.F., Summons, R.E., Smith, K., Elvert, M., Hinrichs, K.-U., 2004. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry--new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 18, 617–628.

Sutton, G.C., Russell, N.J., Quinn, P.J., 1991. The Effect of Salinity on the Phase-Behavior of Total Lipid Extracts and Binary-Mixtures of the Major Phospholipids Isolated From a Moderately Halophilic Eubacterium. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1061, 235–246.

Suutari, M., Laakso, S., 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 285–328.

Syke, T.J.S., Royer, J.-Y., Ramsay, A.T.S., Kidd, R.B., 1998. Southern hemisphere palaeobathymetry. In: Cramp, A., et al. (Eds.), *Geological Evolution of Ocean Basins: Results from the Ocean Drilling Program. Spec. Publ. Geol. Soc. Lond.*, vol. 131, pp. 3–42.

Tanaka, T., Burgess, J.G., Wright, P.C., 2001. High-pressure adaptation by salt stress in a moderate halophilic bacterium obtained from open seawater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 200–204.

Tierney, J.E., Schouten, S., Pitcher, A., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., 2012. Core and intact polar glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) in Sand Pond, Warwick, Rhode Island (USA): Insights into the origin of lacustrine GDGTs. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 77, 561–581

Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., Cossins, A.R., 1997. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815–818

- Timmer, M.S.M., Sauvageau, J., Foster, A.J., Ryan, J., Lagutin, K., Shaw, O., Harper, J.L., Sims, I.M., Stocker, B.L., 2014. Discovery of lipids from *B. longum* subsp. *infantis* using whole cell MALDI analysis. *Journal of Organic Chemistry* 79, 7332–7341.
- Timmons, M.D., Knutson, B.L., Nokes, S.E., Strobel, H.J., Lynn, B.C., 2009. Analysis of composition and structure of *Clostridium thermocellum* membranes from wild-type and ethanol-adapted strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 929–939.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2010. *Microbiology an introduction* (10th ed). San Francisco, CA Pearson Benjamin Cummings.
- Trevors, J.T., 2003. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 57, 87–103.
- Tsai, M., Ohniwa, R.L., Kato, Y., Takeshita, S.L., Ohta, T., Saito, S., Hayashi, H., Morikawa, K., 2011. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. *BMC microbiology* 11, 13.
- Tunblad-Johansson, I., Andre, L., Adler, L., 1987. The sterol and phospholipid composition of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown at various concentrations of NaCl. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 921, 116–123.
- Turich, C., Freeman, K.H., 2011. Archaeal lipids record paleosalinity in hypersaline systems. *Organic Geochemistry* 42, 1147–1157.
- Turk, M., Montiel, V., Žigon, D., Plemenitaš, A., Ramos, J., 2007. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology* 153, 3586–3592.
- Unell, M., Kabelitz, N., Jansson, J.K., Heipieper, H.J., 2007. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the *anteiso/iso* ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiology Letters* 266, 138–143.
- Valentine, D.L., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature reviews. Microbiology* 5, 316–323.
- Valero-Guillén, P.L., Fernández-Natal, I., Marrodán-Ciordia, T., Tauch, A., Soriano, F., 2016. Ether-linked lipids of *Dermabacter hominis*, a human skin actinobacterium. *Chemistry and Physics of Lipids* 196, 24–32.
- van de Meer, W., 1984. Physical aspects of membrane fluidity. In: Shinitzsky, M. (Ed.), *Physiology of Membrane Fluidity*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 54–71.
- van der Meer, M.T.J., Baas, M., Rijpstra, W.I.C., Marino, G., Rohling, E.J., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., 2007. Hydrogen isotopic compositions of long-chain alkenones record freshwater flooding of the Eastern Mediterranean at the onset of sapropel deposition. *Earth and Planetary*

Science Letters 262, 594–600.

- van De Vossenberg, J.L., Ubbink-Kok, T., Elferink, M.G., Driessen, a J., Konings, W.N., 1995. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Molecular microbiology* 18, 925–932.
- van De Vossenberg, J.L.C.M., Driessen, A.J.M., Konings, W.N., 1998. The essence of being extremophilic: The role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* 2, 163–170.
- van De Vossenberg, J.L., Driessen, a J., Grant, W.D., Konings, W.N., 1999a. Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles* 3, 253–257.
- van De Vossenberg, J.L.C.M., Driessen, A.J.M., Da Costa, M.S., Konings, W.N., 1999b. Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1419, 97–104.
- van De Vossenberg, J.L.C.M., Driessen, A.J.M., Konings, W.N., 2000. Adaptations of the cell membrane for life in extreme environments. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (Eds.), *Cell and Molecular Responses to Stress*. Elsevier Science Ltd., Amsterdam, The Netherlands, pp. 71–88.
- Vellai, T., Vida, G., 1999. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 266, 1571–7.
- Vinçon-Laugier, A., Grossi, V., Pacton, M., Escarguel, G., Cravo-Laureau, C., 2016. The alkylglycerol ether lipid composition of heterotrophic sulfate reducing bacteria strongly depends on growth substrate. *Organic Geochemistry* 98, 141–154.
- Vinçon-Laugier, A., Cravo-Laureau, C., Mitteau, I., Grossi, V., 2017. Temperature-dependent alkyl glycerol ether lipid composition of mesophilic and thermophilic sulfate-reducing Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–13.
- Volkman, J.K., Eglinton G., Corner, E.D.S., Sargent, J.R., 1980. Novel unsaturated straight-chain C₃₇–C₃₉ methyl and ethyl alkenones in marine sediments and a coccolithophore *Emiliana huxleyi*. In *Advances in Organic Geochemistry 1979*, edited by A. G. Douglas and J. R. Maxwell, pp. 219–227, Elsevier, New York.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., 1992. C30–C32 568 alkyl diols and unsaturated alcohols in microalgae of the class *Eustigmatophyceae*. *Organic Geochemistry* 18, 131–138.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Sikes, E.L., 1995. Alkenones in *Gephyrocapsa oceanica*: implications for studies of paleoclimate. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 513–520.
- Wagner, F., Rottem, S., Held, H.D., Uhlig, S., Zähringer, U., 2000. Ether lipids in the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. *European Journal of Biochemistry* 267, 6276–6286.

- Wang, H., Liu, W., Zhang, C.L., Jiang, H., Dong, H., Lu, H., Wang, J., 2013. Assessing the ratio of archaeol to caldarchaeol as a salinity proxy in highland lakes on the northeastern Qinghai-Tibetan Plateau. *Organic Geochemistry* 54, 69–77.
- Wang, Y., Xu, Y., 2016. Distribution and source of 1-*O*-monoalkyl glycerol ethers in the Yellow River and Bohai Sea. *Organic Geochemistry* 91, 81–88.
- Watanabe, Y., Takakuwa, M., 1984. Effect of Sodium Chloride on Lipid Composition of *Saccharomyces rouxii*. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 2415–2422.
- Weijers, J.W.H., Schouten, S., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., David, O.R.P., Coleman, J.M., Pancost, R.D., Sinninghe Damsté, J.S., 2006. Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits. *Environmental Microbiology* 8, 648–657
- Weijers, J.W.H., Schouten, S., van den Donker, J.C., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., 2007. Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 703–713.
- Weijers, J.W.H., Schouten, S., Schefuß, E., Schneider, R.R., Sinninghe Damsté, J.S., 2009. Disentangling marine, soil and plant organic carbon contributions to continental margin sediments: A multi-proxy approach in a 20,000 year sediment record from the Congo deep-sea fan. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 119–132.
- Weijers, J.W.H., Wiesenberg, G.L.B., Bol, R., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., 2010. Carbon isotopic composition of branched tetraether membrane lipids in soils suggest a rapid turnover and a heterotrophic life style of their source organism(s). *Biogeosciences* 7, 2959–2973.
- Wise, S.W., 1983. Mesozoic and Cenozoic calcareous nannofossils recovered by Deep Sea Drilling Project Leg 71 in the Falkland Plateau region, southwest Atlantic Ocean. In: Ludwig, W.J., et al. (Eds.), *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project*, vol. 71. U.S. Govt. Printing Office, Washington, pp. 481–550.
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5088–5090.
- Woese, C.R., Magrum, L.J., Fox, G.E., 1978. Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution* 11, 245–252.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579.
- Wolhowe, M.D., Prah, F.G., Probert, I., Maldonado, M., 2009. Growth phase dependent hydrogen isotopic fractionation in alkenone-producing haptophytes. *Biogeosciences* 6, 1681–1694.

- Wood, J.M., 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane- based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 230–262.
- Wuytack, E., Boven, S., Michiels, C.W., 1998. Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3220–3224.
- Yanagawa, R., Otsuki, K., Tokui, T., 1968. Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Japanese Journal of Veterinary Research* 16, 31–37.
- Yayanos, a a, 1986. Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 9542–9546.
- Yang, H., Zheng, F., Xiao, W., Xie, S., 2015. Distinct distribution revealing multiple bacterial sources for 1-*O*-monoalkyl glycerol ethers in terrestrial and lake environments. *Science China Earth Sciences* 58, 1005–1017.
- Yuk, H.G., Marshall, D.L., 2004. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3500–3505.
- Zachos, J.C., Shackleton, N.J., Revenaugh, J.S., Palike, H., Flower, B.P., 2001. Climate Response to Orbital Forcing Across the Oligocene-Miocene Boundary. *Science* 292, 274–278.
- Zahran, H.H., 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils* 25, 211–223.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E., Saw, J., Backstrom, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K., Anantharaman, K., Stott, M., Nunoura, T., Banfield, J., Schramm, A., Baker, B.J., Spang, A., Etema, T.J.G., 2017. Metagenomic exploration of Asgard archaea illuminates the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature Publishing Group* 541, 353–358.
- Zeikus, J.G., Dawson, M.A., Thompson, T.E., Ingvorsen, K., Hatchikian, E.C., 1983. Microbial Ecology of Volcanic Sulphidogenesis: Isolation and Characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. *Journal of General Microbiology* 129, 1159–1169.
- Zell, C., Kim, J.-H., Hollander, D., Lorenzoni, L., Baker, P., Silva, C. G., Nittrouer, C., and Sinninghe Damsté, J. S., 2014. Sources and distributions of branched and isoprenoid tetraether lipids on the Amazon shelf and fan: Implications for the use of GDGT-based proxies in marine sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 139, 293–312.
- Zeng, Y.B., Ward, D.M., Brassell, S.C., Eglinton, G., 1992. Biogeochemistry of hot spring environments. *Chemical Geology* 95, 347–360.
- Zhang, C.L., Pearson, A., Li, Y.L., Mills, G., Wiegel, J., 2006. Thermophilic temperature optimum

for crenarchaeol synthesis and its implication for archaeal evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4419–4422.

Zhang, Y.-M., Rock, C.O., 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology* 6, 222–233.

Zinke, J., Reijmer, J.J.G., Thomassin, B.A., Dullo, W.C., Grootes, P.M., Erlenkeuser, H., 2003a. Postglacial flooding history of Mayotte Lagoon (Comoro Archipelago, southwest Indian Ocean). *Marine Geology* 194, 181–196.

Zinke, J., Reijmer, J.J.G., Thomassin, B.A., 2003b. Systems tracts sedimentology in the lagoon of Mayotte associated with the Holocene transgression. *Sedimentary Geology* 160, 57–79.

